



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LGII

**“Diseño y evaluación de sistemas nanoacarreadores funcionalizados
para el tratamiento farmacológico de la ataxia espino-cerebelosa tipo 7”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta
Ing. Fabiola Vianet Borbolla Jiménez

TUTOR PRINCIPAL:
DR. JONATHAN J. MAGAÑA AGUIRRE
LABORATORIO DE MEDICINA GENÓMICA
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

COMITÉ TUTOR
DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO L.
FES IZTACALA

DR. RAMÓN MAURICIO CORAL V.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., abril del 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Dr. Juan Fernández Ruiz

Dr. Gerardo Leyva Gómez

Dr. Oscar Armando Pérez Méndez

Difusión Científica derivada del proyecto

Publicaciones

- Del Prado-Audelo, M. L., Magaña, J. J., Mejía-Contreras, B. A., Borbolla-Jiménez, F. V., Giraldo-Gomez, D. M., Piña-Barba, M. C., ... & Leyva-Gómez, G. (2019). In vitro cell uptake evaluation of curcumin-loaded PCL/F68 nanoparticles for potential application in neuronal diseases. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 905-914.
- Tapia-Guerrero, Y. S., Prado-Audelo, D., Borbolla-Jiménez, F. V., Giraldo Gomez, D. M., García-Aguirre, I., Colín-Castro, C. A., ... & Magaña, J. J. (2020). Effect of UV and gamma irradiation sterilization processes in the properties of different polymeric nanoparticles for biomedical applications. *Materials*, 13(5), 1090.
- Cortés, H., Hernández-Parra, H., Bernal-Chávez, S. A., Prado-Audelo, M. L. D., Caballero-Florán, I. H., Borbolla-Jiménez, F. V., ... & Leyva-Gómez, G. (2021). Non-Ionic Surfactants for Stabilization of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Uses. *Materials*, 14(12), 3197.
- Borbolla-Jiménez, F. V., Prado-Audelo, D., Luisa, M., Cisneros, B., Caballero-Florán, I. H., Leyva-Gómez, G., & Magaña, J. J. (2021). New Perspectives of Gene Therapy on Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias: From Molecular Targets to Novel Nanovectors. *Pharmaceutics*, 13(7), 1018.
- Borbolla-Jiménez FV, García-Aguirre I, Del Prado-Audelo ML, D.M. Giraldo Gómez, Hernández-Hernández O, Cisneros B, G. Leyva-Gómez and Magaña JJ (2022). Characterization of PLGA/PVA/Plx188 Nanocarrier with rapamycin loaded for potential treatment of Spinocerebellar Ataxia type 7. **(en proceso de publicación)**.
- Borbolla-Jiménez FV, Del Prado-Audelo ML, D.M. Giraldo Gómez, Hernández-Hernández O, Cisneros B, G. Leyva-Gómez and Magaña JJ (2022). Characterization of Rapamycin-loaded PLGA Nanoparticles functionalized with Polysorbate 80: Potential treatment for neurodegenerative diseases. **(en proceso de publicación)**.

Congresos

International Materials Research Congress (IMRC). DESIGN AND PRELIMINARY EVALUATION OF POLY-EPSILON-CAPROLACTONE NANOPARTICLE CARRIER FOR A POLYGLUTAMINE DISORDER. Cancún, México. Agosto 2016.

XXXII Congreso Nacional de Bioquímica. NEURONAL LOCALIZATION ASSAYS OF RAPAMYCIN-LOADED PLGA NANOPARTICLES FOR POTENTIAL TREATMENT OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 7. Ixtapa, México. Noviembre 2018.

Neurodegenerative diseases: Biology & Therapeutics. Cold Spring Harbor Laboratory Conference. DESIGN AND CHARACTERIZATION OF RAPAMYCIN-LOADED-PLGA NANOPARTICLES FOR POTENTIAL TREATMENT OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE. Nueva York, EUA. Noviembre 2018.

Agradecimientos

A mi mamá Ma. Guadalupe Jiménez Dávila y a mi papá Juan Antonio Borbolla Sosa, quienes siempre me apoyaron en mis decisiones.

A mi hermana Arely, a mi tía Carmen y a mi tía Gloria por animarme a seguir adelante y terminar esta etapa.

A mis amigos del laboratorio, con quienes pasé muchos momentos agradables dentro y fuera del laboratorio. En especial a Mireya por su ayuda dentro del laboratorio durante la realización de mis experimentos y a Claudia por su apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A mi novio Manuel, por haberme apoyando en la última etapa del doctorado.

A mis perritas Cuqui (Q.E.P.D.) y Kiara, quienes me acompañaron en cada noche de desvelo y viví grandes momentos de alegría.

A Cataxino y Börte, mis gatitos que llegaron para darme el último empujón de energía para titularme.

A mi tutor, el Dr. Jonathan Magaña, quien me dio la oportunidad de formarme en su laboratorio y siempre me apoyó en el desarrollo de nuevas habilidades.

A la Dra. Irasema Chirino y al Dr. Ramón Coral, quienes cada semestre me estuvieron apoyando y orientando para el buen desarrollo de mi trabajo de investigación.

A Yessica, Ian y María Luisa, quienes me apoyaron en la realización de algunos experimentos.

Al Dr. Gerardo, quien me orientó durante la realización de la primera etapa del proyecto y me permitió trabajarla en su laboratorio.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por el proyecto registrado como CB-2015-01-258043 subvencionado por CONACyT, así como por el proyecto apoyado por la Fundación Miguel Aleman A.C., ambos a cargo del Dr. Jonathan J. Magaña Aguirre.

El Dr. Gerardo Leyva Gómez agradece el financiamiento otorgado al proyecto CONACYT A1-S-15759 titulado "Diseño de herramientas de vectorización para nanotransportadores biodegradables y su posible aplicación en enfermedades neurodegenerativas" y al proyecto PAPIIT IN204722 titulado "Evaluación del efecto de fármacos encapsulados con nanopartículas recubiertas en la inhibición de agregados proteicos de ataxina 7 anormal en modelos neuronales in vitro" por el apoyo brindado para la realización de esta actividad de investigación.

Dedicatorias

A mis sobrinas Sofía Sámano Borbolla y Lucía Sámano Borbolla por ayudarme a vivir momentos muy felices. Espero ser una buena influencia en sus vidas.

A mi tío Germán Borbolla Sosa (Q.E.P.D.) por haberme enseñado el camino de la ciencia. Hasta donde estés, GRACIAS.

Tabla de contenido

Índice	ii
Índice de Tablas	vi
Índice de Figuras	vii
Glosario	ix
Resumen.....	xi
I. Introducción	1
II. Marco Teórico	2
III. Justificación	25
IV. Hipótesis	26
V. Objetivos	26
VI. Metodología experimental	27
VII. Resultados	35
VIII Discusión	64
IX. Conclusiones	78
X. Perspectivas	79
XI. Referencias	80

ÍNDICE

Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
1. Ataxia espinocerebelosa tipo 7	2
1.1 Características Clínicas	2
1.2 Neuropatología	2
2. Prevalencia en México y en el mundo	5
3. Origen genético de la SCA7: Mutación en el gen <i>ATXN7</i>	6
3.1 Anticipación genética	7
4. Tratamiento	7
5. Bases Moleculares: Ataxina-7	8
5.1 Función de ataxina-7	9
5.2. Patogénesis molecular	9
5.2.1 Ataxina-7 mutada y su efecto en la retina	9
5.2.2 Mutación en ataxina-7 y su efecto en la formación de agregados proteicos	11
5.2.3 Mutación en ataxina-7 y su efecto a nivel post-traducciona	11
5.2.4 Mutación en ataxina-7 y su efecto a nivel de UPS y autofagia	12
5.2.5 Mutación en ataxina-7 y muerte celular por apoptosis	13
6. Alternativas terapéuticas	13
6.1 Silenciamiento de un gen	15
6.1.1 Oligonucleótidos antisentido (ASO)	15
6.1.2 RNA interferente (RNAi)	16
6.2 Sistemas de Edición de ADN	16
6.3 Incremento de la degradación proteica	16
6.3.1. Rapamicina	17
6.3.2 Características fisicoquímicas de la rapamicina	18
6.3.3 Farmacodinamia y Farmacocinética	19
6.3.4 Usos actuales	19
6.3.5 Evidencia de actividad farmacológica en modelos in vitro	19
6.3.6 Evidencia de actividad en modelos in vivo	20
6.3.7 Desventajas del uso terapéutico de la rapamicina	20
7. Nanotecnología como transporte farmacológico	21
7.1 Nanoacarreadores poliméricos	22

7.1.1	Polímero base	22
7.1.2	Estabilizantes	23
7.1.3	Surfactantes	24
7.1.3.1	Poloxámeros	25
7.1.3.2	Polisorbatos	25
III.	JUSTIFICACIÓN	25
IV.	HIPÓTESIS	26
V.	OBJETIVOS	26
VI.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
8.	Elaboración de los sistemas nanoacarreadores	27
9.	Esterilización	28
9.1	Validación de los métodos de esterilización	29
10.	Caracterización fisicoquímica de los sistemas nanoacarreadores	29
10.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	29
10.2	Dispersión dinámica de luz (DLS)	29
10.3	Potencial Z	29
10.4	Análisis estructural	30
10.5	Análisis térmico	30
10.5.1	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	30
10.5.2	Análisis termogravimétrico (TGA)	30
11.	Eficiencia de entrapamiento (EE) y carga del fármaco (DL)	30
12.	Perfil de liberación del fármaco	30
13.	Estabilidad de las nanoacarreadores en dispersión	31
14.	Evaluación Biológica de los sistemas nanoacarreadores	31
14.1	Líneas Celulares	31
14.2	Internalización celular	31
14.3	Citotoxicidad celular	32
14.3.1	Morfología celular	32
14.3.2	Viabilidad Celular	32
14.3.3	Apoptosis	33
14.3.3.1	Evaluación de Anexina V	33
14.3.3.2	Inmunoblot y valoración de actividad de caspasas	33
15.	Evaluación de Eficiencia Terapéutica	34
15.1	Modelo experimental de SCA7	34
15.2	Curva de doxiciclina e identificación de agregados anormales de ataxina-7 en el modelo experimental <i>in vitro</i>	34

15.3 Tratamiento del modelo celular inducible con PLGA/PVA/Plx188/Rap	34
15.3 Evaluación de la marca LC3 después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap	35
16. Análisis estadístico	35
VII. RESULTADOS	35
17. Diseño y evaluación del sistema nanoacarreador base de PLGA/PVA	35
17.1 Morfología del nanoacarreador	35
17.2 Esterilización del nanoacarreador PLGA/PVA	36
17.3 Efecto de la esterilización en las características fisicoquímicas de los nanoacarreadores PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap	37
17.3.1 Tamaño y potencial Z	37
17.3.2 Análisis químico-estructural	37
17.3.3 Análisis de estabilidad mediante termogravimetría	39
17.3.4 Análisis termo-analítico	39
17.4 Estabilidad del sistema PLGA/PVA en dispersión	40
17.5 Liberación de rapamicina del sistema PLGA/PVA/Rap	41
17.5.1 Modelos matemáticos	42
17.6 Internalización del nanoacarreador PLGA/PVA en las células MIO-M1	42
17.7 Citotoxicidad de los nanoacarreadores PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap	42
17.7.1 Cambios en la morfología celular	42
17.7.2 Evaluación del impacto en la viabilidad celular	44
18. Diseño y caracterización de los nanoacarreadores funcionalizados para SNC	44
18.1 Características morfológicas de los sistemas funcionalizados	45
18.2 Propiedades fisicoquímicas de los sistemas funcionalizados	46
18.2.1 Análisis de tamaño y potencial Z de los sistemas funcionalizados	46
18.2.2 Análisis de infrarrojo para los sistemas funcionalizados	46
18.2.3 Análisis termogravimétrico de los nanoacarreadores funcionalizados	47
18.2.4. Propiedades térmicas de los nanoacarreadores funcionalizados	48
18.3 Estabilidad de los nanoacarreadores funcionalizados en dispersión	50
18.4. Perfil de liberación de los nanoacarreadores funcionalizados	50
18.4.1 Modelos matemáticos	51
19. Internalización de los nanoacarreadores funcionalizados	52
20. Citotoxicidad de los nanoacarreadores funcionalizados	52
20.1 Morfología celular	52
20.2 Efecto en la viabilidad celular después del tratamiento con nanoacarreadores funcionalizados	54
20.3 Efecto en apoptosis después del tratamiento con los nanoacarreadores funcionalizados	57

20.3.1 Activación de apoptosis de inicio temprano y tardío en células MIO-M1	57
20.3.2 Activación de la caspasa-3 y caspasa-9 después del tratamiento con los nanoacarreadores funcionalizados en las células MIO-M1	57
21. Validación del modelo celular inducible para SCA7	58
21.1 Determinación de la concentración óptima de doxiciclina para la inducción del modelo <i>in vitro</i>	58
21.2 Validación del modelo celular inducible	59
21.2.1 Apoptosis en modelo celular inducible	60
22. Eficiencia Terapéutica del nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188/Rap en el modelo celular inducible	60
22.1 Efecto del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap en el modelo celular inducible	60
22.1.1 Activación del sistema de autofagia a través de la administración de PLGA/PVA/Plx188/Rap	60
22.1.2 Eliminación de agregados proteicos	61
22.1.3 Recuperación de la forma activa de caspasa-9 después del tratamiento con el nanoacarreador	62
VIII. DISCUSIÓN	64
22. El reto de la elaboración de los nanoacarreadores	64
23. Un método de esterilización confiable	66
24. Estabilidad química de los componentes del nanosistema	68
25. Estabilidad del sistema y vida de anaquel	69
26. Liberación del fármaco	70
27. Un sistema nanoacarreador funcionalizado para la entrega farmacológica en el SNC	71
28. Internalización del sistema funcionalizado en SNC	74
29. Los sistemas nanoacarreadores mostraron una baja citotoxicidad	74
29.1 Efecto de los nanoacarreadores en la morfología de las células	74
29.2 Efecto de los nanoacarreadores sobre la viabilidad celular	75
29.3 Efecto de los nanoacarreadores sobre la apoptosis	75
30. Validación Terapéutica	76
30.1 Validación del modelo celular inducible MIO-M1	76
30.2 Efecto del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap en el modelo celular inducible	77
IX. CONCLUSIONES	78
X. PERSPECTIVAS	79
XI. REFERENCIAS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Características fisicoquímicas de la rapamicina.....	19
Tabla 2. Formulaciones obtenidas	28
Tabla 3. Caracterización de PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap antes y después de la esterilización.....	37
Tabla 4. Estabilidad en dispersión de PLGA/PVA.....	41
Tabla 5. Modelos matemáticos para la liberación de rapamicina a partir del nanoacarreador PLGA/PVA/Rap.....	42
Tabla 6. Caracterización física de los nanoacarreadores antes y después de la esterilización con radiación UV durante 2 h.....	46
Tabla 7. Estabilidad de los nanoacarreadores PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Plx188 almacenados a 4 °C y temperatura ambiente.....	50
Tabla 8. Ensayo de apoptosis con la marca anexina V y 7-AAD en células MIO-M1.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Regiones afectadas en la enfermedad de SCA7.....	4
Figura 2. Incidencia de SCA7 en el estado de Veracruz, México.....	5
Figura 3. Expansión de repetidos CAG.....	6
Figura 4. Mecanismo y expansión de los microsatélites.....	7
Figure 5. Composición estructural de <i>ATXN7</i>	8
Figura 6. Función de <i>ATXN7</i> wt y patogénica en el complejo SAGA a nivel de retina	10
Figura 7. Inmuntinción del corte de corteza cerebelar de ratón sano contra ratón afectado con SCA7.....	12
Figura 8. Eventos patológicos de ataxina-7 mutante y potenciales blancos terapéuticos	15
Figura 9. Rapamicina y su mecanismo de acción.....	18
Figura 10. Rutas de transporte de las moléculas hacia el SNC.....	23
Figura 11. Estructura de los surfactantes y su clasificación.....	24
Figura 12. Metodología experimental.....	27
Figura 13. Micrografías de PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap	36
Figura 14. Esterilización del nanoacarreador PLGA/PVA en estado sólido con luz UV a diferentes tiempos	37
Figura 15. Espectro infrarrojo de los excipientes, PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap.....	38
Figura 16. Termograma de los excipientes, PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap.....	39
Figura 17. Eventos térmicos de los excipientes, PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap.....	40
Figura 18. Perfil de liberación de PLGA/PVA/Rap.....	41
Figura 19. Internalización de PLGA/PVA/C6 en la línea celular MIO-M1.....	43
Figura 20. Morfología celular después del tratamiento con PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap	43
Figura 21. Viabilidad celular de MIO-M1 después del tratamiento con PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap	44
Figura 22. Morfología de nanoacarreadores funcionalizados	45
Figura 23. Espectro infrarrojo de los excipientes y los nanoacarreadores funcionalizados.....	47
Figura 24. Análisis termogravimétrico de los excipientes y los nanoacarreadores funcionalizados	48
Figura 25. Calorimetría diferencial de barrido de los excipientes y los nanoacarreadores funcionalizados	49
Figura 26. Perfil de liberación de los nanoacarreadores funcionalizados	51
Figura 27. Modelos matemáticos analizados para la liberación del fármaco a partir de los nanoacarreadores funcionalizados	52

Figura 28. Internalización <i>in vitro</i> de los nanoacarreadores funcionalizados después del tratamiento con 150 µg/mL durante 2.5 h.....	53
Figura 29. Morfología celular con tinción de F-actina después del tratamiento con los nanoacarreadores funcionalizados con y sin fármaco.....	55
Figura 30. Citotoxicidad de los nanoacarreadores funcionalizados a concentraciones terapéuticas y altas concentraciones.....	56
Figura 31. Caspasa-3 y caspasa-9 después del tratamiento con nanoacarreadores funcionalizados a concentración terapéutica y alta concentración en línea celular MIO-M1 durante 72 h.....	58
Figura 32. Curva de doxiciclina para la inducción del transgen <i>ATXN7</i>	59
Figura 33. Modelo celular inducible con la mutación <i>ATXN7-Q64</i> o <i>ATXN7-Q10</i>	59
Figura 34. Apoptosis en modelo celular inducible con la mutación <i>ATXN7-Q64</i> o <i>ATXN7-Q10</i>	60
Figura 35. Inducción de autofagia	61
Figura 36. Eliminación de agregados proteicos en modelo celular inducible con la mutación <i>ATXN7-Q64</i>	62
Figura 37. Tratamiento del modelo celular con el transgen <i>ATXN7-Q64</i>	63

GLOSARIO

ADCA	ataxias cerebelosas autosómicas dominantes
ASO	oligonucleótidos antisentido
BHE	barrera hematoencefálica
C6	Cumarina- 6
DL	carga del fármaco
DLS	dispersión dinámica de luz
DSC	calorimetría diferencial de barrido
DUB	desubiquitinación
EE	eficiencia de entrapamiento
FA	fase acuosa
FL-m <i>ATXN7</i>	proteína ataxina-7 mutante sin escindir
FO	fase orgánica
FTIR	infrarrojo por Transformada de Fourier
ERAD	degradación proteica asociada al retículo endoplásmico
HAT	acetilación de histonas
HSF-1	factor de choque térmico
HSE	elementos de choque térmico
INL	capa nuclear interna
IPOD	depósito de proteínas insolubles
JUNQ	compartimiento de control de calidad yuxtannuclear
m <i>ATXN7</i>	<i>ATXN7</i> mutante
MPS	sistema fagocítico mononuclear
MRE	expansión de repetidos de microsatélite
NES	señal de exporte nuclear
NII	inclusiones intranucleares neurales
NLS	señales de localización nuclear
nm	nanómetro
ONL	capa nuclear externa
pb	pares de bases
PC	células de Purkinje
PDI	índice de polidispersión
P-gp	glicoproteína P
PEG	polietilenglicol

PLGA	ácido poli-láctico-co-glicólico
PolyQ	enfermedades poliglutamínicas
Ps80	polisorbato 80
PVA	alcohol polivinílico
RE	retículo endoplásmico
RES	sistema retículo-endoplásmico
ROS	reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SCA	ataxia espinocerebelosa
SCA7	ataxia espinocerebelosa tipo 7
SEM	microscopio electrónico de barrido
SNC	Sistema Nervioso Central
TGA	análisis termogravimétrico
tr- <i>ATXN7</i>	<i>ATXN7</i> truncada
UPR	respuesta de proteínas mal plegadas
UPS	sistema ubiquitín-proteasoma
wt- <i>ATXN7</i>	proteína <i>ATXN7</i> silvestre

RESUMEN

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es una enfermedad neurodegenerativa con gran prevalencia en México, la cual es originada por la expansión anormal de un trinucleótido repetido (CAG) situado en la región codificadora del gen *ATXN7*. La base molecular de esta patología es el plegamiento anormal y agregación de la proteína mutante, lo que ocasiona muerte neuronal en regiones específicas del sistema nervioso central.

Se ha demostrado que la rapamicina ayuda a disminuir los efectos tóxicos de la proteína mutada causante de SCA7 en modelos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, el tratamiento de SCA7 está limitado porque la barrera hematoencefálica impide el paso de los potenciales medicamentos, afectando y/o limitando su eficacia terapéutica. Ante dicha limitante, el surgimiento de herramientas como los nanoacarreadores han permitido que las moléculas terapéuticas logren llegar al cerebro, donde llevan a cabo su actividad.

En este estudio reportamos la generación y caracterización de 3 sistemas nanoacarreadores poliméricos a base de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), que transportan a la rapamicina (agente que induce la degradación de agregados proteicos). Demostramos que éstos nanoacarreadores poseen propiedades fisicoquímicas y biológicas relevantes para su uso terapéutico.

Además, la formulación PLGA/Plx188/Rap fue probada en un modelo celular glial de SCA7, causando de manera específica la activación de autofagia y la eliminación de agregados patológicos de la proteína mutante, lo que nos permitirá en un futuro la evaluación de esta potencial terapia en un modelo murino de la SCA7.

I. INTRODUCCIÓN

La ataxia es un síndrome clínico caracterizado por la presencia de incoordinación nervioso-muscular que se manifiesta como dificultad para mantener el equilibrio e incapacidad para la realización de movimientos finos. Los pacientes con este padecimiento presentan temblores, movimientos involuntarios y dificultad en el habla y deglución. Las ataxias son causadas por la disfunción y/o atrofia del cerebelo y sus rutas de conexión, cuyo origen es variado y pueden originarse por factores extrínsecos como consumo crónico de alcohol, hemosiderosis, deficiencia de vitamina B12, enfermedades neurodegenerativas como Creutzfeldt Jakob o atrofia de sistemas múltiples y principalmente, por una condición hereditaria [1].

Las ataxias cerebelosas de origen genético son consideradas las de mayor importancia, ya que forman parte del grupo de enfermedades neurodegenerativas más comunes a nivel mundial, junto con la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, entre otras.

Las ataxias cerebelosas hereditarias son un grupo de enfermedades clínica, patológica y etiológicamente heterogéneas que se caracterizan por presentar ataxia progresiva, además de neuropatía periférica, síntomas extrapiramidales y piramidales, convulsiones, entre otros [1]. Las ataxias se clasifican por sus patrones de herencia en las siguientes categorías: autosómica-dominante, autosómica-recesiva, ligadas al cromosoma X y mitocondriales. En cuanto a las ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCA; por sus siglas en inglés), son frecuentemente conocidas como ataxias espinocerebelosas (SCA, por sus siglas en inglés) e incluyen alrededor de 45 tipos identificados a la fecha [2,3]. Estas a su vez se subdividen en 4 grupos de acuerdo con el mecanismo genético de la mutación: enfermedades poliglutamínicas (polyQ), enfermedades intrónicas, mutaciones convencionales y SCA con duplicaciones o deleciones largas [1].

A nivel mundial, las SCAs de mayor frecuencia son las ataxias del grupo polyQ como la SCA3 (enfermedad de Joseph Machado), que representa el 21% de todas las ataxias autosómicas dominantes, seguido por la SCA2 y la SCA6 con el 15% cada una, la SCA1 con el 6% y la SCA7 con el 5% [4]. Sin embargo, en cada región geográfica se presentan variaciones en su frecuencia, así como en su origen poblacional, por ende, es indispensable conocer el comportamiento de cada ataxia en las diversas regiones del mundo [2].

En este trabajo nos enfocamos en la ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) ya que, en nuestro entorno, su estudio es de vital importancia debido a su alta frecuencia en México [5]. Utilizando la nanotecnología, sintetizamos un nanoacarreador polimérico para encapsular la rapamicina, un fármaco que incrementa el sistema de autofagia. Dicho nanoacarreador fue caracterizado fisicoquímicamente y probado en un modelo celular inducible que reproduce la formación de agregados de ataxina-7, principal causa patogénica de la SCA7. El nanoacarreador con la rapamicina no provocó citotoxicidad a las concentraciones terapéuticas y logró eliminar los agregados proteicos de la ataxina-7 mutada después de 72 h de tratamiento en el modelo celular inducible.

II. MARCO TEÓRICO

1. Ataxia espinocerebelosa tipo 7

1.1 Características Clínicas

La SCA7 es una enfermedad neurodegenerativa que fue descrita por primera vez por Fromenten en 1937 y su etiología se conoció 60 años después. Los síntomas que presentan los pacientes con SCA7 son ataxia progresiva y degeneración retinal. Además, pueden presentar disartria, dismetría, disfagia, disdiadococinesia, hiperreflexia, movimiento sacádico lento de ojos y espasticidad. En algunos casos hay otras manifestaciones menos comunes como alteración sensorial, demencia e hipoacusia [6]. Esta ataxia es de gran importancia debido a sus altos índices de discapacidad motora, además de la discapacidad visual que presentan los pacientes con la patología.

Recientemente, se han caracterizado dos fenotipos patológicos en SCA7 con respecto a la edad de aparición [7]. El primero y más común es el fenotipo de inicio tardío o de edad adulta, el cual se caracteriza por la aparición de los primeros síntomas a partir de la tercera década de la vida, presentando ataxia cerebelosa seguido por dismetría, disartria, disfagia, hiperreflexia y disdiadococinesia acompañado de otros signos piramidales y extrapiramidales. Después del inicio de los síntomas motores, hay afectación en la distinción de colores seguido por pérdida de agudeza visual, fotofobia, cambios pigmentarios, oftalmoplejía y degeneración de conos y bastones que eventualmente conlleva a la ceguera [7,8]. Se han reportado casos aislados de psicosis, alucinaciones auditivas, demencia y alteraciones del comportamiento [12].

El segundo fenotipo de SCA7 es de inicio temprano (infantil o juvenil), el cual se presenta dentro de las dos primeras décadas de la vida. En este caso, el curso de la enfermedad es rápido y tiene una duración de pocos meses o años. Además de los signos clásicos característicos de ataxia, hay pérdida visual desde el inicio de la enfermedad, desnutrición debido a la disfagia severa, hipotonía severa, temblores en las extremidades y dificultad respiratoria [7,9,10]. Adicionalmente, se han reportado casos de cardiopatía, hepatomegalia, hemangioma múltiple, retraso del desarrollo, regresión motora y cognitiva, disfunción renal, taquipnea, microcefalia e insomnio [11,12].

1.2 Neuropatología

Los hallazgos neuropatológicos indican que hay una reducción significativa de materia gris en regiones como el giro pre y post-central, parahipocampal y corteza occipital. Además, hay una atrofia en la corteza cerebelosa, tractos espinocerebelosos y tractos olivocerebelosos, así como una degeneración en los núcleos subtalámicos, pálido, sustancia nigra y columnas dorsales [6,13].

Estudios en pacientes con resonancia magnética demostraron que hay una pérdida en el volumen cerebelar, una prominencia de fisuras cerebelosas, una leve pérdida de volumen en el tronco encefálico y núcleo pontino, así como una reducción en el volumen de la oliva inferior y alargamiento leve en el cuarto ventrículo [6].

Por otro lado, en la materia gris hay mayores alteraciones en el cerebelo, cambios en el giro precentral y cortezas occipitales. Además, hay cambios volumétricos en la corteza frontal, corteza parietal y clastrum [13]. En la materia blanca hay una pérdida de fibras

mielinizadas en cerebelo, cuerpo caloso, cápsula de núcleo rojo, nervio oculomotor, lemnisco lateral, en los tractos espinocerebelosos y piramidales, en el nervio abducens (motor ocular externo) y en las fibras pontocerebelosas, entre otras regiones, lo que ocasiona que haya un daño cerebral más extendido [13].

A nivel microscópico, se caracteriza patológicamente por muerte progresiva de neuronas cerebelosas, de retina y tronco encefálico. En la [Figura 1B](#) se aprecia un corte de corteza cerebelosa de un paciente con SCA7, observándose una pérdida neuronal y gliosis en la capa de las células de Purkinje (PC) en comparación con un individuo sano ([Figura 1A](#)) [14].

En el tronco encefálico hay una degeneración moderada en la oliva inferior, puente de Varolio y en la región cervical de la médula espinal [13]. En la [Figura 1D](#), la resonancia magnética muestra una atrofia severa en cerebelo y en el puente de Varolio, en comparación con el individuo sano ([Figura 1C](#)) [15]. Por otro lado, en la [Figura 1F](#) se observa una degeneración leve en la oliva inferior [16].

De manera relevante, en la retina ocurre una atrofia progresiva de las células fotorreceptoras que resultan en degeneración macular en etapas avanzadas [13]. También hay degeneración macular pigmentaria y palidez del disco óptico en pacientes con SCA7 [17,18]. La agudeza visual se ve comprometida en las etapas iniciales y progresa gradualmente hacia ceguera. En la [Figura 1G](#), la fundoscopia de una persona sana muestra una apariencia normal de la mácula (flecha negra) y del disco óptico (flecha blanca) y con una vasculatura bien desarrollada. En el caso del paciente con SCA7 ([Figura 1H](#)), hay una atrofia macular, el disco óptico presenta una palidez importante y la vasculatura es muy pobre [15]. Además, en la [Figura 1I](#) se muestra un corte de retina de una persona sana con las capas retinales bien organizadas, en cambio en la [Figura 1J](#), el corte de retina de un individuo con SCA7 muestra una degeneración extensa de la capa de fotorreceptores y la capa nuclear externa (ONL), hay una desorganización de la capa nuclear interna (INL) y hay migración del pigmento de melanina dentro de la retina atrófica [15].

En otros hallazgos, los pacientes con SCA7 pueden presentar hiposmia, es decir un decremento significativo en la habilidad para discriminar e identificar olores [19] posiblemente debido a cambios en la conectividad funcional ligada a las áreas cerebrales degeneradas [20].

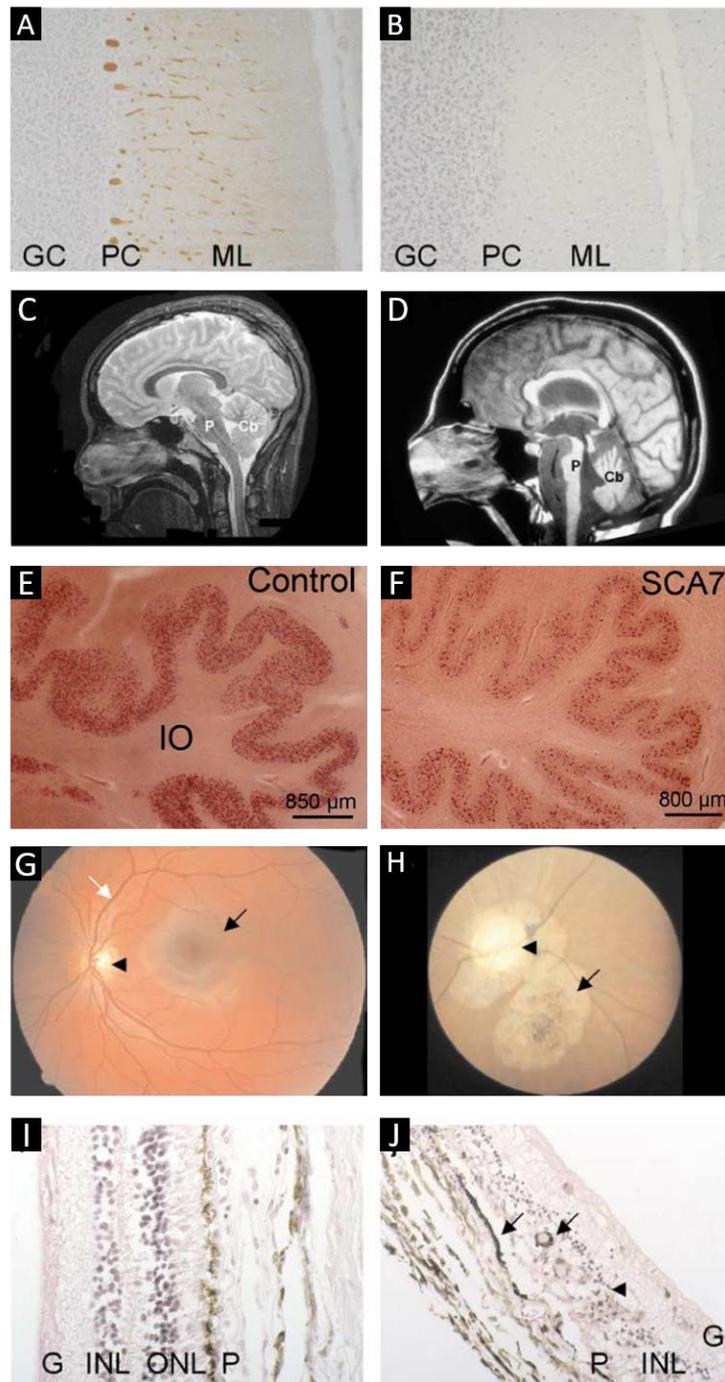


Figura 1. Regiones afectadas en la enfermedad de SCA7. **(A)** Cerebelo sano con la proteína calbindina teñida, mostrando la presencia normal de las células de Purkinje (GC = capa granular; PC = capa de células de Purkinje; ML = capa molecular); **(B)** Cerebelo de paciente con SCA7 con ausencia de las PC; **(C)** Resonancia magnética de individuo sano; **(D)** Resonancia magnética de paciente con SCA7 mostrando atrofia severa en el cerebelo (Cb) y en el puente de Varolio (P); **(E)** Tinción de oliva inferior (IO) de individuo sano; **(F)** Tinción de oliva inferior con degeneración leve en paciente con SCA7; **(G)** Fondoscopia de individuo sano; **(H)** Fondoscopia de paciente con SCA7 con atrofia macular y vasculatura pobre; **(I)** Corte de retina de individuo sano con las capas retinales bien definidas (G = células ganglionares; INL = capa nuclear interna; ONL = capa nuclear externa; P = capa de fotorreceptores); **(J)** Corte de retina de paciente con SCA7 con degeneración retinal.

Imágenes (A, B, C, D, G, H, I, J) tomadas del artículo de Michalik, A., et al, titulado Spinocerebellar Ataxia Type 7 Associated with Pigmentary Retinal Dystrophy, publicado en la revista European Journal of Human Genetics en el año 2004 [15].

Imágenes (E, F) tomadas del artículo de Rüb, U., et al, titulado Clinical Features, Neurogenetics and Neuropathology of the Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias Type 1, 2, 3, 6 and 7, publicado en la revista Progress in Neurobiology en el año 2013 [16].

2. Prevalencia en México y en el mundo

La incidencia mundial de SCA7 es de $<1/100,000$ habitantes [12] sin embargo, su fenotipo se confunde con el de muchas otras SCAs y su diagnóstico sólo se obtiene mediante un estudio molecular. Actualmente puede considerarse como una patología subdiagnosticada. Se han identificado regiones geográficas y grupos poblacionales en donde se concentra un mayor número de casos como en Europa (Francia, Bélgica, Alemania y Reino Unido), África (Argelia, Marruecos, Libia, Túnez, Zambia y Sudáfrica), Asia y Oceanía (Israel, Filipinas, Corea del Sur y Australia), Norteamérica (Estados Unidos y México), Sudamérica (Brasil) y el Caribe (Jamaica) [21]. No obstante, solo se han reportado efectos fundadores de SCA7 en algunos países como India [22], en la región escandinava específicamente en Suecia y Finlandia [23], Sudáfrica [24], Zambia [25] y particularmente en México [26].

En nuestro país, debido al efecto fundador, Magaña y col. reportaron en el 2014 que SCA7 es la SCA más frecuente en el estado de Veracruz, registrando una prevalencia de $10.63/100,000$ habitantes y de manera alarmante, la incidencia por región incrementó considerablemente en algunas comunidades, como la población de Tlaltetela, donde la incidencia se calculó en $817.14/100,000$ habitantes en el 2014 [5] (Figura 2), superando por mucho la prevalencia reportada en otras regiones del mundo. De acuerdo con un consenso mundial, se define que la serie de casos más grande de SCA7 a nivel mundial se presenta en nuestro país [21,27].



Figura 2. Incidencia de SCA7 en el estado de Veracruz, México. Mapa del estado de Veracruz donde se indica la incidencia de SCA7 en cada comunidad estudiada y reportada al año 2014.

Imagen tomada del artículo de Magaña et al, titulado Analysis of CAG Repeats in Five SCA Loci in Mexican Population: Epidemiological Evidence of a SCA7 Founder Effect, publicado en la revista Clinical Genetics en el año 2014 [28].

3. Origen genético de la SCA7: Mutación en el gen *ATXN7*

El gen mutado en SCA7, *ATXN7*, se localiza en el brazo corto del cromosoma 3p12-21.1 [29]. En la década de los 90's se demostró que la expansión anormal de repetidos Citosina-Adenina-Guanina (CAG), por encima de los 36 repetidos, ubicados en el exón codificante del gen *ATXN7* (exón 3) [30,31], son responsables del desarrollo de SCA7 (Figura 3) [14,31]. Este microsatélite es polimórfico en la población general con un rango normal que va de 4 a 19 CAG's, siendo más común el alelo con 10 repetidos en el 75% de la población [32]. Los alelos de 28-33 CAG's (previamente llamados "alelos intermedios") son inestables y tienen riesgo de expansión durante la meiosis y, por lo tanto, puede ocurrir la aparición de SCA7 en la subsecuente generación [33]. Por otro lado, con los alelos de 34-36 CAG's (alelos de baja penetrancia), los individuos pueden presentar manifestaciones leves de la enfermedad en etapas tardías de la vida [34]. Por lo tanto, el fenotipo mutante está en función del número de repetidos CAG, el cual será diferente en la descendencia del afectado, tendiendo este número a aumentar. Se han reportado expansiones de hasta 460 repetidos presentando la patología desde el nacimiento. [35].

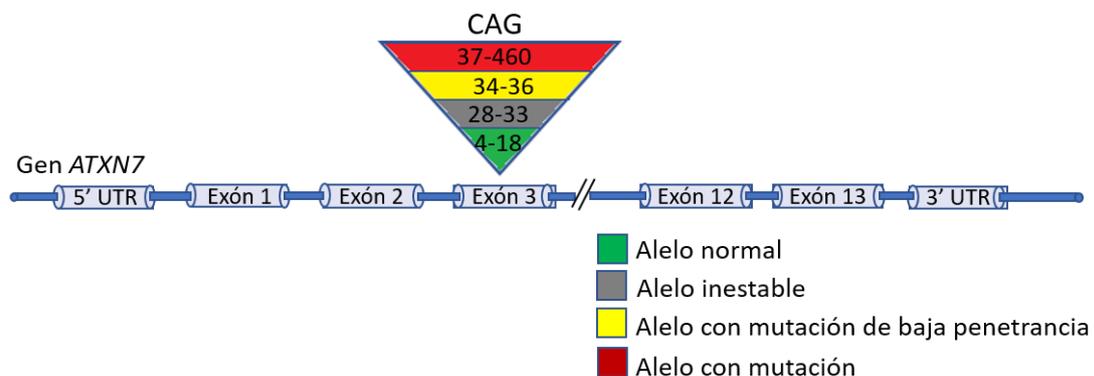


Figura 3. Expansión de repetidos CAG. Representación del gen *ATXN7* y el trinucleótido CAG con el número de repetidos y su localización.

El origen de la expansión no está bien esclarecido, pero se sabe que las alteraciones en los mecanismos de reparación, recombinación y replicación [36,37] tienden a formar estructuras heterodúplex o estructuras secundarias de DNA (Figura 4A), a lo cual le sigue la desnaturalización de dicha estructura y la resolución del heterodúplex (Figura 4B) [36,38]. Estas expansiones anormales pueden impactar a diversos genes y ser asociados a múltiples enfermedades. Además, las expansiones no son exclusivas de regiones codificantes, ya que pueden presentarse en regiones reguladoras como promotores, intrones y regiones no traducidas 3' (3'UTR) y 5' (5'UTR). Sin embargo, en SCA7 la mutación impacta directamente en la región codificante, generando la traducción de proteína con un tracto rico en glutaminas (PolyQ).

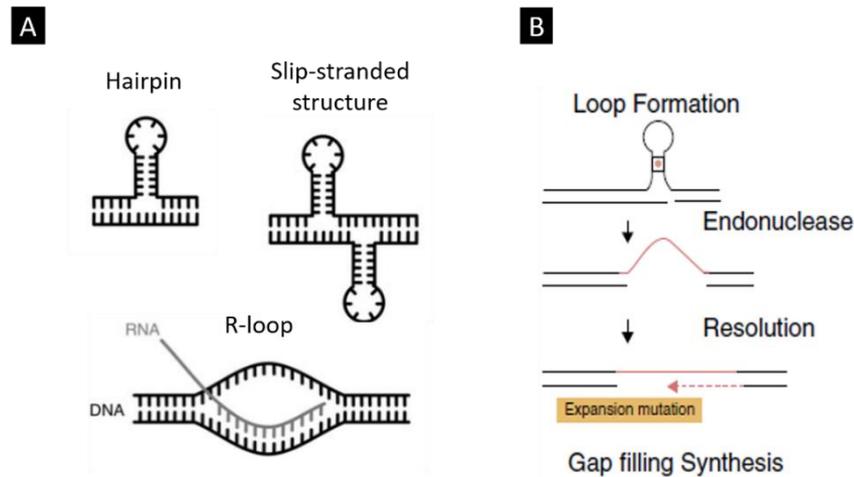


Figura 4. Mecanismo y expansión de los microsatélites. (A) Estructuras heterodúplex en el material genético, con las cuales posiblemente inicia la expansión; (B) Pasos de la expansión de repetidos empezando por la desnaturalización de la estructura y resolución del heterodúplex mediante el llenado de gaps en la secuencia de ADN.

3.1 Anticipación genética

A diferencia de las mutaciones estáticas, las cuales se retienen en tejidos somáticos y son transmitidas de manera estable a su descendencia, el proceso de mutación de repetidos es dinámico; los repetidos CAG muestran inestabilidad en la línea somática y germinal y tienen una fuerte tendencia hacia la mutación, por lo que continúan expandiéndose en las generaciones sucesivas [38,40], lo que provoca la aparición del fenómeno “anticipación genética”. En este fenómeno, la severidad y la edad de inicio de la enfermedad están inversamente relacionadas; además, la enfermedad es más severa de una generación a otra.

En SCA7, el fenómeno de anticipación se ve incrementado por la ausencia en general de interrupciones entre los repetidos CAG, cuya ausencia no puede ayudar a “estabilizar” la expansión. Dicho lo anterior, es común ver en SCA7 expansiones del orden de más de 100 repetidos de una generación a otra, aumentando dramáticamente la edad de inicio (aproximadamente 19 ± 13 años por generación) y severidad de la patología [41]. En este sentido, Ansorge y col. reportaron en el 2004 un caso de un padre con 39 repetidos CAG en el gen *ATXN7* y en su hija hubo una expansión que llegó a 180 repetidos CAG, lo cual ocasionó que la paciente padeciera SCA7 con inicio infantil [42].

Además, la inestabilidad gonadal es particularmente mayor cuando la mutación es de transmisión paterna [43]. La evidencia clínica de que la transmisión paterna resulta en una expansión mayor está apoyada por la evidencia molecular de la presencia de mosaicismo en los gametos en los hombres [37].

4. Tratamiento

Actualmente SCA7 no tiene tratamiento para evitar la aparición de la enfermedad ni para detener o curar los síntomas que se presentan. El tratamiento farmacológico para SCA7 se ha realizado en pequeñas muestras de pacientes que presentan alta variabilidad tanto en el estadio clínico como en el número de repetidos de CAG, lo que dificulta la

interpretación de los resultados. A la fecha, se han implementado algunos tratamientos que han demostrado cierto efecto en otras enfermedades polyQ, pero dirigidos básicamente al control de la sintomatología como los dopaminérgicos y anticolinérgicos, que logran la reducción del temblor, distonía y bradicinesia; las contracciones musculares dolorosas pueden aliviarse con magnesio, quinina, mexiletina o con altas dosis de vitamina B [44]. De manera paliativa se han utilizado algunos antioxidantes, sin embargo, el tratamiento farmacológico solo ayuda a disminuir algunos signos de la enfermedad, por lo que no ha sido eficiente en el tratamiento de los pacientes con SCA7.

Por otro lado, la rehabilitación física ha mostrado resultados positivos para ayudar a mantener cierta movilidad e independencia [45]. Además, de manera interesante, en el mismo estudio se demostró el beneficio del entrenamiento físico a nivel molecular, ya que se registró una disminución en los niveles de los marcadores de daño lipídico, MDA (malondialdehído) y LPH (lipohidroperóxidos), en un 70 % y 47 %, respectivamente, además de un ligero incremento en la defensa antioxidante en PON-1 (paraoxonasa-1) [45]. Sin embargo, a pesar de lo anterior reportado, dicha rehabilitación ayuda muy poco en cuanto a la progresión de los efectos motores de la enfermedad.

Por lo tanto, es importante aclarar que el objetivo principal sigue siendo lograr un tratamiento realmente eficaz que ayude a disminuir y/o tratar la enfermedad. Para lograr dicho objetivo, primero necesitamos saber cómo funcionan normalmente algunos mecanismos que están involucrados en la patogénesis de la enfermedad.

5. Bases Moleculares: Ataxina-7

El gen *ATXN7* codifica para una proteína de 892 aminoácidos conocida como ataxina-7. Esta proteína cuenta con una señal de exporte nuclear (NES), 3 señales de localización nuclear (NLS), 2 sitios de corte de caspasas, sitios para modificación post-traducciona l vía fosforilación y SUMOilación y un tracto polyQ ubicado en la región N-terminal (Figura 5) [46].

Ataxina-7 es una proteína ubicua, pero es más abundante en el cerebro, retina y algunos tejidos periféricos como el músculo estriado, testículos y glándula tiroides. Su presencia predomina en el citoplasma donde colocaliza con el RE, pero no con la mitocondria ni el aparato de Golgi. A nivel de mRNA está altamente expresada en tejidos del Sistema Nervioso Central (SNC) [47,48].

Recientemente, se han identificado al menos un par de variantes originadas por procesamiento alternativo, sin embargo, son poco abundantes en comparación a la isoforma canónica [48].



Figura 5. Composición estructural de *ATXN7*. Isoforma correspondiente a un alelo con 10 CAG cuenta con 892 aa. Incluye la región polimórfica polyQ, 1 NES, 3 NLS y un sitio en lisina 257 para modificaciones post-traduccionales (acetilación y SUMOilación), 3 dominios conservados: un motivo de dedos de zinc (ZnF), un motivo Cys-X9-10-Cys-X5-cys-X2-His conocido como dominio *ATXN7* y un dominio conservado.

5.1 Función de ataxina-7

A la fecha, la función de ataxina-7 no está bien esclarecida, sin embargo, se observó que tiene un papel en la estabilización del citoesqueleto, la cual fue demostrada en un modelo *in vitro*. Brevemente, estructuras filamentosas formadas por ataxina-7 durante la mitosis se superponen con el huso y éste es el resultado de la interacción física entre ataxina-7 y α -tubulina, la cual ocurre independientemente de la longitud de repetidos. La sensibilidad reducida de las células transfectadas con ataxina-7 debido al nocodazol, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos, sirvió como apoyo del papel de la ataxina-7 en la estabilización de los microtúbulos [49].

También se sabe que la ataxina-7 forma parte como subunidad de dos complejos regulatorios transcripcionales, el complejo TATA-binding protein-free TAF-containing complex (TFTC) y del complejo acetiltransferasa SPT3/TAF9/GCN5 (STAGA), los cuales suman las funciones de coactivador transcripcional como: reclutamiento de proteína de unión a TATA, formación del complejo de pre-iniciación y 2 actividades enzimáticas (acetilación de histonas (HAT) y desubiquitinación (DUB)), dándole a la ataxina-7 la capacidad de regular la transcripción. Ambos complejos tienen varios componentes proteicos incluyendo el sustituyente catalítico Gcn5 con actividad de HAT, con el cual se regula la transcripción gracias a la acetilación de la histona H3 y, en consecuencia, promueve el acceso a la secuencia asociada al ADN mediante la maquinaria de transcripción [50–52] (Figura 6A).

La función de STAGA en la retina es considerada como el mecanismo mejor estudiado, ya que se sabe que este complejo interactúa con el factor de transcripción CRX, el cual es un factor de transcripción nuclear que juega un papel esencial en la diferenciación de los fotorreceptores de vertebrados. Este factor controla una red transcripcional, incluyendo numerosos genes específicos de fotorreceptores como rodopsinas y las opsinas del color mediante la acetilación de la histona H3, dando como resultado la transcripción de genes retinales importantes para la función y mantenimiento de los fotorreceptores (Figura 6B) [50,53,54].

5.2. Patogénesis molecular

A pesar de que la ataxina-7 se expresa de forma ubicua, la región más afectada por la mutación es el cerebro, posiblemente por su alta demanda energética y mayores niveles de expresión. Esto hace que las células neuronales dependan del metabolismo energético oxidativo por su incapacidad de producir ATP mediante glicólisis y, por lo tanto, dependen de una mitocondria funcional para la fosforilación oxidativa, lo que provoca que las mitocondrias disfuncionales sean un mecanismo compartido en la neurodegeneración [55].

5.2.1 Ataxina-7 mutada y su efecto en la retina

Cuando la proteína ataxina-7 tiene 37 repetidos o más del aminoácido “glutamina” en el extremo N-terminal, intrínsecamente es propensa a formar agregados con estructura β -plegada, con lo cual altera su conformación tridimensional y resulta en una combinación

de pérdida de función y posible ganancia de función patogénica, afectando la función del complejo STAGA [56].

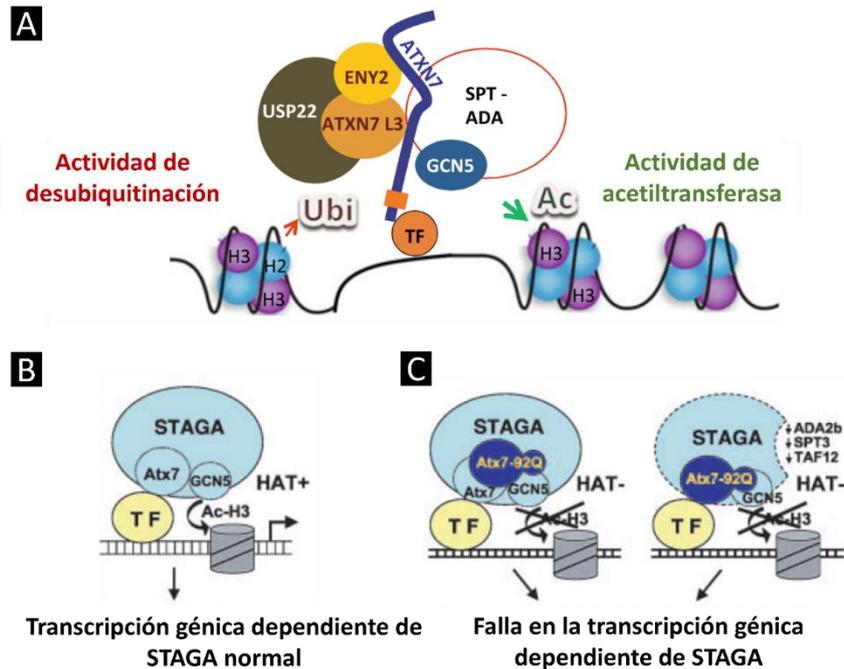


Figura 6. Función de *ATXN7* wt y patogénica en el complejo SAGA a nivel de retina. (A) *ATXN7* pertenece al módulo de desubiquitinación (DUBm) que incluye la proteasa de ubiquitina USP22, *ATXN7* L3 y ENY2. DUBm media la interacción con GCN5 y el complejo SAGA (SPT-ADA). *ATXN7* puede interactuar con factores de transcripción como CRX. El complejo SAGA cuenta con actividad de acetilación de la histona H3 dependiente de GCN5 y actividad de desubiquitinación en H2B dependiente de USP22; (B) Función del complejo STAGA en la retina. La proteína ataxina-7 forma parte del complejo STAGA e interactúa con la subunidad GCN5, así que facilita el reclutamiento de STAGA y la acetilación de la histona H3 mediada por GCN5 a través de interacciones con un promotor unido a un factor de transcripción como CRX; (C) Transcripción génica dependiente de STAGA en la mutación de ataxina-7. La presencia de la proteína ataxina-7 mutante tiene un efecto dominante negativo, en el cual provoca la inhibición de la función GCN5 (acetilación de histonas) dentro del promotor STAGA, de las interacciones con la ataxina-7 wt ubicada dentro del complejo STAGA, o de la incorporación dentro de STAGA en el lugar de ataxina-7 wt, resultando en la incorporación reducida de ADA2b, SPT3 y TAF12.

Imágenes (B y C) tomadas del artículo de Palhan, V.B. et al, titulado Polyglutamine-Expanded Ataxin-7 Inhibits STAGA Histone Acetyltransferase Activity to Produce Retinal Degeneration, publicado en la revista Proceedings of the National Academy of Sciences en el año 2005 [58].

En estudios *in vitro* y en un modelo *in vivo* en ratón con SCA7 con 92 repeticiones se demostró que el transcrito de *ATXN7* mutante (*mATXN7*) interrumpe la función de STAGA y TFRC posiblemente reduciendo o inhibiendo la actividad de HAT. Además, la interacción de *ATXN7* y el factor de transcripción CRX está reducida ante la presencia de *mATXN7*, resultando en una disminución en la transcripción de los genes retinales necesarios para la función y mantenimiento de los fotorreceptores, lo cual podría explicar la muerte de conos y bastones en la retina y así provocar la degeneración retinal (Figura 6C) [58,59]. Además, Palhan y col. observaron en el modelo de ratón una reducción significativa en la expresión de 3 actividades específicas de fotorreceptores: CRX, NRL (basic motif leucine zipper transcriptional activator) y Nr2E3 (orphan nuclear receptor),

sugiriendo que los fotorreceptores en los ratones pueden perder su habilidad para mantener un estado diferenciado con el tiempo, resultando finalmente en disfunción [58].

5.2.2 Mutación en ataxina-7 y su efecto en la formación de agregados proteicos

Se ha descrito que ataxina-7 tiene un sitio de corte para caspasa-7, por lo que la proteína puede ser escindida, formando agregados proteicos de la proteína truncada (tr-mATXN7), los cuales son posiblemente más tóxicos que los agregados proteicos de la proteína mutante sin escindir (FL-mATXN7) [46,60].

Cuando las estructuras aberrantes tipo β -plegada se acumulan para formar agregados insolubles o inclusiones nucleares, no sólo afecta su función normal, sino que el mismo agregado es capaz de secuestrar otras moléculas. En modelos celulares de SCA7 en las líneas celulares HEK293 y SH-SY5Y, se observó que hubo formación de inclusiones intranucleares neurales (NII), las cuales contenían reclutadas a las proteínas CBP, p53, ubiquitinas, ataxina-3, Hsp70, Hsp40, ataxina-7, subunidades de UPS, caspasa-3 y wt-ataxina-7 [61,62]. Además, caspasa-3 fue reclutada en las inclusiones en cultivo celular y en cerebro post-mortem de humano y su expresión fue sobre regulada en neuronas corticales [55,61].

Garden y col., en el 2002, utilizaron un modelo murino transgénico con 92 repetidos de glutamina (92Q) para reproducir los signos de la enfermedad de SCA7, el cual presentó ataxia en la marcha. En la [Figura 7](#) se muestra una inmunotinción de un corte de corteza cerebelar de un ratón sano ([Figura 7A](#)) con una organización de las 3 capas cerebelares y una gran arborización dendrítica, mientras que en la [Figura 7B](#) se muestra una disminución de la arborización dendrítica y cambios ultraestructurales de las células de Purkinje, lo cual es indicativo de degeneración [56]. Además, en la [Figura 7B](#) se observan agregados proteicos, los cuales están teñidos de color magenta, tanto en la capa molecular como en la capa ganglionar del cerebelo. Las células de Purkinje no presentan agregados proteicos, sin embargo, estas células son severamente afectadas por la mutación, posiblemente debido a un efecto de naturaleza autónoma independiente de la célula debido a la disfunción inducida por las poliglutaminas en células adyacentes [63].

Por ende, esta evidencia nos lleva a pensar que los agregados tienen la capacidad de activar muerte celular programada, lo que lleva a la neurodegeneración y posiblemente sea el mecanismo de mayor importancia en la degeneración de las diversas regiones cerebrales.

5.2.3 Mutación en ataxina-7 y su efecto a nivel post-traducciona

Las modificaciones post-traduccionales en residuos específicos de las proteínas con polyQ expandida como fosforilación, SUMOilación y acetilación podrían alterar las interacciones con las proteínas de unión normal. Además, estos mecanismos post-traduccionales también pueden influenciar la estabilidad y tasa de disminución de la proteína mutante, por lo que pueden regular la acumulación y toxicidad de la proteína mutante. Por ejemplo, la acetilación de la lisina 257 (K257) regula la escisión de ataxina-7 mediada por caspasa-7 de manera dependiente a la expansión de repetidos. Dicha escisión proteolítica en los aminoácidos 266 y 344 ocasiona mayor toxicidad por la generación de un fragmento que contiene la región polyQ expandida, el cual es más

susceptible a agregarse y causar más toxicidad en la célula [40,46,55]. Por otro lado, se descubrió que la SUMOilación influencia la patogénesis de SCA7 de manera positiva, ya que se cree que la SUMOilación en K257 disminuye la propensión de agregación y toxicidad celular de la proteína mutante [64].

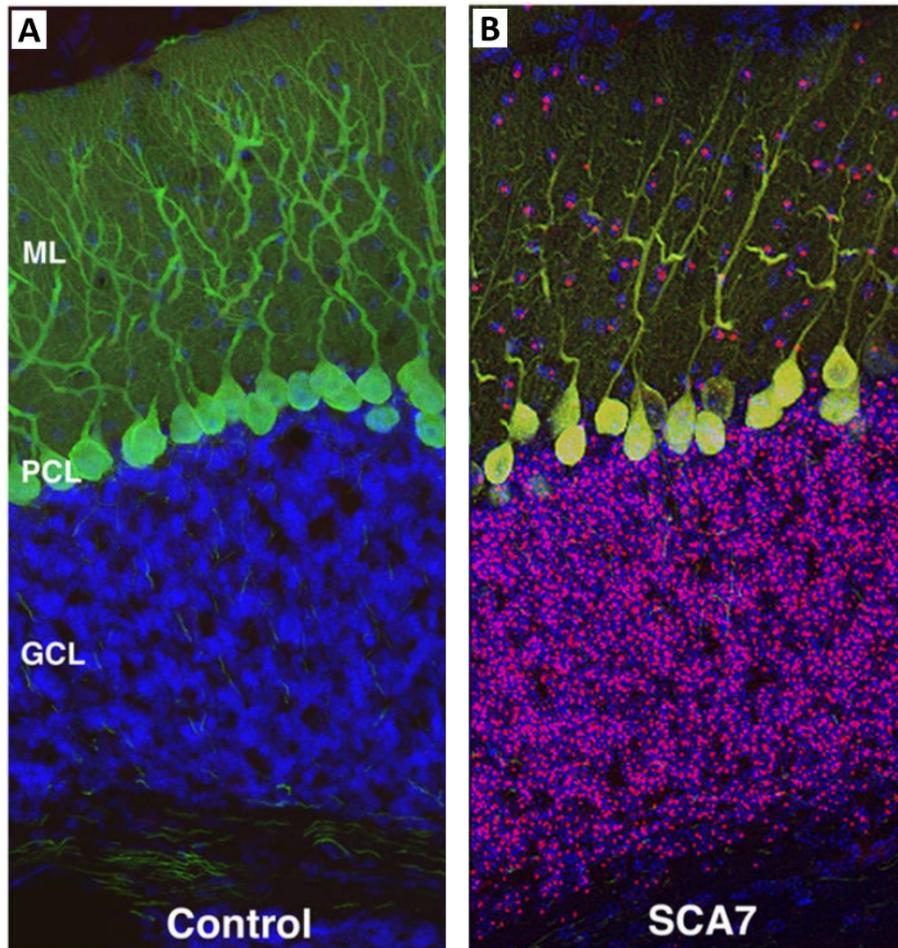


Figura 7. Inmunotinción del corte de corteza cerebelar de ratón sano contra ratón afectado con SCA7. (A) En el corte de corteza cerebelar de ratón se observan las 3 capas cerebelares sanas; (B) Cerebelo de un ratón transgénico con 92Q en *ATXN7*, en donde la capa molecular tiene una disminución en la arborización dendrítica indicando degeneración (verde), mientras que la capa de células de Purkinje presenta muerte celular. La capa molecular y la capa granular presentan agregados proteicos de ataxina-7 (rosa). (ML = capa molecular; PCL = capa de las células de Purkinje; GCL = capa granular).

Imágenes tomadas del artículo de Garden, G. et al, titulado Molecular Pathogenesis and Cellular Pathology of Spinocerebellar Ataxia Type 7, publicado en la revista *Cerebellum* en el año 2008 [56].

5.2.4 Mutación en ataxina-7 y su efecto a nivel de UPS y autofagia

Existen varios estudios que han sugerido a la autofagia como uno de los factores más importantes en el aclaramiento de los agregados proteicos, por lo tanto, su mal funcionamiento estaría relacionado con neurodegeneración. En un modelo *in vitro*, Mookerjee y col, bloquearon el sistema de autofagia y en consecuencia hubo un incremento en la acumulación de ataxina-7 mutante [46]. Por otro lado, en un modelo murino KI con *mAtxn7-92Q* se observó un incremento en estructuras que dieron positivo para la cadena ligera 3 de proteína asociada a microtúbulos (LC3), marcador específico

para monitorear la autofagia, en las células de Purkinje, indicando que el sistema de autofagia se incrementó ante la presencia de la proteína mutante [46]. Esto sugiere que la actividad autofágica basal previene la acumulación de proteína aberrante.

En otro modelo murino heterocigoto KI con *mAtxn7-266Q*, las inclusiones de ataxina-7 mutada que se acumularon contenían proteínas asociadas a autofagia como mTOR, beclina-1, p62 y ubiquitina. Además, se observó acumulación atípica de los marcadores de autofagosoma/lisosoma LC3, LAMP-1, LAMP-2 y catepsina-D en el cerebelo del ratón, lo cual podría explicar la incapacidad en el aclaramiento proteico por parte del sistema de autofagia debido al secuestro de componentes necesarios para su realización, trayendo como consecuencia neurodegeneración [65]. En pacientes con SCA7 también se acumularon marcadores de autofagia en el cerebelo y corteza cerebelar, lo que sugiere que la autofagia podría estar alterada por acumulación selectiva de ataxina-7 mutante [65].

Por otro lado, en el modelo murino KI con *mAtxn7-266Q* se estimuló el aclaramiento de la ataxina-7 mutante por medio del sistema ubiquitín proteasoma (UPS) al usar el tratamiento de interferón- β para estimular a los clastosomas en las subunidades del proteosoma. Dicho tratamiento redujo las inclusiones intranucleares neuronales y la ataxina-7 mutante insoluble ubicadas en el cerebelo del ratón, beneficiándolo en su comportamiento locomotor y proveyendo protección a las células de Purkinje contra la muerte neuronal [66,67].

Por lo tanto, la formación de agregados mutantes y la disfunción de los sistemas de degradación parecen conformar el conjunto perfecto para el aumento de la muerte celular inducida.

5.2.5 Mutación en ataxina-7 y muerte celular por apoptosis

Wang y col., en el 2015, insertaron *Atxn7-Q65* en un cultivo neuronal primario de cerebelo con un adenovirus recombinante, lo cual provocó cambios morfológicos de muerte celular como pérdida de neuritas, hinchamiento del cuerpo celular activando la apoptosis vía intrínseca (caspasa-9) y finalizando la muerte con caspasa-3 [68]. Este efecto de apoptosis por vía intrínseca se corroboró mediante la alteración en la expresión de la familia de proteínas Bcl2, que son reguladores clave en apoptosis mediada por mitocondria. Además, en el mRNA de estos transcritos en neuronas cerebelares, Bax (inductor de apoptosis) aumentó y Bcl-Xc (inhibidor de apoptosis) disminuyó [68]. En este sentido, este mecanismo parece ser la conclusión del sinergismo de múltiples efectos que concluyen con la degeneración celular.

6. Alternativas terapéuticas

En la [Figura 8](#) se muestra un resumen de los eventos patológicos en SCA7 y algunos potenciales blancos terapéuticos. En el citoplasma, en la [Figura 8A](#) se observa la proteína *ATXN7* mutante (*mATXN7*), la cual se acumula debido a la mutación. Ésta puede ser escindida por caspasa-7 y liberar el fragmento N-terminal que parece ser más tóxico. Si el fragmento N-terminal se encuentra acetilado en K257, como en la [Figura 8B](#), no podrá ser degradado por autofagia. En el núcleo, los clastosomas normalmente degradarían a

mATXN7, pero el sistema está saturado por la presencia de *mATXN7*, provocando su acumulación (Figura 8C). Por otro lado, *mATXN7* SUMOilada forma agregados redondos, los cuales secuestran subunidades del complejo SAGA (Figura 8D) y *mATXN7* no SUMOilada forma agregados con forma de estrella y secuestran proteínas como caspasa-3, la subunidad proteosomal 19s y HSP70 (Figura 8E). Por último, las alteraciones transcripcionales ocasionadas por la disfunción de SAGA y la alteración de reguladores transcripcionales como CBP, p53 y ROR α 1, llevan a la regulación a la baja de genes específicos para ciertos linajes celulares como fotorreceptores y específicos para oligodendrocitos, además de pri-miR-124 (Figura 8F) [57].

A continuación, se mencionan los potenciales blancos terapéuticos para disminuir o eliminar la patología de SCA7, los cuales están indicados en la Figura 8 en color rojo.

- Bloquear la proteólisis con inhibidores de caspasas (Figura 8G).
- Prevenir la acetilación mediante la sobreexpresión de la desacetilasa (Figura 8H).
- Prevenir la acumulación nuclear induciendo la formación de clastosomas con interferón- β (Figura 8I).
- Inhibir la formación de agregados tóxicos con fármacos (Figura 8J).
- Aumentar la transcripción al inhibir la desacetilación de histonas o ubiquitinación o mediante el tratamiento con factores neurotróficos como HGF y antibiótico ceftriaxona (Figura 8K).
- Prevenir la acumulación del mRNA de *ATXN7* o la proteína mediante el silenciamiento del gen mutado o mediante el uso de fármacos o inhibidores (Figura 8L).

A continuación, se describirán las alternativas más importantes en el desarrollo de estrategias terapéuticas de mayor eficiencia.

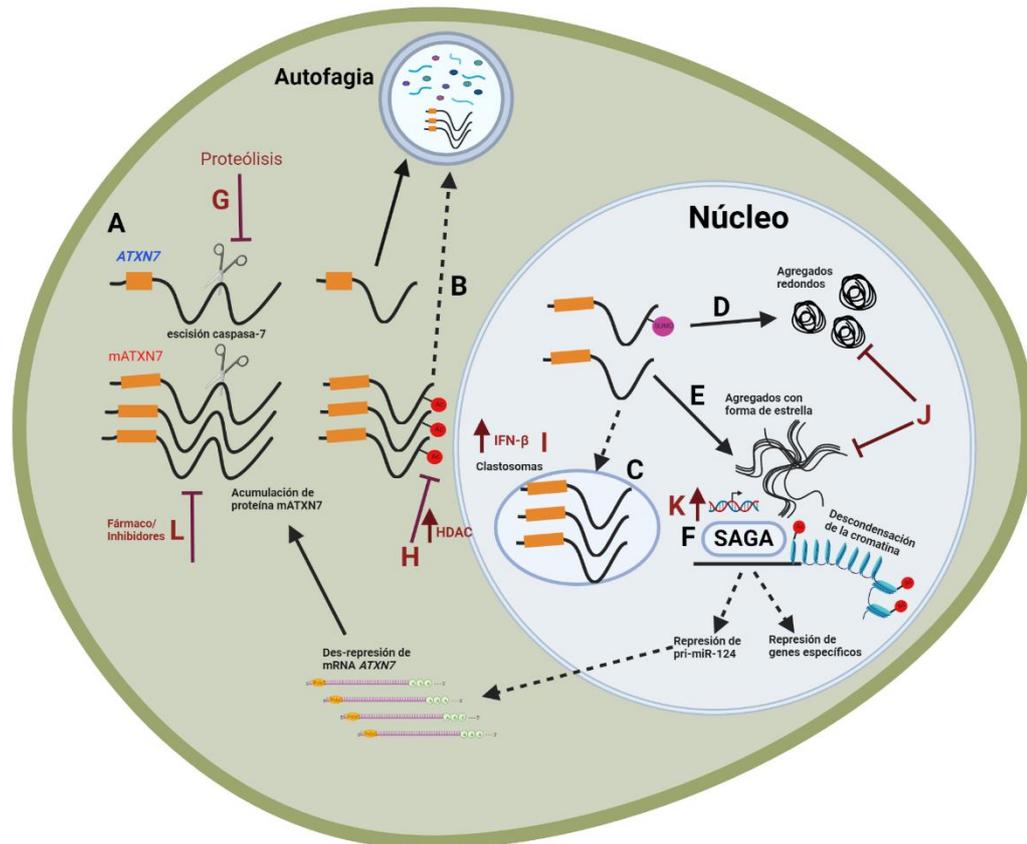


Figura 8. Eventos patológicos de ataxina-7 mutante y potenciales blancos terapéuticos. **(A)** *ATXN7* mutante (*mATXN7*) se acumula y es escindida por caspasa-7, liberando los fragmentos amino-terminales (Nter); **(B)** Acetilación de Nter-*mATXN7* en L257 evita su degradación por autofagia en el citoplasma; **(C)** La actividad de los clastosomas normalmente degrada *mATXN7*, pero se ve saturado y *mATXN7* se acumula; **(D)** Agregación de *mATXN7* SUMOilado provoca formación de agregados redondos; **(E)** *mATXN7* no SUMOilado forma agregados con forma de estrella; **(F)** Las alteraciones transcripcionales son ocasionadas por la disfunción de SAGA y alteración de reguladores transcripcionales como CBP, p53 y ROR α 1 que llevan a la regulación a la baja de genes específicos de fotorreceptores y oligodendrocitos. También ocurre una represión de pri-miR-124. Las oportunidades terapéuticas incluyen: **(G)** bloquear la proteólisis con inhibidores de caspasa; **(H)** prevenir la acetilación al sobreexpresar las desacetilasas; **(I)** Prevenir acumulación nuclear al inducir la formación de clastosomas con interferón- β ; **(J)** Inhibir la formación de agregados tóxicos; **(K)** Sobreregular la transcripción al inhibir la desacetilación o ubiquitinación de histonas, o mediante el tratamiento con factores neurotróficos como HGF y ceftriaxona; **(L)** Prevenir la acumulación de mRNA *ATXN7* o traducción usando inhibidores. (Modificado de [57]).

6.1 Silenciamiento de un gen

6.1.1 Oligonucleótidos antisentido (ASO)

Es una técnica no viral útil para disminuir la expresión de un gen o proteína a partir de los niveles de RNA. Los ASOs son cadenas sencillas cortas de oligonucleótidos que se unen selectivamente al mRNA complementario de interés para que éste sea escindido por la RNasa-H [69].

Los ASOs también pueden estar dirigidos hacia una región del pre-mRNA para enmascarar alguna señal de splicing específica dentro de los exones o intrones por

impedimento estérico y como consecuencia, excluir uno o varios exones que estén mutados. A pesar de que el marco de lectura del RNA se mantiene, se genera una nueva proteína internamente truncada, con lo cual su función podría verse comprometida [70,71]. Las estrategias no-alelo-específico no discriminan entre transcritos sanos y mutados, lo cual podría traer consecuencias a nivel celular.

Los ASOs alelo-específico pueden estar dirigidos hacia los repetidos expandidos, sin embargo, los repetidos como CAG se encuentran de manera ubicua en el transcriptoma humano, lo cual podría ocasionar efectos tóxicos dentro de las células. Una estrategia más segura es dirigir el ASO hacia un SNP en el gen mutado, aunque el tratamiento estaría limitado para cierto porcentaje de los afectados [72].

Al utilizar herramientas moleculares modificadas químicamente, nos lleva a que el diseño de un tratamiento *in vivo* sea solo a través de administraciones continuas, ya que el efecto desafortunadamente no sería permanente.

6.1.2 RNA interferente (RNAi)

La tecnología interferente es un proceso conservado evolutivamente que induce el silenciamiento de genes a un nivel postranscripcional, iniciado por secuencias de doble cadena de RNA (dsRNA) ya sea como siRNAs o derivados de shRNAs [73]. Esta tecnología se ha usado como potencial herramienta terapéutica con el objetivo de reducir o silenciar blancos génicos patogénicos, incluyendo la ganancia de función de las enfermedades del SNC [74]. La opción más conveniente es el silenciamiento alelo-específico [73], aunque la desventaja es que se requieren vectores virales (como los adenovirus) para entregar al interferente o el plásmido, con lo que hay riesgo de activación de la respuesta del sistema inmune.

6.2 Sistemas de Edición de ADN

Recientemente se han desarrollado diversas estrategias muy prometedoras dirigidas a la edición génica a través de sistemas de CRISPR/Cas9, endonucleasas dedos de Zinc (ZFN) o nucleasas efectoras similares a activadores transcripcionales (TALENs) [44]. Los primeros ensayos *in vitro* se aplicaron en HD y SCA3 [75,76]. Sin embargo, a la fecha existen múltiples efectos que pueden ocasionar rearrreglos génicos no deseados, por lo que su uso a nivel clínico aún se encuentra lejano como una alternativa eficiente en el tratamiento de las enfermedades polyQ.

6.3 Incremento de la degradación proteica

Por otro lado, el uso de fármacos se enfoca en la disminución o eliminación de proteínas mutadas. Hay diversos fármacos que se han probado *in vitro* e *in vivo* de manera efectiva al momento de eliminar los agregados proteicos en diferentes patologías.

En una revisión de Buijsen y col., reunieron resultados sobre algunos fármacos que han sido estudiados en enfermedades polyQ (para mayor detalle consultar [77]) con efectos benéficos como cafeína, cloruro de litio, 17-DMAG, temsirolimus, citalopram, ácido valproico, rapamicina, entre otros. Éstos tienen diferentes mecanismos de acción como inducción de los sistemas de aclaración proteica, principalmente, la autofagia o el UPS.

Dentro de estos fármacos, la rapamicina ha mostrado resultados consistentes y prometedores en modelos de enfermedades neurodegenerativas para la eliminación de agregados proteicos mediante la activación de autofagia, por lo que puede ser probado como fármaco modelo. Sin embargo, la mayoría de este grupo de fármacos prometedores ha sido limitado por las propiedades intrínsecas de los agentes terapéuticos (pobre solubilidad en agua, poca biodisponibilidad, pobres propiedades farmacéuticas) y, sobre todo, la dificultad para atravesar las barreras fisiológicas, incluyendo la barrera hematoencefálica. Además, éstos pueden ser tóxicos a la concentración terapéutica necesaria o metabolizados y perder sus propiedades terapéuticas de interés [78,79].

6.3.1. Rapamicina

La rapamicina o sirolimus es un compuesto macrólido aislado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* que tiene estructura de anillo y un esqueleto acilo saturado (Figura 9A) [80]. Este fármaco está directamente relacionado con quiescencia celular, proliferación, cáncer y longevidad. Además, tiene efecto sobre la activación de autofagia, la cual ocurre mediante la inhibición de mTOR, el cual regula negativamente la ruta PI3K/AKT/mTOR [81].

La activación de IRS1/2 y en consecuencia de PI3K/AKT, controla la fosforilación de mTOR y de la degradación/síntesis proteica. Así, mTOR fosforila directamente a ULK1 y mAtg13 e inhibe su actividad, la cual es esencial para la inducción de autofagia. En presencia de rapamicina, ésta se une a la proteína citosólica FKBP12 y la unión de este complejo a mTOR resulta en la inhibición de mTORC1 [81] (Figura 9B).

Ante este panorama, la rapamicina tiene la capacidad de activar el sistema de degradación de proteínas anómalas, que como se describió anteriormente, se encuentra limitado en presencia de la patología. La eliminación de agregados anormales producidos por la presencia de la proteína mutante, podría ser una alternativa en la disminución de muerte celular y, por ende, en la disminución del efecto patogénico de la SCA7.

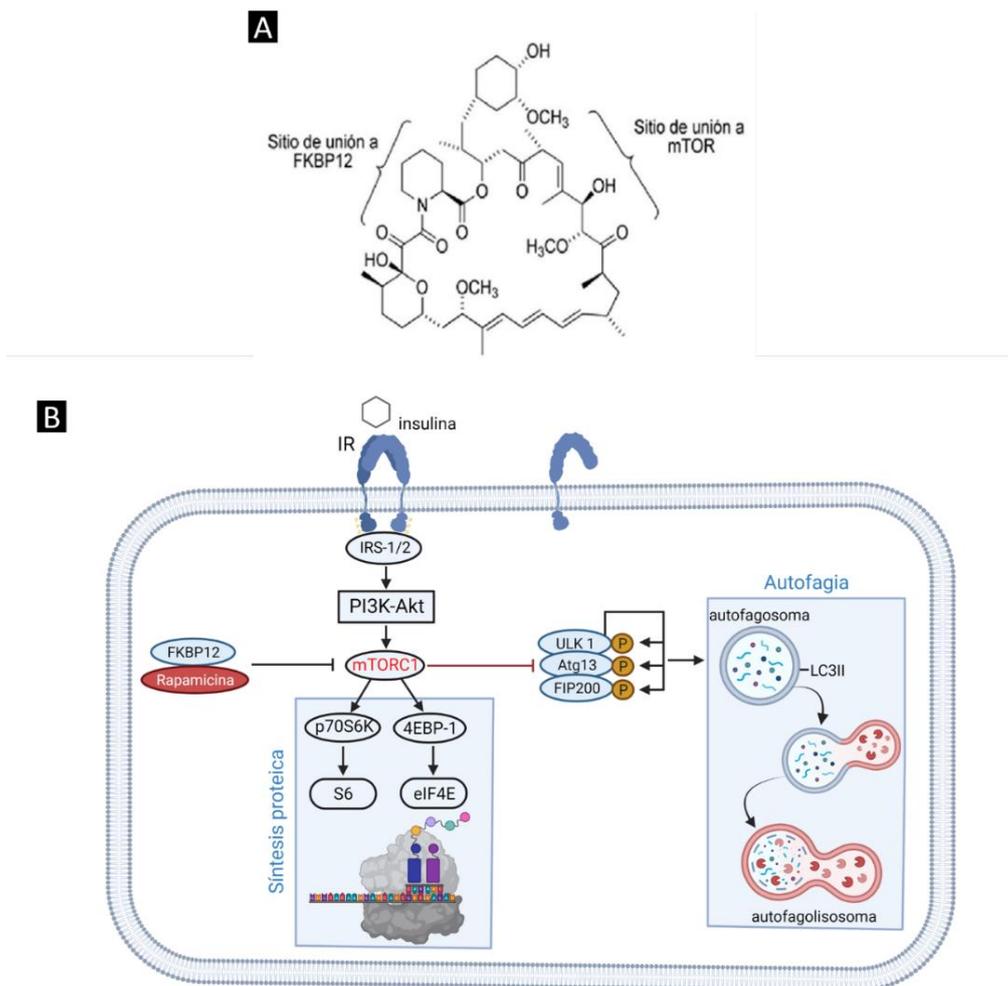


Figura 9. Rapamicina y su mecanismo de acción. **(A)** Estructura química de rapamicina; **(B)** Vía de señalización de mTOR y rapamicina.

6.3.2 Características fisicoquímicas de la rapamicina

La rapamicina es una molécula compleja con un peso molecular de 914.17 g/mol y solubilidad muy baja (Tabla 1). Esta molécula no contiene grupos funcionales ionizables en el rango de pH 1-10, por lo que el ajuste de pH no tiene efecto en su solubilidad acuosa, y entonces es necesaria una mezcla de cosolventes y agentes hidrotrópicos para lograr una mayor solubilidad en agua para administración parenteral [82].

Tabla 1. Características fisicoquímicas de la rapamicina

Fórmula	C ₅₁ H ₇₉ NO ₁₃
PM	914.17 g/mol
T fusión	183 °C
Solubilidad en agua	2.6 µg/mL
Log P	6
Reglas de Lipinsky	NO administrar vía oral
$t^{1/2}$	57-63 h
Absorción (longitud de onda)	280 nm

Ref: [79,82,83]

6.3.3 Farmacodinamia y Farmacocinética

La rapamicina administrada por vía oral, en forma líquida y sólida, es rápidamente absorbida con un pico de concentración en sangre de 1-2 h. Ésta es extensamente metabolizada por la isoenzima CYP3A4 del citocromo P450 y también es sustrato de la glicoproteína-P (P-gp), favoreciendo una baja biodisponibilidad y alta variabilidad farmacocinética. La biotransformación de rapamicina ocurre por hidroxilación o desmetilación, formando diversos metabolitos [83]. La mayoría de los metabolitos son eliminados por las heces y un 2 % mediante excreción renal [84]. La eliminación de la rapamicina del cuerpo es de 127-249 mL/h/kg [85].

6.3.4 Usos actuales

Se sabe que la rapamicina tiene una potente actividad inmunosupresora y además inhibe la activación y proliferación de las células T, por lo que su uso está aprobado para profilaxis de rechazo de trasplante renal y se encuentra en investigación para trasplante de hígado, corazón, pulmón y páncreas. Además, se ha demostrado que los stents recubiertos con sirolimus[®] son muy efectivos en la reducción de la estenosis coronaria, tasas de reintervención y otros eventos cardíacos adversos en pacientes con enfermedad coronaria [79].

Por otro lado, dado que la rapamicina inhibe a la cinasa mTOR aumentando la autofagia, tiene propiedades antiproliferativas, su administración es benéfica para el tratamiento de tumores y algunos estados patológicos benignos asociados con proliferación anormal [79].

Finalmente, la rapamicina junto con sus análogos, son útiles para el tratamiento de otras enfermedades como esclerosis tuberosa, sarcoma de Kaposi, diabetes, cicatrices queloides, psoriasis, envejecimiento, entre muchos otros [79].

6.3.5 Evidencia de actividad farmacológica en modelos in vitro

Posterior al tratamiento con 0.2 µg/mL de rapamicina por 72 h en un modelo celular inducible TET-ON de SCA3 que expresa ataxina-3/Q70 y otro con transfección transitoria en células COS-7 expresando ataxina-1/Q92, se observó la disminución de los niveles de ataxina-1/Q92, así como el decremento de células con agregados y la proporción de células con morfología nuclear apoptótica [86].

De manera similar, la administración de 200 ng/mL de rapamicina en un modelo celular inducible TET-OFF en células PC12 que expresan ataxina-7/Q65, logró el aumento de los niveles de LC3 II, indicando la activación de la autofagia. Los agregados de ataxina-7/Q65 escindida y/o ataxina-7/Q65 agregada fueron eliminados por autofagia y sin cambiar los niveles de expresión de la proteína soluble ataxina-7 [60].

Cabe resaltar que el diseño terapéutico de politerapia para la Enfermedad de Huntington (HD), consistió en la combinación de rapamicina (200 nM) y LiCl (10 mM) como inductores de autofagia dependiente e independiente de mTOR en las líneas celulares COS-7 y MEF. Con este tratamiento aumentaron los niveles de autofagia y, por lo tanto, disminuyeron los agregados de la proteína mutante. El mismo tratamiento, pero con 2 μ M de rapamicina y 4.2 mM de LiCl en *Drosophila melanogaster*, también dio como resultado un efecto protector aditivo contra la neurodegeneración de HD [87].

6.3.6 Evidencia de actividad en modelos *in vivo*

Los estudios *in vitro* fueron validados *in vivo* en un modelo de HD en *Drosophila melanogaster* que expresan Htt/Q108 en neuronas, lo que causó un incremento en la muerte de neuronas en pre-adultos, la cual fue parcialmente rescatada con 1 μ M de rapamicina [86].

De manera paralela, en otro modelo de *Drosophila melanogaster* con mHtt/Q120 expresado en los fotorreceptores, después del tratamiento con 1 μ M de rapamicina, se observó una marcada disminución en la neurodegeneración. Adicionalmente, probaron un análogo de rapamicina (CCI-779) con propiedades farmacéuticas más favorables para aliviar los síntomas en un modelo murino que expresa mHtt/Q171. El tratamiento fue administrado de forma intraperitoneal con una solución al 1% v/w de CCI-779 (20 mg/kg). Después del tratamiento se observó una mejora en el ratón en las pruebas de rotarod, fuerza de agarre, maniobra de alambre y temblores. Además, este tratamiento logró disminuir la cantidad de agregados en el estriado y dichos agregados fueron más pequeños [88].

Finalmente, en un modelo murino KI heterocigoto con 266Q para la proteína ataxina-7, se administró vía intraperitoneal al tratamiento con IFN- β por durante 6 semanas. Al término del tratamiento, los ratones que recibieron el tratamiento mostraron una mejora en la función locomotora, así como en balance, coordinación motora y movimientos finos [89].

6.3.7 Desventajas del uso terapéutico de la rapamicina

A pesar de ser un fármaco muy prometedor y versátil, tiene varias desventajas que pueden limitar el diseño de nuevos experimentos. Por un lado, la rapamicina muestra una baja biodisponibilidad por ser sensible al ácido gástrico, tiene solubilidad y permeabilidad limitada, sufre metabolismo de primer paso y es sustrato de la bomba de eflujo P-gp [79].

Por otro lado, tiene efectos adversos que son dependientes de la dosis como inmunosupresión, inhibición del crecimiento óseo, incremento del colesterol, triglicéridos y niveles de creatinina en suero y una menor tasa de filtración glomerular. También puede

provocar leucopenia, trombocitopenia, anemia, sarpullido, diarrea, hipertensión e hipopotasemia [79].

Finalmente, las propiedades fisicoquímicas de la rapamicina como su alta hidrofobicidad son poco favorables para su administración *in vivo*, lo que complica la preparación de formulaciones y entrega del fármaco hacia su tejido blanco en concentraciones efectivas. Por ejemplo, los fármacos hidrofóbicos son disueltos generalmente en grandes cantidades de excipientes, pero si es requerida una administración frecuente, aumenta la posibilidad de efectos tóxicos ocasionados por los excipientes [90].

Para enfrentar dichas limitaciones de la rapamicina y de múltiples fármacos dirigidos al SNC, se han utilizado sistemas innovadores de tamaño nanométrico como vehículo de fármacos para que sean protegidos y acarreados hasta la región de interés. El uso de sistemas en escala nanométrica tiene diversas ventajas, ya que evitan el reconocimiento del sistema inmune, pueden ser diseñados y funcionalizados para realizar entrega a nivel tejido-específico, pueden tener la capacidad de atravesar barreras fisiológicas como la hematoencefálica y pueden evitar la formación trombótica a nivel circulatorio [78].

7. Nanotecnología como transporte farmacológico

La nanotecnología es la manipulación de la materia a una escala nanométrica. Ésta incluye el tratamiento de átomos individuales, moléculas o compuestos en estructuras para producir materiales y dispositivos con propiedades especiales. Involucra trabajo de “top down” (al reducir el tamaño) y “bottom up” (cambiar moléculas en nanoestructuras). Los nanomateriales son materiales con un tamaño menor que 1 μm en al menos una dimensión y que contiene por lo menos un 50% de partículas de 100 nm. Sin embargo, no hay consenso sobre el tamaño mínimo o máximo, por lo que algunos autores lo restringen a un tamaño de 1-100 nm [78].

Estos nanomateriales tienen diferentes propiedades como conductividad eléctrica, reactividad química, magnetismo, efectos ópticos y resistencia física. Por lo tanto, algunos beneficios son el incremento de la entrega de fármacos pobremente permeables, la capacidad para dirigir los fármacos en una forma célula-específica, el aumento en la biodisponibilidad de los fármacos y la capacidad de entrega de 2 o más compuestos terapéuticos para politerapia [91].

Existe una amplia gama de sistemas nanotecnológicos, pero algunos ejemplos de nanomateriales capaces de acarrear fármacos para su liberación en el SNC se mencionan a continuación [78,92]

- **Liposomas:** Son creados a partir del colesterol y fosfolípidos naturales no-tóxicos y tienen un tamaño entre 50 y 200 nm. Son biocompatibles, no tóxicos, versátiles, con buena eficiencia de entrapamiento. Puede entregar compuestos hidrofílicos o hidrofóbicos. Disminuyen los efectos secundarios de algunos fármacos potentes e incrementa eficacia, pero su estabilidad es limitada [91].
- **Dendrimeros:** son estructuras hiper ramificadas y globulares con un tamaño menor a 10 nm. Se usan para un mayor tiempo de circulación, entrega de un material bioactivo controlado, entrega dirigida de partículas bioactivas a macrófagos y entrega dirigida al hígado. El tipo de moléculas que pueden ser

transportadas son ADN y siRNAs. Su desventaja es que provocan toxicidad, la cual es atribuida a su superficie catiónica y su mayor aplicación es como vehículo de fármacos anticancerígenos [91].

- **Micelas:** son un buen candidato para entrega de fármacos dirigidos al cerebro por su biocompatibilidad y evasión del sistema inmune. Se usan como agentes para diagnóstico como imagenología, son del tamaño de un virus y pueden transportar fármacos hidrofóbicos [91].
- **Nanoacarreadores o nanopartículas:** dispersiones particuladas o partículas sólidas con un tamaño entre 10 – 1000 nm. El fármaco puede estar disuelto, atrapado, encapsulado o anclado a la matriz del nanoacarreador. Dependiendo de su método de preparación, se clasifican en nanoesferas y nanocápsulas. Sus principales objetivos como nanoacarreador durante su diseño son el control del tamaño de la partícula, las propiedades de superficie y la liberación de los agentes farmacológicos para lograr una acción sitio-específica del fármaco a una velocidad y régimen de dosis terapéuticamente óptimos [93].

La barrera hematoencefálica (BHE) es una barrera aniónica altamente compleja e impermeable conformada por células endoteliales, astrocitos, microglía y pericitos. Por lo que el transporte a través de esta barrera está limitado por barreras físicas y metabólicas (enzimas y sistemas de transporte) restringiendo y separando al cerebro humano del sistema circulatorio [94–96]. En la [Figura 10](#) se muestran los tipos de rutas que usan las diferentes moléculas para atravesar al SNC desde el sistema circulatorio.

7.1 Nanoacarreadores poliméricos

Están elaborados con materiales poliméricos y atraviesan la BHE mediante endocitosis seguida de transcitosis a través de los capilares cerebrales de las células endoteliales que recubren los capilares sanguíneos del cerebro [91]. Los polímeros con los que están elaboradas dependerán del fin con el que se quieran utilizar. En general, se seleccionan polímeros altamente biodegradables y previamente aprobados por la FDA. Los nanoacarreadores poliméricos están formados en general por un componente polimérico base, un estabilizante y de manera optativa tienen un surfactante. A continuación, se detallará cada uno.

7.1.1 Polímero base

Los polímeros son unidades repetidas de monómero, los cuales son biodegradables y no tóxicos. Dichos biomateriales han sido utilizados ampliamente en la práctica médica, entre los que sobresalen los polímeros sintéticos como el polietilenglicol (PEG), poliacrilatos, poliésteres, poli-caprolactonas, poliacrilamidas, quitosán y el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA). De entre estos, el PLGA es un copolímero aprobado por la FDA debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. Cuando está en contacto con agua, sus enlaces tipo éster son escindidos mediante hidrólisis, dando lugar a los monómeros ácido láctico y ácido glicólico. Estos subproductos son fácilmente metabolizados y eliminados eficientemente en el cuerpo vía ciclo de Krebs sin provocar toxicidad sistémica por ser subproductos de varias rutas metabólicas en el cuerpo [97].

Las características atractivas de los nanoacarreadores basados en este polímero como tamaño, alta integridad estructural, estabilidad, facilidad de fabricación, liberación controlada y degradación en alrededor de 2 meses, lo hacen un vehículo terapéutico muy versátil, el cual puede ser utilizado como base para ser funcionalizado [97].

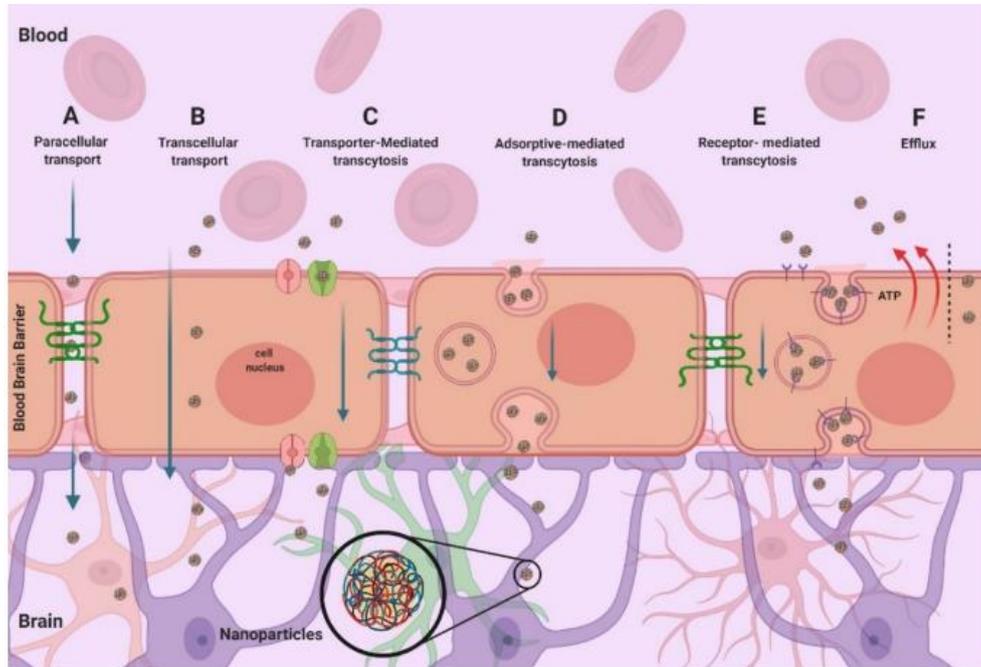


Figura 10. Rutas de transporte de las moléculas hacia el SNC. **(A)** La molécula se mueve entre las células, por lo que evade su destrucción por el sistema celular; **(B)** la molécula debe entrar a la célula y salir del otro lado de la célula para alcanzar el tejido; **(C)** la molécula forma un enlace con la proteína transportadora en un lado de la membrana que sufre un cambio conformacional en la proteína produciendo el transporte de la sustancia al otro lado de la membrana de alta a baja concentración o en contra del gradiente mediante el uso de ATP; **(D)** las moléculas policatiónicas atraviesan las células endoteliales mediante la interacción electrostática entre una sustancia cargada positivamente y la superficie de la membrana plasmática cargada negativamente; **(E)** la molécula logra internalizar mediante los receptores que contienen las células endoteliales; **(F)** son transportadores de la familia ABC (transportadores de unión a ATP) que pueden retornar las moléculas al torrente sanguíneo con la especificidad de sustratos diferentes.

Imagen tomada del artículo de Borbolla-Jiménez, et al, titulado *New Perspectives of Gene Therapy on Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias: From Molecular Targets to Novel Nanovectors*, publicado en la revista *Pharmaceutics* en el año 2021[44].

7.1.2 Estabilizantes

Existen diversos estabilizantes para la generación de nanoacarreadores, sin embargo, por su versatilidad, el alcohol polivinílico (PVA) es ampliamente utilizado en nanotecnología. PVA es un polímero lineal, sintético, anfifílico, biocompatible y biodegradable que funciona como agente emulsificante al disminuir las tensiones interfaciales de las soluciones. Tiene la capacidad de formar partículas relativamente pequeñas y con una distribución de tamaño uniforme, por lo que es un buen candidato para aplicaciones biomédicas [98].

El PVA estabiliza las emulsiones porque una fracción de PVA permanece asociada al nanoacarreador mediante la formación de una red interconectada con el polímero en la interfase [99]. Además, es soluble en solventes altamente polares e hidrofílicos como DMSO, siendo el agua su principal solvente. El PVA presenta una baja adsorción de proteínas y tiene gran resistencia química [100].

7.1.3 Surfactantes

Los surfactantes son moléculas anfifílicas, es decir que tienen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica (Figura 11A), por lo que mantienen la estabilidad de las fases dispersadas [101], particularmente de los nanomateriales hidrofóbicos en el medio acuoso (Figura 11B) [102]. Esta estabilidad se logra gracias a que la región hidrofóbica interactúa con la superficie del nanomaterial y las regiones hidrofílicas interactúan con el agua, proveyendo estabilidad coloidal y mejorando la estabilidad de la dispersión al prevenir la agregación del nanomaterial [102].

Los surfactantes ayudan a la estabilización de los nanoacarreadores por 2 principios. El electrostático estabiliza mediante la carga presente en la superficie de los nanoacarreadores, por lo que las mismas cargas se repelen evitando su aglomeración. La estabilización estérica funciona por las cadenas de surfactante ubicadas en la superficie de los nanoacarreadores, las cuales funcionan como resortes separando a los nanoacarreadores y evitando su aglomeración (Figura 11C).

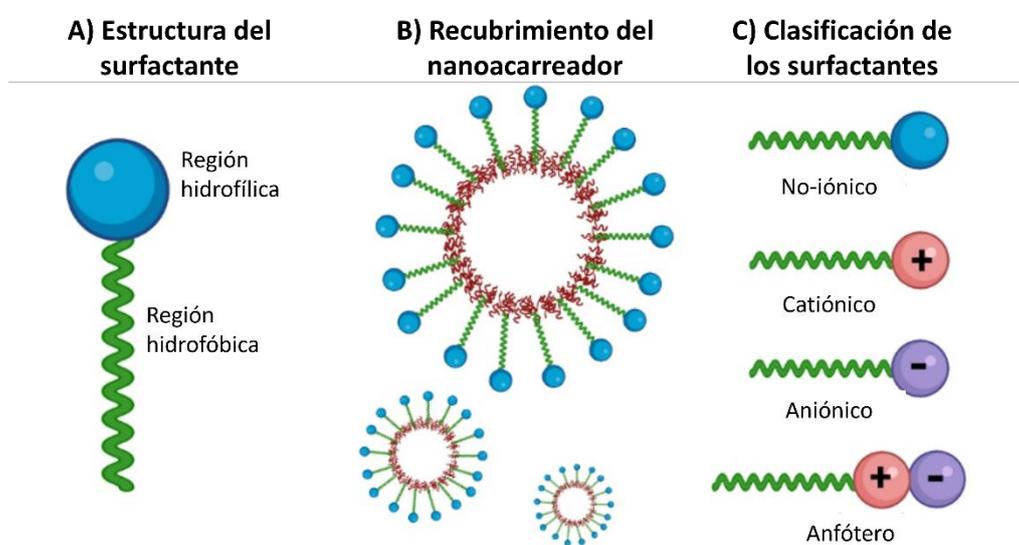


Figura 11. Estructura de los surfactantes y su clasificación. (A) Estructura clásica (anfifílica) de los surfactantes, representada por una región hidrofóbica y otra hidrofílica; (B) Recubrimiento del nanoacarreador con surfactantes, en donde la región hidrofóbica posee afinidad con la superficie del nanoacarreador y la región hidrofílica tiene afinidad con el medio de dispersión acuoso; (C) Clasificación de los surfactantes de acuerdo a su carga iónica en el grupo polar: no carga (no iónico), carga positiva (catiónico), carga negativa (aniónico) y carga positiva y negativa (anfótero).

Imagen tomada del artículo de Borbolla-Jiménez, et al, titulado New Perspectives of Gene Therapy on Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias: From Molecular Targets to Novel Nanovectors, publicado en la revista *Pharmaceutics* en el año 2021[44].

Es importante considerar que los surfactantes afectan el tamaño de partícula, índice de polidispersión, carga del fármaco, potencial Z y su correlación con la estabilidad física aparente [103]. Además, las interacciones biológicas dependen de la superficie de los nanoacarreadores y dado que los surfactantes se encuentran en la región externa, estas interacciones también dependerán de los surfactantes [104].

7.1.3.1 Poloxámeros

Los poloxámeros son copolímeros en tri-bloque con propiedades anfifílicas y que contienen 2 bloques de polioxietileno hidrofílico (POE) separados por un bloque de óxido de polipropileno hidrofóbico (PPO), cuya proporción modifica las características fisicoquímicas [105].

El poloxámero 188 (Plx188) es un surfactante con peso molecular de 8,400 Da, tiene un porcentaje del 80 % del bloque POE y su valor de HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance), el cual nos indica el grado de lipofilia e hidrofilia del surfactante, es de 29. Dichas características nos sugieren que es una molécula adecuada para estabilizar una formulación en medio acuoso. Además, es capaz de estabilizar a los nanoacarreadores mediante estabilización estérica [98] y se ha reportado que los poloxámeros podrían reducir la resistencia a multifármacos al inducir una reducción en los niveles de ATP en la barrera celular e inhibiendo los transportadores de eflujo de moléculas [106].

7.1.3.2 Polisorbatos

Los polisorbatos son moléculas anfifílicas sintetizadas por la reacción entre el éster del ácido graso sorbitán con óxido de etileno, por lo que la estructura química consiste en un grupo sorbitán con los grupos hidroxilo unidos a una cadena de polietilenglicol (PEG). El HLB se encuentra entre 9.6 y 16.7 y tienen una concentración micelar crítica baja, por lo que tienen una alta actividad superficial, dándole una alta estabilidad a los nanoacarreadores durante el almacenamiento en medio acuoso y en procesos de congelamiento/descongelamiento. Su degradación puede ocurrir mediante enzimas y químicamente por autooxidación o por hidrólisis [107].

Algunas ventajas del uso de polisorbatos para la elaboración de nanoacarreadores es que su concentración puede ajustar directamente el tamaño de los nanomateriales y aumenta su biodisponibilidad al disminuir la interacción con las proteínas plasmáticas [108].

En el caso particular del polisorbato 80 (Ps80), éste actúa principalmente como un anclaje para que los nanoacarreadores estén recubiertos con apolipoproteínas B o E y así puedan imitar a las partículas de lipoproteína. La utilidad de este enmascaramiento es porque las células endoteliales que conforman a la BHE tienen receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), así que los nanoacarreadores tendrán la capacidad de interactuar con la BHE y ser absorbidas por las células endoteliales del cerebro a través de la endocitosis mediada por receptores [109].

III. JUSTIFICACIÓN

La SCA7 es una enfermedad neurodegenerativa altamente discapacitante y que afecta generalmente a personas entre la tercera y cuarta década de vida, aunque también puede afectar a gente adulta mayor o incluso en la infancia debido al fenómeno de anticipación.

Por lo tanto, ante la ausencia de un tratamiento que mejore la sintomatología y/o que retrase o impida el progreso de este padecimiento, es importante buscar algún tratamiento farmacológico que sea efectivo. A pesar de que se han identificado potenciales fármacos para un probable tratamiento, desafortunadamente estos han sido ineficaces hasta ahora. Un impedimento para el uso de ciertos fármacos es la incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica por su baja biodisponibilidad y/o por ser metabolizadas antes de llegar a su tejido blanco. Para esto, el diseño y la aplicación de un vehículo funcional podría ser utilizado fundamentalmente para transportar fármacos hacia el cerebro para el tratamiento de este y otros padecimientos neurodegenerativos.

IV. HIPÓTESIS

El uso de un nanoacarreador para el transporte de un fármaco modelo (rapamicina) transportará de manera eficaz al fármaco a células del SNC e incrementará la eliminación de los agregados de ataxina-7 mutante (*mATXN7*) característicos de SCA7 en el modelo celular inducible.

V. OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Generar y caracterizar un nanoacarreador farmacológico eficaz para el posible tratamiento de SCA7 en un modelo *in vitro*.

- **Objetivos Particulares**

Los objetivos particulares se dividirán en tres diferentes fases del estudio:

- **Etapa 1:** Caracterización del sistema nanoacarreador
 - 1. Elaborar 3 sistemas independientes de nanoacarreadores poliméricos de PLGA funcionalizados, para la encapsulación del fármaco modelo (rapamicina).
 - 2. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los sistemas nanoacarreadores.
 - 3. Determinar el mejor método de esterilización del sistema polimérico.
 - 4. Determinar la estabilidad a largo plazo de los sistemas.
 - 5. Determinar el porcentaje de carga y perfil de liberación de los sistemas nanoacarreadores.
- **Etapa 2:** Evaluación citotóxica de los sistemas nanoparticulados
 - 6. Evaluar la internalización de los nanoacarreadores en las líneas celulares de origen glial y neuronal.

- 7. Analizar el efecto citotóxico de los nanoacarreadores poliméricos en las líneas celulares del SNC.
 - 8. Analizar los posibles cambios morfológicos y apoptosis ocasionados por el tratamiento de los sistemas nanoacarreadores.
- **Etapa 3:** Validación terapéutica del vehículo seleccionado
- 9.- Validar el modelo experimental de SCA7 y determinar las condiciones de inducción de la patología.
 - 10.- Examinar la eficiencia terapéutica del sistema nanoacarreador de rapamicina mediante la inducción de autofagia y la eliminación de los agregados proteicos anormales en el modelo celular inducible para SCA7.

VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del presente proyecto, se planteó abordar inicialmente como primera fase del estudio la elaboración y purificación de los nanoacarreadores (Figura 12A). Después, se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica seguida de la esterilización de cada sistema y evaluación citotóxica. Finalmente, se seleccionó el mejor nanoacarreador y se realizó la validación terapéutica (Figura 12B).

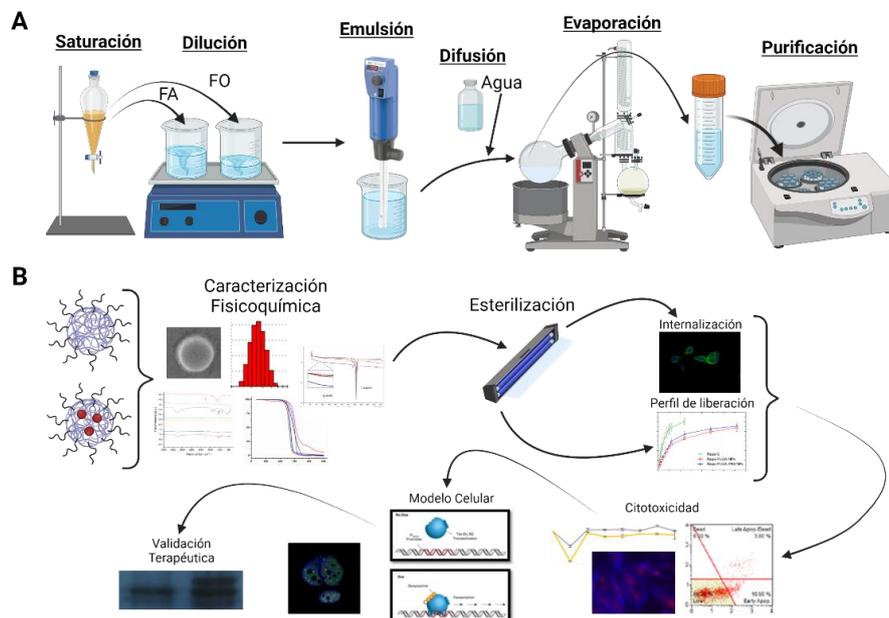


Figura 12. Metodología experimental. (A) Metodología para la elaboración de las nanoacarreadores; (B) Metodología experimental para la caracterización de los nanomateriales y su evaluación en 2 líneas celulares.

8. Elaboración de los sistemas nanoacarreadores

La elaboración de los nanoacarreadores poliméricos fue realizada por el método de emulsificación-difusión. Brevemente, se pesaron 200 mg del polímero PLGA en un

solvente parcialmente miscible en agua (acetato de etilo), previamente saturado en agua a temperatura ambiente, a la cual se le llamó fase orgánica (FO). Por otro lado, se disolvió 1 g (2.72 % w/v) del estabilizante PVA en el agua previamente saturada con el solvente parcialmente miscible en agua, a la cual se le denominó fase acuosa (FA). Posteriormente, la emulsión se realizó mezclando la FO con la FA con un emulsificador a una agitación de 11,000 rpm por 10 min y a temperatura ambiente. Esta emulsión aceite-en-agua fue posteriormente diluida con un exceso de agua para lograr la difusión del solvente. El solvente sobrante se eliminó en un rotavapor por 30 min a 40 °C y 60 rpm y al finalizar, los nanoacarreadores libres de solvente se purificaron mediante centrifugación a 11,000 rpm y 4 °C por 90 min. Al finalizar, el sobrenadante se descartó, el pellet se lavó 2 veces y se rehidrató con agua MilliQ® (Merck; Darmstadt, Alemania). La solución obtenida se agitó con un agitador magnético a temperatura ambiente y se agregó el 15 % (w/v) del crioprotector manitol para congelar los sistemas durante 48 h y posteriormente ser liofilizados (-45 °C por 2 h con rampa de 1 °C/min). Con esta metodología se elaboró el sistema nanoacarreador de PLGA/PVA (ver [Figura 12A](#)).

Por otro lado, con la finalidad de crear sistemas capaces de atravesar la BHE, se elaboraron sistemas funcionalizados con los surfactantes Ps80 o Plx188, los cuales fueron agregados a una concentración final del 0.15 % (w/v) en la FA antes de realizar la emulsión.

Finalmente, para la elaboración de las formulaciones con el fármaco, la rapamicina fue disuelta en la FO antes de realizar la emulsión. Con la metodología descrita y sus variantes, se obtuvieron las siguientes formulaciones ([Tabla 2](#)):

<i>Formulación</i>
<i>PLGA/PVA</i>
<i>PLGA/PVA/Rap</i>
<i>PLGA/PVA/Ps80</i>
<i>PLGA/PVA/Ps80/Rap</i>
<i>PLGA/PVA/Plx188</i>
<i>PLGA/PVA/Plx188/Rap</i>

9. Esterilización

Para asegurar la ausencia de microorganismos en los nanoacarreadores, se evaluaron diversas condiciones de esterilización. Inicialmente, todo el material instrumental que se utilizó fue esterilizado con una autoclave. Después de la liofilización de los nanoacarreadores, 1 mg de cada formulación se sometió a una fuente de radiación UV en un crosslinker de luz ultravioleta (Amersham Biosciences®, UA) a diferentes tiempos (0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5 y 3 h) e intensidad de 100 µJ/cm² o a diferentes dosis de irradiación γ (5 kGy o 10 kGy) a una tasa de 125 Gy/min, usando un irradiador Gamma beam 651PT con fuente de ⁶⁰Co para los rayos γ (AECL®, Ottawa, Canadá). De manera alterna, la formulación PLGA/PVA se dispersó en agua desionizada (1 mg/mL) y se colocó en diferentes tubos Eppendorf (Eppendorf; Hamburgo, Alemania) para ser esterilizados a las condiciones mencionadas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

9.1 Validación de los métodos de esterilización

La eficacia de los procesos de esterilización se evaluó probando la esterilidad de las muestras previamente contaminadas con un inóculo de 1×10^8 UFC/mL de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) o *Candida albicans* (ATCC 10231). Brevemente, a cada vial con 0.5 mL de una formulación polimérica se le añadió 0.5 mL de un inóculo. Luego se esterilizaron con radiación UV (0.5 – 2 h) o radiación γ (5 o 10 kGy) y las alícuotas se sembraron en los diferentes agares para el crecimiento e identificación de contaminación (agar Sabouraud para hongos, agar MacConkey para Gram (-) y agar sangre para Gram (+)). Así mismo, se evaluó mediante el sistema VITEK 2 (bioMerieux, Marcy d'Etoile, France) la presencia de cualquier otro microorganismo. Los microorganismos sobrevivientes fueron contados luego de 24 h de incubación a 35 °C por 7 días. El resultado fue reportado como unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL).

10. Caracterización fisicoquímica de los sistemas nanoacarreadores

Los sistemas recién elaborados y liofilizados fueron caracterizados fisicoquímicamente para conocer su tamaño y forma, antes y después de su esterilización.

10.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los sistemas liofilizados fue observada mediante SEM. La preparación de las muestras consistió en colocar 1 mg de cada formulación directo en cinta carbón. Posteriormente, las muestras fueron recubiertas con una película de oro de aproximadamente 10 nm de grosor con un Sputter Coater (JEOL fine coat ion sputter JFC-110; JEOL Company, Japan). Las muestras fueron observadas en un SEM de emisión de campo (modelo JSM-7600F; JEOL Company, Japan) a diferentes aumentos.

10.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El tamaño e índice de polidispersión (PDI) de los sistemas se determinaron por la técnica DLS con un Zetasizer Nano (Malvern Instruments ZS90; Malvern, UK). Cada muestra que se midió (con y sin fármaco, antes y después de esterilizar) fue hidratada con agua MilliQ® a una concentración de 1 mg/mL y se agitaron durante 2 horas. Luego se colocaron 100 μ L de cada formulación en la celda del Zetasizer con 900 μ L de agua MilliQ®. La lectura se realizó 10 veces con 10 lecturas cada una. Todas las lecturas se hicieron por triplicado y se reportaron mediante el porcentaje \pm desviación estándar (SD).

10.3 Potencial Z

El potencial Z se midió mediante dispersión de luz electroforética o Laser Doppler Velocimetry (LDV). El equipo empleado fue el Zetasizer Nano (Malvern Instruments ZS90; Malvern, UK), en el cual se leyeron las mismas muestras y con las mismas condiciones que para el tamaño de partícula. Las lecturas se realizaron 15 veces con 10 lecturas cada una a 25 °C. Todas las lecturas se hicieron por triplicado y se reportó el promedio \pm SD.

10.4 Análisis estructural

Se realizó el ensayo de espectrometría de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) para deducir la estructura química y estimar variaciones en la composición antes y después de la esterilización. El equipo que se utilizó fue el FTIR Nicolet 6700 (Thermo Fischer Scientific®, USA) y se colocó ~1 mg de cada una de las formulaciones liofilizadas antes y después de su esterilización. El rango de escaneo que se utilizó fue de 4000 – 400 cm⁻¹.

10.5 Análisis térmico

10.5.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para evaluar las propiedades térmicas de los sistemas nanoacarreadores liofilizados, se utilizó el calorímetro DSC 2910 (Modulated TA Instruments®; USA). Se pesó ~ 1 mg de cada sistema de nanoacarreadores antes y después de su esterilización y se colocó en celdas herméticas de aluminio y el barrido que se llevó a cabo fue de temperatura ambiente a 250 °C con una tasa de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno.

10.5.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

Se hizo un TGA con el fin de evaluar la estabilidad térmica de los nanoacarreadores. Se pesó ~ 1 mg de cada sistema liofilizado antes y después de su esterilización y fueron analizados en un Analizador Termogravimétrico Hi-Res TGA 2950 (TA Instruments®; USA). La medición se llevó a cabo desde temperatura ambiente hasta 500 °C a una tasa de calentamiento de 10 °C/min y bajo una atmósfera de nitrógeno.

11. Eficiencia de entrapamiento (EE) y carga del fármaco (DL)

Después de la elaboración de los sistemas nanoacarreadores cargados con rapamicina, se cuantificó el fármaco entrapado. Para esto, las formulaciones recién fabricadas, antes de ser liofilizadas, se centrifugaron y el pellet resultante se dejó secar por 24 h. Posteriormente se rompió el pellet con acetato de etilo y agua en una proporción 1:1. La rapamicina disuelta en el solvente se leyó en el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®; USA) a 279 nm. Al final, se calculó la EE y DL de rapamicina mediante las siguientes ecuaciones:

$$EE (\%) = \frac{\text{Peso fármaco en la formulación}}{\text{Peso fármaco inicial}} \times 100$$

$$DL (\%) = \frac{\text{Peso fármaco en la formulación}}{\text{Peso de la formulación}} \times 100$$

12. Perfil de liberación del fármaco

La liberación de la rapamicina se estudió para cada formulación (PLGA/PVA/Rap, PLGA/PVA/Ps80/Rap y PLGA/PVA/Plx188/Rap) por el método de microdiálisis.

Primero se pesó una cantidad conocida de cada formulación liofilizada con fármaco, se hidrató con 1.5 mL de PBS 1X y se colocó en una bolsa de microdiálisis previamente hidratada por 12 horas y se selló perfectamente por ambos extremos con hilo de cáñamo. Dicha bolsa se sumergió en una botella ámbar con 10 mL de medio de liberación que contenía 20 % de acetonitrilo en PBS 1X. Se selló la botella y se puso bajo agitación magnética a 35 °C. Cada determinado tiempo se tomó una muestra de 8 µL con reposición de medio fresco y la lectura se realizó mediante espectrofotometría a 279 nm. Las condiciones sink (solubilidad de rapamicina en agua es de 65.57 µg/mL) fueron consideradas para evitar la saturación del medio receptor de los estudios de liberación *in vitro*. El experimento se realizó por triplicado y las lecturas se realizaron por quintuplicado.

Los resultados recabados fueron modelados en 4 modelos matemáticos: orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas con el fin de entender el mecanismo de liberación de fármaco.

13. Estabilidad de las nanoacarreadores en dispersión

Para determinar la estabilidad en anaquel de acuerdo con la FDA, los sistemas liofilizados fueron hidratados con agua MilliQ® y se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL. El almacenamiento de la formulación de PLGA/PVA fue a 4 °C o a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) para la formulación esterilizada con luz UV y a 4 °C para la formulación no esterilizada. Cada mes se realizó la lectura de talla, PDI y potencial Z por un periodo de 6 meses. Adicionalmente, se realizó el mismo ensayo de estabilidad para las formulaciones PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Plx188 con almacenamiento a 4 °C y temperatura ambiente con las formulaciones sin esterilizar.

14. Evaluación Biológica de los sistemas nanoacarreadores

14.1 Líneas Celulares

Se utilizó la línea celular inmortalizada de glía de Müller humana, MIO-M1 y la línea celular neuronal proveniente de un neuroblastoma de humano, SH-SY5Y. La línea celular MIO-M1 fue mantenida con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Gibco®) suplementado con 10% SFB y 1% penicilina/estreptomina, mientras la línea celular SH-SY5Y fue mantenida con DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12- Gibco®) y MEM (Minimum Essential Media) en proporción 1:1 con 10% SFB y 1% penicilina/estreptomina.

14.2 Internalización celular

Se elaboraron nuevos lotes de PLGA/PVA, PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Plx188 con la molécula fluorescente Cumarina-6 o C6 (Sigma-Aldrich, Merck; Darmstadt, Alemania), en lugar de rapamicina, para el marcaje de los nanoacarreadores. Las células MIO-M1 o SH-SY5Y se sembraron en cubreobjetos (10,000 células/cubreobjeto) y se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5 % CO₂. Posteriormente se lavaron las células 2 veces con PBS y se colocó el tratamiento con PLGA/PVA/C6, PLGA/PVA/Ps80/C6 o PLGA/PVA/Plx188/C6 a la concentración de 150 µg/mL en el medio de crecimiento y

se dejó incubando por 2.5 h. Pasado este tiempo, se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min. Se lavaron 2 veces con PBS y se montaron los cubreobjetos en portaobjetos con 10 μ L de Vecta SHIELD con DAPI y se sellaron. Las células fueron observadas con un microscopio confocal (TCS-SP5, Leica; Wetzlar, Alemania) a diferentes objetivos.

Como control negativo se utilizó únicamente medio de crecimiento. Para el control con C6, se colocó el equivalente de C6 en cada nanoacarreador (0.63 μ g/mL, 0.1 μ g/mL y 0.18 μ g/mL de C6 para PLGA/PVA/C6, PLGA/PVA/Ps80/C6 y PLGA/PVA/Plx188/C6, respectivamente).

14.3 Citotoxicidad celular

Con la finalidad de saber si los sistemas nanoacarreadores son inocuos para las células MIO-M1 y SH-SY5Y, se analizó la presencia de vestigios de citotoxicidad a través de cambios en la proliferación celular, cambios morfológicos y apoptosis de inicio temprano y tardío.

14.3.1 Morfología celular

Las células MIO-M1 o SH-SY5Y se sembraron en cubreobjetos (10,000 células/cubreobjeto) y se incubaron a 37 °C y 5 % CO₂ durante 24 h. Luego se lavaron 2 veces con PBS y se puso el tratamiento de PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap (80 μ g/mL y 200 μ g/mL), PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap (30 μ g/mL y 150 μ g/mL) y PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap (25 μ g/mL y 150 μ g/mL). Todos los tratamientos se realizaron durante 72 h, luego se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos. Luego se permeabilizaron, se lavaron y se tiñeron con faloidina durante 20 minutos, se lavaron y se dejaron secar. Se montaron los cubreobjetos en portaobjetos con 10 μ L de Vecta SHIELD/DAPI y se sellaron. Las células fueron observadas en un microscopio confocal (TCS-SP5, Leica; Wetzlar, Alemania) a diferentes objetivos.

14.3.2 Viabilidad Celular

Se usó el kit de viabilidad celular por el método de reducción del MTT (Roche®; Basilea, Suiza), para lo cual se sembraron las células en cajas de 96 pozos a una concentración de 10,000 células/pozo durante 24 h y 6,000 células/pozo durante 72 h. Al iniciar el ensayo, se sembró el respectivo número de células y se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5 % CO₂. Pasado este tiempo, se trataron con los diferentes sistemas: PLGA/PVA, PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Plx188 con y sin rapamicina en un rango de concentraciones de 3 a 1500 μ g/mL y se dejó incubando el tiempo correspondiente. Al terminar la incubación, se lavaron los pozos 2 veces con PBS y se colocaron 95 μ L de medio de crecimiento suplementado fresco con 7 μ L de MTT en cada pozo y se incubaron a 37 °C durante 4 h. Luego se añadieron 100 μ L del solubilizante del kit de MTT y la placa fue leída a 590 nm con iMark Microplate Reader (Bio-Rad®, USA). Los resultados fueron expresados con el promedio \pm SD. La viabilidad celular fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular} = \left(\frac{\text{Absorbancia del pozo de interés}}{\text{Absorbancia del pozo control}} \right) \times 100$$

14.3.3 Apoptosis

Para saber si las células presentaron apoptosis a causa del tratamiento con los nanoacarreadores, se buscaron marcadores de apoptosis de inicio temprano y tardío mediante dos técnicas diferentes: anexina V y caspasa 3 y 9.

14.3.3.1 Evaluación de Anexina V

Las células MIO-M1 o SH-SY5Y se sembraron en cajas de 12 pozos (20,000 células/pozo) y se incubaron a 37 °C y 5 % CO₂ por 24 h. Luego se colocó el tratamiento con los diferentes sistemas nanoacarreadores (PLGA/PVA, PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Plx188) con y sin fármaco durante 72 h. Pasado este tiempo, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 1,200 rpm y el botón se resuspendió con 1 mL de DMEM suplementado. Se contaron las células y se tomaron aproximadamente 100 µL de las células resuspendidas (equivalente a 100,000 células/mL) y se le agregaron 100 µL del kit Anexina V. El control negativo se realizó con medio de crecimiento y el control positivo con 2 µM de estaurosporina durante 4 h. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 30 min protegido de la luz y la lectura se realizó en un analizador celular (Muse[®], Luminex; Texas, EU).

14.3.3.2 Inmunoblot y valoración de actividad de caspasas

Las células MIO-M1 o SH-SY5Y se sembraron en cajas P-100 y al alcanzar el 60 % de confluencia, se adicionó el tratamiento con los sistemas funcionalizados PLGA/PVA/Ps80 (30 µg/mL) o PLGA/PVA/Plx188 (25 µg/mL) con y sin fármaco durante 72 h. Además, se colocó un control a alta concentración de ambos sistemas (150 µg/mL). Al finalizar la incubación, se lavaron las células con PBS y se extrajo la proteína usando buffer de triple detergente con incubación durante 30 min en hielo y agitación intermitente, se centrifugó por 2 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. La cuantificación de la proteína se realizó con el reactivo Bradford (Bio-Rad[®]; California, EU) con su respectiva curva de calibración y lectura a 750 nm. La proteína se almacenó a -20 °C.

Para el SDS/PAGE se colocaron 30 µg de proteína en cada pozo en un gel al 12.5 % de poliacrilamida para buscar caspasa-3 y caspasa-9. El gel se corrió primero a 30 mA durante 30 min y luego a 40 mA por 1.5 h. La transferencia se realizó a una membrana de PVDF (Sigma-Aldrich[®]) previamente activada (metanol por 10 seg, 2 min en agua MilliQ y 10 minutos en buffer de transferencia) y a 10 V durante 15 minutos.

Al finalizar la transferencia, se comprobó la presencia de proteínas con rojo de Ponceau, luego se lavó la membrana con TBST 1X y se almacenó a 4 °C en TBST 1X. La membrana se bloqueó con leche descremada al 3 % en TBST 1X durante 1 h y se incubó overnight con los anticuerpos (Abcam[®]; Cambridge, Reino Unido) ab13585 para caspasa-3 o ab202068 para caspasa-9 a una concentración de 1:500 en TBST 1X. Luego se lavó la membrana 3 veces con TBST 1X durante 5, 10 y 15 min. Se incubó con el anticuerpo

secundario (Cy3 goat α -mouse IgG para caspasa-3 y Cy3 goat α -rabbit IgG para caspasa-9) a una concentración de 1:30,000 en TBST 1X durante 1 h y se lavó 3 veces la membrana con TBST 1X por 5, 10 y 15 minutos. El revelado se realizó después de colocar el sustrato de quimioluminiscencia ECL (Thermo Fisher Scientific).

15. Evaluación de Eficiencia Terapéutica

La formulación de PLGA/PVA/Plx188/Rap, por sus características fisicoquímicas y perfil de liberación, fue el nanoacarreador seleccionado para evaluar su eficiencia terapéutica. La concentración del nanoacarreador requerido para alcanzar la eficiencia terapéutica de la rapamicina fue de 25 μ g/mL.

15.1 Modelo experimental de SCA7

El modelo experimental usado es un modelo celular inducible Tet-On 3G (Clontech). Este modelo celular se realizó con la línea celular de glía de Müller de humano, MIO-M1. Al realizar la inducción del modelo con doxyciclina, se obtiene la expresión del gen de interés *ATXN7-Q10* (control) o *ATXN7-Q64* (SCA7). Se cultivaron *ATXN7-10Q* y *ATXN7-64Q* en ausencia (-dox) o presencia (+dox) de doxyciclina (1 μ g/ml) durante 8 días, reemplazando el medio cada 48 h. Este modelo fue realizado por nuestro grupo de trabajo a través del D. en C. Oscar Hernández Hernández, cuyo artículo está en proceso de publicación.

15.2 Curva de doxyciclina e identificación de agregados anormales de ataxina-7 en el modelo experimental *in vitro*

Se realizó una curva de doxyciclina para conocer la concentración óptima que dé como resultado la formación de la mayor cantidad de agregados proteicos. Para esto, las células se sembraron en cubreobjetos y se incubaron durante 24 h. Luego, se colocó la doxyciclina en un rango de 0.25 a 1 μ g/mL durante 24 h. Pasado este tiempo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 por 10 min. Al final, las células fueron incubadas con el anticuerpo α -ataxina-7 (1:50, Sigma), anticuerpo contra C-myc (FLAG) (1:100, Sigma) durante 20 min cada uno y con el anticuerpo secundario α -ratón-TRITC conjugado (1:100, Jackson Immuno-Research) durante 1 h. Entre cada paso mencionado, se enjuagó cada cubreobjeto con PBS 1X. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con VectaSHIELD/DAPI, se sellaron y se observaron con un microscopio confocal (TCS-SP5, Leica; Wetzlar, Alemania).

15.3 Tratamiento del modelo celular inducible con PLGA/PVA/Plx188/Rap

Las células del modelo celular inducible con el transgen *ATXN7-Q64* fueron sembradas en cubreobjetos y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, fueron inducidas con 1 μ g/mL de doxyciclina por 24 h, se lavaron y se colocó el tratamiento por 24 h con el nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188/Rap a la concentración de 25 μ g/mL. Pasado este tiempo, se lavaron los cubreobjetos con PBS 1X y se realizó la inmunofluorescencia como se indica en la sección 15.2. Como control, se colocó el nanoacarreador sin fármaco y la rapamicina libre (200 ng/mL).

Adicionalmente, el mismo tratamiento se realizó en cajas p100 y después del tratamiento, se extrajo la proteína con triple detergente y se cuantificó con el método colorimétrico de Bradford. Finalmente se siguió el protocolo descrito en la sección 14.3.3.2 para la detección de caspasa-3 y caspasa-9.

15.3 Evaluación de la marca LC3 después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap

Para cada grupo experimental se administró 200 ng/mL de rapamicina y 25 µg/mL de PLGA/PVA/Plx188 o PLGA/PVA/Plx188/Rap. De cada tratamiento se realizaron 3 réplicas biológicas. Inicialmente, se examinó la activación de autofagia a través de inmunofluorescencia, usando la sonda GFP-LC3-RFP-LC3ΔG para teñir los autofagosomas. Se utilizó la cloroquina para la inhibición de la autofagia. Para determinar la disminución de agregados, las células se fijaron y se incubaron con el anticuerpo contra C-myc (FLAG) y α -ATXN7 (1:100, Sigma) y después se marcaron con un anticuerpo α -ratón-TRITC conjugado (1:100, Jackson Immuno-Research) durante 1 h, para visualizarse en un microscopio confocal.

16. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como promedio \pm desv. stand. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y la estadística mediante análisis de varianza (ANOVA) en OriginPro 8 para las diferencias significativas. Las pruebas t-Student se utilizaron para evaluar el efecto de los nanoacarreadores en la toxicidad celular en GraphPadPrismver.4.0. El valor-P <0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

VII. RESULTADOS

Inicialmente se desarrolló el sistema nanoacarreador polimérico basado en PLGA y con el estabilizante PVA para demostrar la efectividad en el proceso de manufactura a través del método emulsificación-difusión. De la misma manera, se establecieron las mejores condiciones para la liofilización, alcanzando las características fisicoquímicas primordiales para su uso como nanoacarreadores eficientes en sistemas biológicos, así como su capacidad de entrega del fármaco modelo en un modelo celular.

17. Diseño y evaluación del sistema nanoacarreador base de PLGA/PVA

La formulación PLGA/PVA con y sin fármaco encapsulado fue obtenida mediante el método emulsificación-difusión (ver sección 8 en Metodología Experimental).

17.1 Morfología del nanoacarreador

En la Figura 13 se muestran las micrográficas de los nanoacarreadores PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap, las cuales fueron tomadas por SEM. En dichas micrográficas se puede observar una morfología esférica, simétrica y lisa, lo cual es adecuado para los nanoacarreadores destinados para el transporte de fármacos.

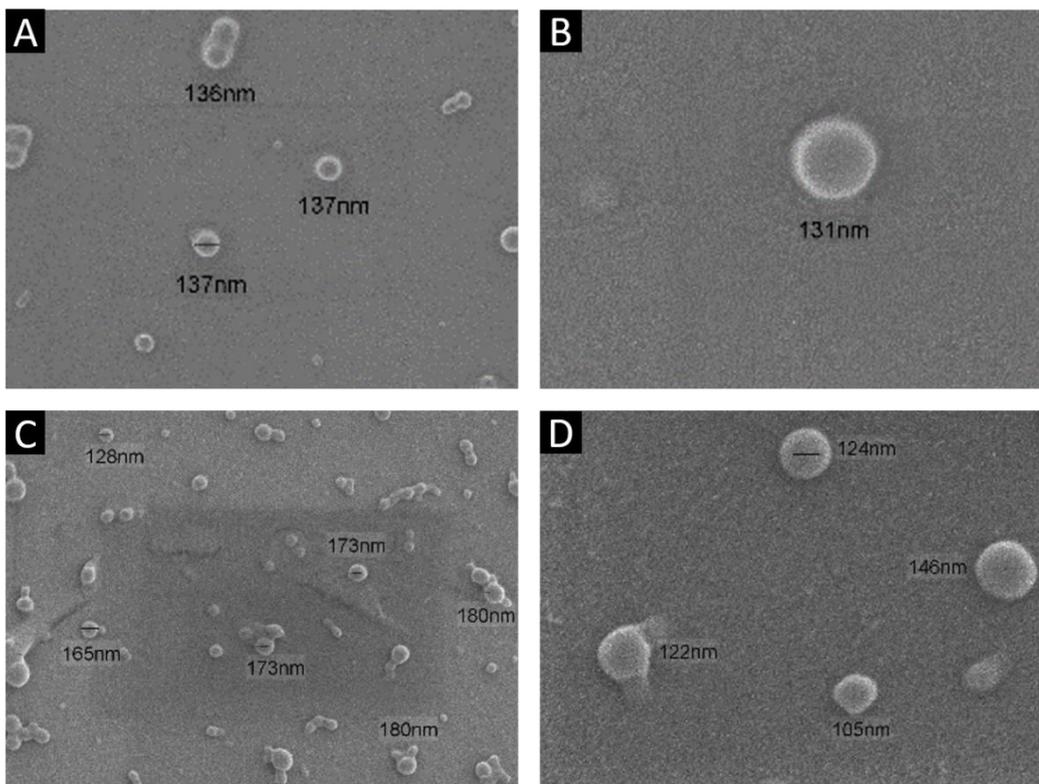


Figura 13. Micrografías de PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap. (A) PLGA/PVA 50,000X; (B) PLGA/PVA 100,000X; (C) PLGA/PVA/Rap 50,000X; (D) PLGA/PVA/Rap 100,000X.

17.2 Esterilización del nanoacarreador PLGA/PVA

Para determinar la viabilidad de los sistemas en condiciones *in vivo*, fue indispensable que los sistemas nanoacarreadores se encuentren libres de microorganismos y para ello demostrar un método eficaz para la esterilización de los sistemas acarreadores basados en PLGA. De manera inicial, los nanoacarreadores elaborados en condiciones asépticas no mostraron contaminación de microorganismos al ser sembrados en agar sangre, agar MacConkey y agar Sabouraud después de la incubación de 24 h (resultados no mostrados). Los métodos de esterilización del nanoacarreador seleccionado se validaron con la inoculación de *E. coli*, *S. aureus* o *C. albicans*. Después de la exposición del nanoacarreador PLGA/PVA con el inóculo bacteriano a la radiación UV, el ensayo microbiológico demostró que la esterilización fue alcanzada en su totalidad a partir de 2 h de radiación (Figura 14). De manera similar, cada inóculo de microorganismos con el sistema PLGA/PVA fueron sometidos a irradiación y a una intensidad de 5 kGy o 10 kGy, obteniendo una completa esterilidad con ambas dosis (resultados no mostrados).

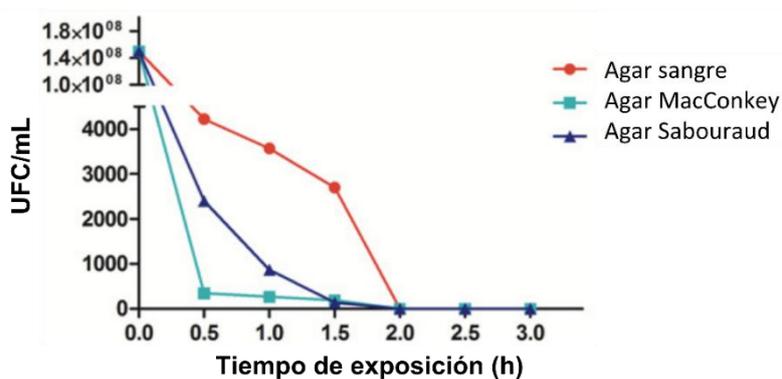


Figura 14. Esterilización del nanoacarreador PLGA/PVA en estado sólido con luz UV a diferentes tiempos.

17.3 Efecto de la esterilización en las características fisicoquímicas de los nanoacarreadores PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap

17.3.1 Tamaño y potencial Z

Posterior a la manufactura de los sistemas nanoacarreadores, el tamaño obtenido de PLGA/PVA fue de 243.1 ± 3.06 nm con un valor de PDI menor que 0.1 (0.064 ± 0.023) y potencial Z de -17.0 ± 0.17 mV (Tabla 3), mientras que el nanoacarreador PLGA/PVA/Rap tuvo un tamaño ligeramente menor. Los mismos nanoacarreadores fueron sometidos a radiación UV por 2 h y ninguna formulación sufrió cambios estadísticamente significativos después de su esterilización tanto en el tamaño como en el potencial Z (Tabla 3). Sin embargo, la esterilización con radiación γ (5 kGy o 10 kGy) sí tuvo cambios estadísticamente significativos con un menor tamaño a ambas dosis en comparación con PLGA/PVA sin esterilizar.

Tabla 3. Caracterización de PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap antes y después de la esterilización

	Talla (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
PLGA/PVA	243.13 ± 3.06	0.064 ± 0.023	-17 ± 0.17
PLGA/PVA UV	240 ± 1.55	0.072 ± 0.05	-18.16 ± 0.58
PLGA/PVA/Rap	229.16 ± 3.21	0.074 ± 0.04	-18.73 ± 1.101
PLGA/PVA/Rap UV	226.26 ± 4.56	0.089 ± 0.015	-18.1 ± 0.43
PLGA/PVA 5 kGy	$209.6 \pm 1.952^*$	0.046 ± 0.02	-17 ± 0.503
PLGA/PVA/Rap 5 kGy	ND	ND	ND
PLGA/PVA 10 kGy	$217.0 \pm 1.963^*$	0.028 ± 0.027	-17.5 ± 0.4
PLGA/PVA/Rap 10 kGy	ND	ND	ND

ND: Resultado no disponible; $p = 0.01^*$

17.3.2 Análisis químico-estructural

Las características estructurales antes y después de la esterilización se analizaron con FTIR y se muestran en la Figura 15. Para PLGA, se observaron las bandas 2951 cm^{-1} , 1743 cm^{-1} y 1092 cm^{-1} , atribuidas a enlaces C-H, enlaces C=O tipo éster y enlaces C-O

de poliésteres alifáticos, respectivamente, los cuales corresponden con lo reportado en la literatura [110]. PVA presentó picos de absorción en 3309 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de O-H, los picos en 2935 cm^{-1} , 2896 cm^{-1} , 1736 cm^{-1} y 1094 cm^{-1} corresponden a estiramientos en C-H del grupo alquilo, CH_2 , C=O y en los grupos C-O, respectivamente. Además, los picos en 1428 cm^{-1} y 834 cm^{-1} indican flexión de deformación de C-H₂ y flexión de oscilación en C-H₂, respectivamente; todo lo anterior corresponde con la literatura [111,112]. En el caso de la rapamicina, se observó la absorción del infrarrojo a las longitudes de onda de 2960 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} y 1380 cm^{-1} , indicando estiramiento de los enlaces CH=CH. En 2931 cm^{-1} y 1444 cm^{-1} hay un grupo CH₃ y en 994 cm^{-1} hay una vibración fuera del plano; todos los picos aquí observados corresponden con la literatura [113].

La formulación PLGA/PVA presentó el mismo espectro antes y después de irradiar con UV o con radiación γ , cuyos picos característicos ocurrieron en 3229 cm^{-1} , 2937 cm^{-1} , 1753 cm^{-1} , 1083 cm^{-1} y 1020 cm^{-1} . De la misma forma, la formulación PLGA/PVA/Rap, antes y después de esterilizar, presentó el mismo espectro con excepción de unos ligeros desplazamientos prácticamente despreciables a la derecha de 2934 cm^{-1} y 1754 cm^{-1} . Dado que no se observan diferencias entre la formulación con y sin rapamicina, podemos concluir que el fármaco se encuentra exitosamente entrampado dentro del sistema nanoacarreador.

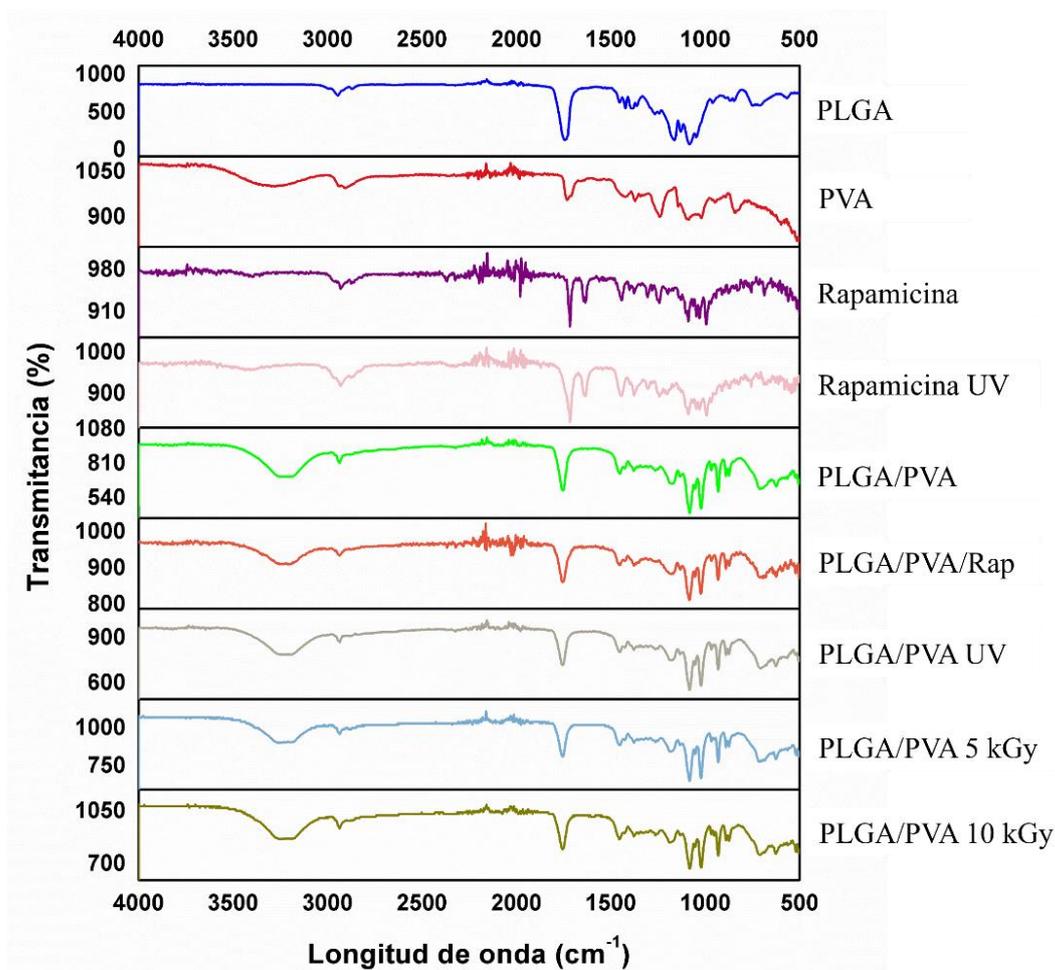


Figura 15. Espectro infrarrojo de los excipientes, PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap.

17.3.3 Análisis de estabilidad mediante termogravimetría

En el análisis termogravimétrico, el excipiente PLGA mostró una degradación uniforme, es decir que su degradación ocurrió en una sola etapa. En el caso del PVA y rapamicina, se observa una degradación en dos etapas. En la **Figura 16** se muestran los termogramas de los excipientes y nanoacarreadores en función de la temperatura. El PLGA inició una pérdida de peso a los 195 °C y su descomposición se completó a los 349 °C [114]. El PVA presentó 2 pasos de descomposición, el primero entre 257 °C y 365 °C y el segundo ocurrió entre 380 °C y 468 °C, lo cual corresponde con la literatura [115]. La rapamicina inició su descomposición térmica de 196 °C a 460 °C y una caída repentina de 220 °C a 250 °C [113]. El sistema PLGA/PVA sufrió la pérdida de peso entre 208 °C y 288 °C, mientras que PLGA/PVA/Rap presentó la pérdida de peso entre 233 °C y 349 °C. El sistema PLGA/PVA irradiado con UV presentó su descomposición de 213 °C a 292 °C. Las formulaciones irradiadas con γ (5 o 10 kGy) presentaron una descomposición similar a la ocurrida con la formulación sin esterilizar. En general, las formulaciones presentaron una temperatura de degradación a menor temperatura en comparación con los excipientes.

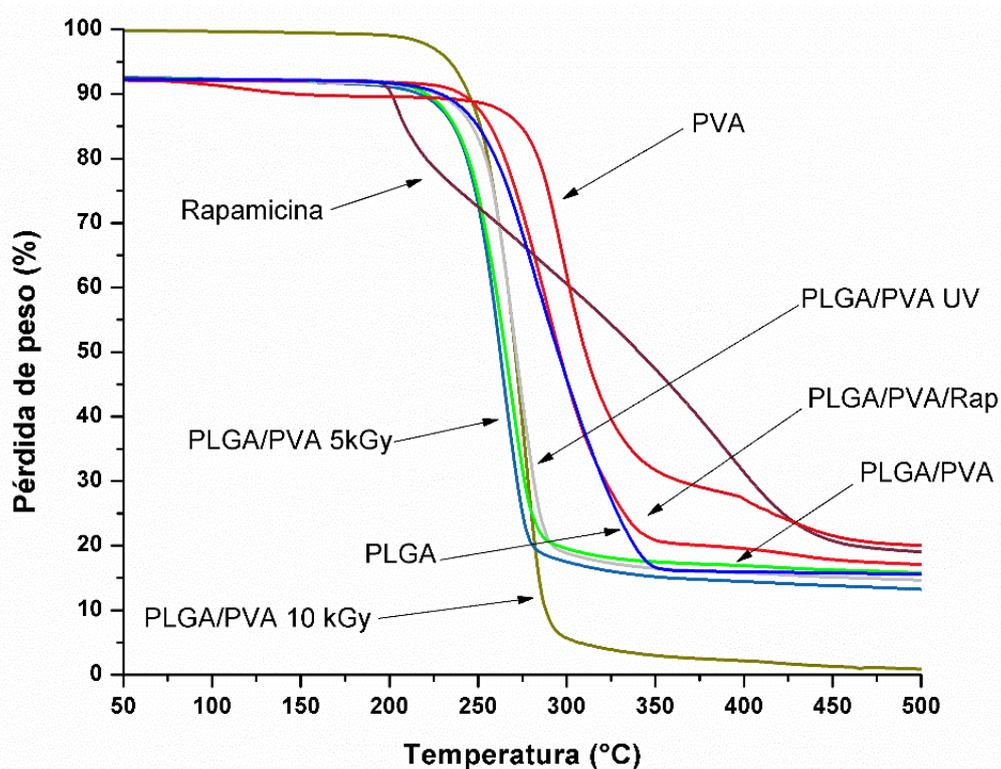


Figura 16. Termograma de los excipientes, PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap.

17.3.4 Análisis termo-analítico

Con el análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se evaluaron las propiedades térmicas de los excipientes y nanoacarreadores, cuyos resultados se muestran en la **Figura 17**. El PLGA mostró una temperatura de fusión (T_m) de 246 °C y una temperatura de cristalización vítrea (T_g) de 51 °C, correspondiente con la literatura [110]. La temperatura de fusión de PVA ocurrió a los 195 °C [111]. En la rapamicina se observaron 2 eventos endotérmicos, uno a los 186 °C y el otro a los 197 °C, los cuales correspondieron con su

punto de fusión previamente reportado [116]. De manera sorprendente, las formulaciones PLGA/PVA sin esterilizar y las esterilizadas con radiación UV o con radiación γ , presentaron los mismos cambios térmicos a los 155 °C y 165 °C, confirmando que no hay cambios químicos después de la esterilización. La formulación PLGA/PVA/Rap presentó además un cambio endotérmico a los 54 °C.

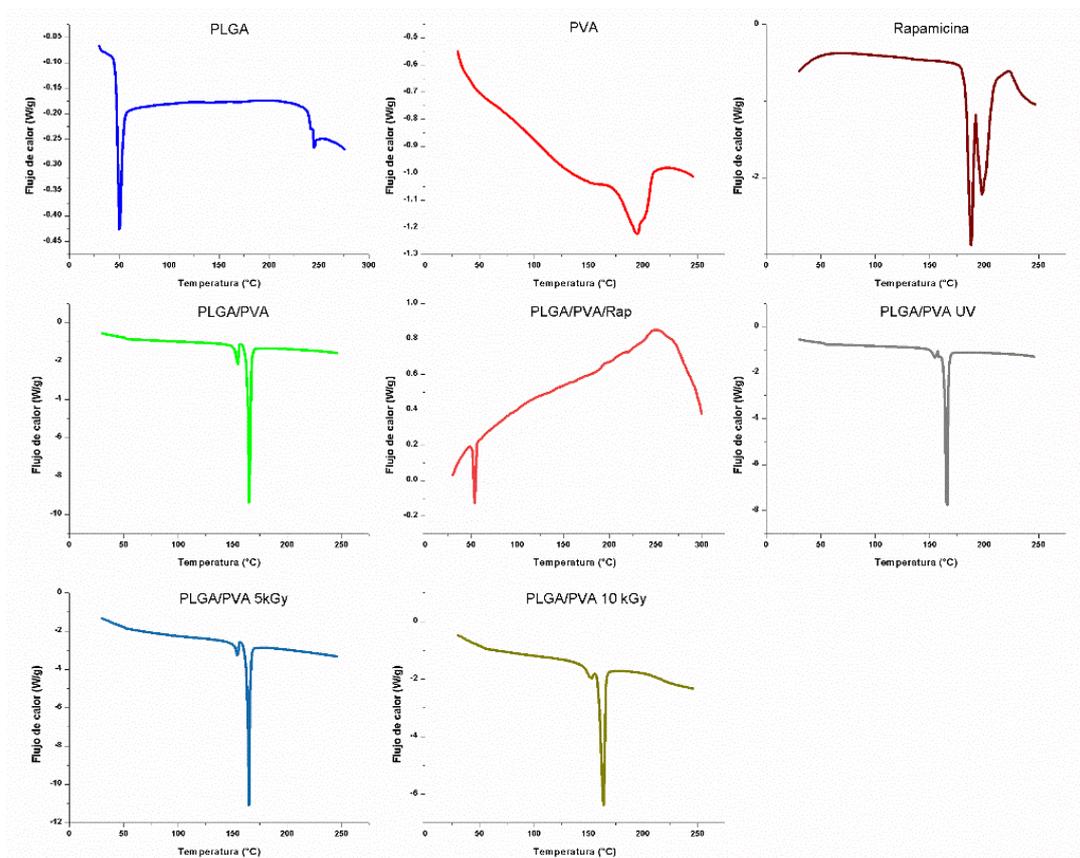


Figura 17. Eventos térmicos de los excipientes, PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap.

17.4 Estabilidad del sistema PLGA/PVA en dispersión

La estabilidad de los nanoacarreadores se realizó siguiendo la NOM-073-SSA1-2005 sobre la estabilidad de fármacos y medicamentos. Para la formulación de PLGA/PVA, se usaron 3 condiciones diferentes de almacenamiento y esterilización (Tabla 4). En la Tabla 4A, hasta la semana 12 se mantiene estable la formulación en tamaño y en las siguientes mediciones, empieza a disminuir su tamaño. En cambio, en la Tabla 4B y Tabla 4C, la estabilidad de las formulaciones se mantiene hasta la semana número 8. En este estudio se puede sugerir que los nanoacarreadores sin exposición a radiación UV y almacenados a baja temperatura (4 °C), son ligeramente más estables (237.3 ± 1.38) que las formulaciones previamente expuestas a radiación UV (216.1 ± 1.484) o almacenadas a temperatura ambiente (216.7 ± 1.193) después de 12 semanas en dispersión.

Sin embargo, las formulaciones se tienen en estado liofilizado, por lo que el almacenamiento se puede realizar a temperatura ambiente o a 4 °C, manteniendo el nanoacarreador completamente estable. Una vez que se hidrata el nanoacarreador, es cuando empieza la reacción de hidrólisis ocasionada por el estado líquido.

Tabla 4. Estabilidad en dispersión de PLGA/PVA

A) No UV a 4 °C	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
Tiempo cero	239.1 ± 1.819	0.084 ± 0.007	-16.5 ± 0.379
2 semanas	241.5 ± 3.151	0.03 ± 0.02	-18 ± 0.208
8 semanas	239.4 ± 3.857	0.046 ± 0.039	-20 ± 0.321
12 semanas	237.3 ± 1.38	0.072 ± 0.051	-18.1 ± 0.173
16 semanas	217.7 ± 2.252	0.048 ± 0.028	-14.9 ± 0.115
24 semanas	214.4 ± 0.9504	0.08 ± 0.02	-14.5 ± 0.3
B) UV a 4 °C			
Tiempo cero	242.1 ± 2.026	0.046 ± 0.021	-18.7 ± 0.379
4 semanas	239.5 ± 2.107	0.034 ± 0.012	-19.9 ± 0.3
8 semanas	237.6 ± 1.65	0.074 ± 0.018	-19.1 ± 0.503
12 semanas	216.1 ± 1.484	0.061 ± 0.008	-13.8 ± 0.346
24 semanas	215.1 ± 2.411	0.038 ± 0.007	-11.3 ± 0.473
C) NO UV T.amb			
Tiempo cero	244.8 ± 12.95	0.089 ± 0.024	-19.4 ± 0.208
4 semanas	239.4 ± 5.186	0.047 ± 0.021	-17.9 ± 0.351
8 semanas	237.2 ± 0.7	0.061 ± 0.03	-17.3 ± 0.945
12 semanas	216.7 ± 1.193	0.031 ± 0.037	-14.2 ± 1.7
24 semanas	212.9 ± 1.4	0.06 ± 0.028	-12.1 ± 0.1

17.5 Liberación de rapamicina del sistema PLGA/PVA/Rap

La eficiencia de atrapamiento (EE) del nanoacarreador PLGA/PVA/Rap fue de 43.7 %, por lo que se alcanzó una concentración de 9.4 ng de rapamicina por cada µg de nanoacarreador (Figura 18B). El perfil de liberación mostró una liberación de fármaco bifásica, es decir que en la etapa inicial se observó una liberación de explosión o liberación acelerada (“efecto burst”) de la rapamicina, alcanzando una liberación de hasta el 55 % las primeras 22 h. Después de este tiempo, la liberación ocurrió de una manera prolongada hasta alcanzar el 90.63 % de liberación a las 186 h (~7 días) (Figura 18A).

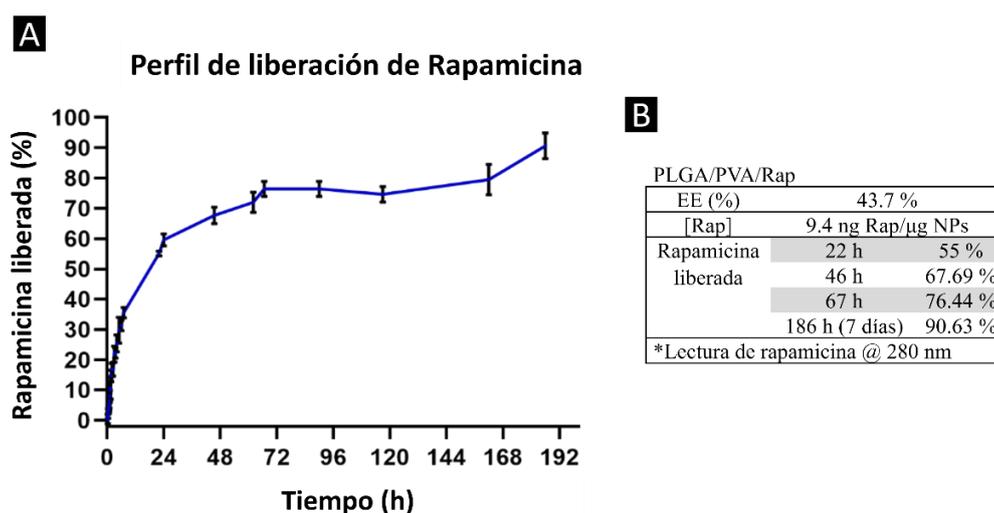


Figura 18. Perfil de liberación de PLGA/PVA/Rap. (A) Curva de liberación de rapamicina desde la formulación PLGA/PVA/Rap; (B) Eficiencia de encapsulación de rapamicina y sus porcentajes de liberación a diferentes tiempos.

17.5.1 Modelos matemáticos

Los datos obtenidos durante el perfil de liberación fueron analizados mediante diferentes modelos matemáticos (Tabla 5). En este caso, el modelo al cual se ajustaron mejor los datos fue al modelo de Korsmeyer-Peppas, el cual se basa en una ecuación semiempírica que sirve para describir la liberación de fármacos de sistemas poliméricos. En esta ecuación, el valor de n nos dice si la liberación sigue la ley de Fick o no. En este caso, al tener un valor de n menor a 0.5, la liberación de la rapamicina sigue la ley de Fick, es decir que la liberación del fármaco está gobernada por la difusión.

Tabla 5. Modelos matemáticos para la liberación de rapamicina a partir del nanoacarreador PLGA/PVA/Rap

	R²	K	n
<i>Orden cero</i>	0.8342	0.9706	----
<i>Primer orden</i>	0.5739	0.0251	----
<i>Higuchi</i>	0.9478	8.2256	----
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	0.9706	14.1098	0.3763

17.6 Internalización del nanoacarreador PLGA/PVA en las células MIO-M1

El nanoacarreador se marcó con la molécula fluorescente cumarina-6 (C6) para observar las nanopartículas. En la Figura 19 se puede observar que no sólo PLGA/PVA/C6 es capaz de internalizar a las células, sino que también lo hace con mayor eficacia que C6 sola. Además, de manera interesante, el nanoacarreador se concentran en la periferia del núcleo y a lo largo del citoplasma. Es importante mencionar que, en estas imágenes representativas, el control de C6 sola se incubó durante 5 h y PLGA/PVA/C6 se incubó durante 2 h y, aun así, se nota una mayor internalización de C6 por parte de PLGA/PVA/C6 que C6 libre.

17.7 Citotoxicidad de los nanoacarreadores PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap

Se realizaron ensayos de citotoxicidad para medir el efecto de los nanoacarreadores PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap en la morfología y viabilidad celular de las células MIO-M1.

17.7.1 Cambios en la morfología celular

La morfología celular se evaluó mediante el marcaje del citoesqueleto, específicamente F-actina a través de faloidina (Figura 20). Después del tratamiento con los nanoacarreadores PLGA/PVA o PLGA/PVA/Rap a dos concentraciones diferentes (80 µg/mL y 200 µg/mL) durante 72 h, se confirmó que ambas formulaciones no afectan la morfología celular. Además, en este ensayo se añadieron los nanoacarreadores previamente esterilizadas con radiación UV y radiación γ . Al igual que las formulaciones sin irradiar, la esterilización con radiación UV no provocó cambios a nivel celular. De manera interesante, la formulación esterilizada con radiación γ presentó estrés celular con

ligero cambio morfológico y aumento del núcleo celular después de la exposición a 10 kGy de radiación γ .

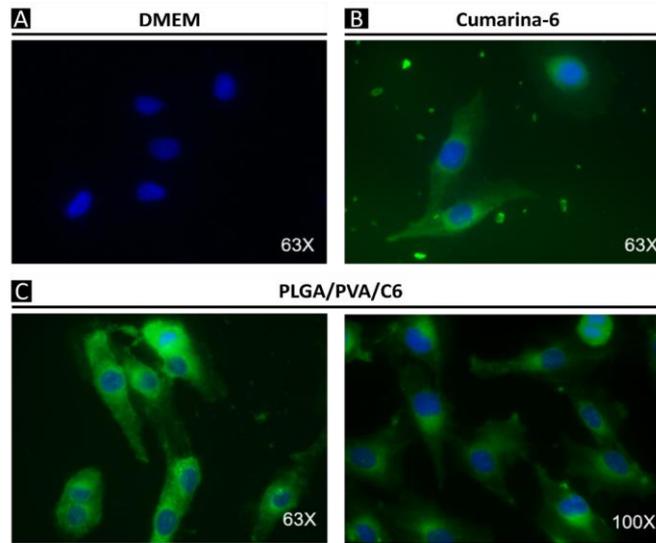


Figura 19. Internalización de PLGA/PVA/C6 en la línea celular MIO-M1. (A) Control sin nanoacarreadores; (B) Control con 0.63 $\mu\text{g/mL}$ de cumarina-6 libre; (C) Tratamiento con 150 $\mu\text{g/mL}$ de PLGA/PVA/C6.

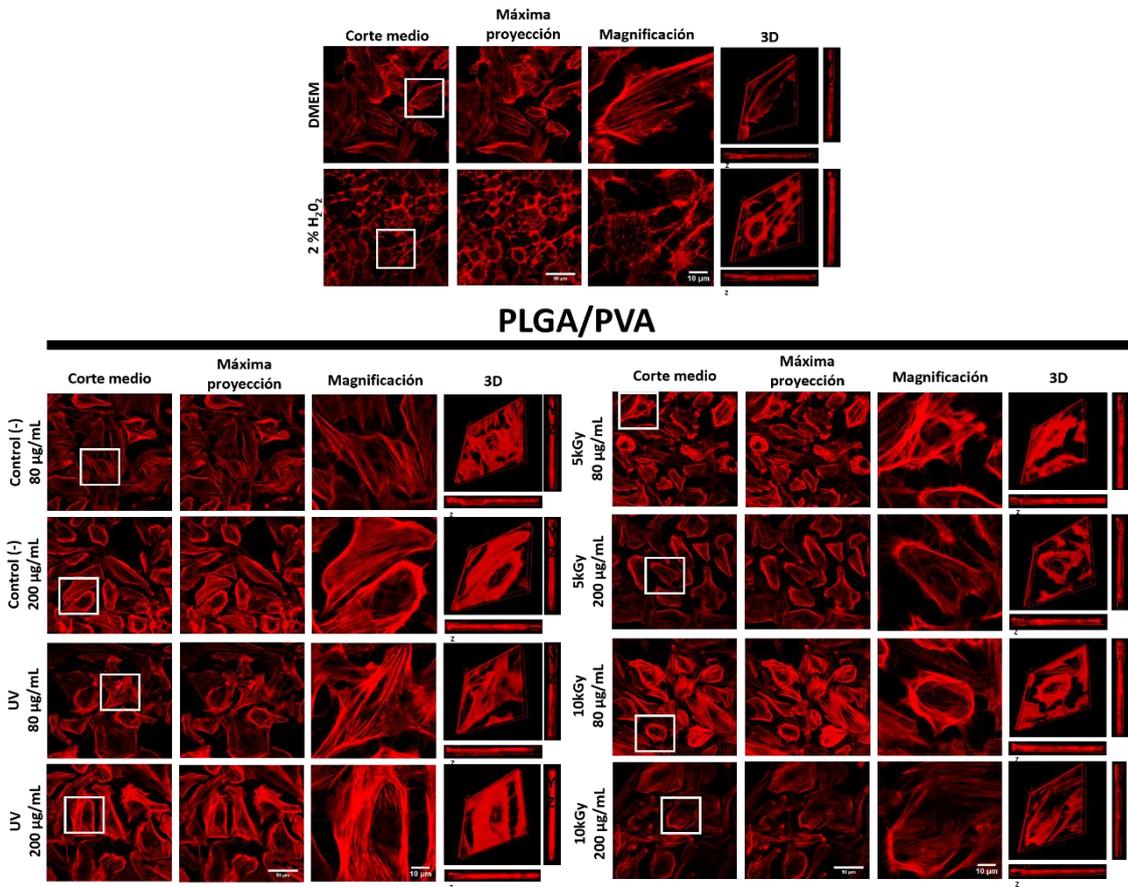


Figura 20. Morfología celular después del tratamiento con PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap. Tratamiento con PLGA/PVA antes y después de esterilizar a las concentraciones de 80 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$ durante 72 h. Inmunotinción realizada con faloidina.

17.7.2 Evaluación del impacto en la viabilidad celular

En la Figura 21A se observa que no hay citotoxicidad aparente después del tratamiento con PLGA/PVA hasta una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 48 h y 72 h. En la Figura 21B, el tratamiento con PLGA/PVA no mostró citotoxicidad relevante incluso a la máxima concentración utilizada (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y al mayor tiempo de incubación con el tratamiento (96 h), con lo que podemos concluir que PLGA/PVA es inocuo para las células MIO-M1 a las condiciones mencionadas. Por otro lado, en la Figura 21C se analizó la viabilidad celular tras el tratamiento con PLGA/PVA/Rap a concentraciones terapéuticas de rapamicina, obteniendo una viabilidad celular por encima del 90 % después de 24 h y 48 h de tratamiento, por lo que podemos concluir que PLGA/PVA/Rap tampoco es citotóxico para las células MIO-M1 a las concentraciones mostradas.

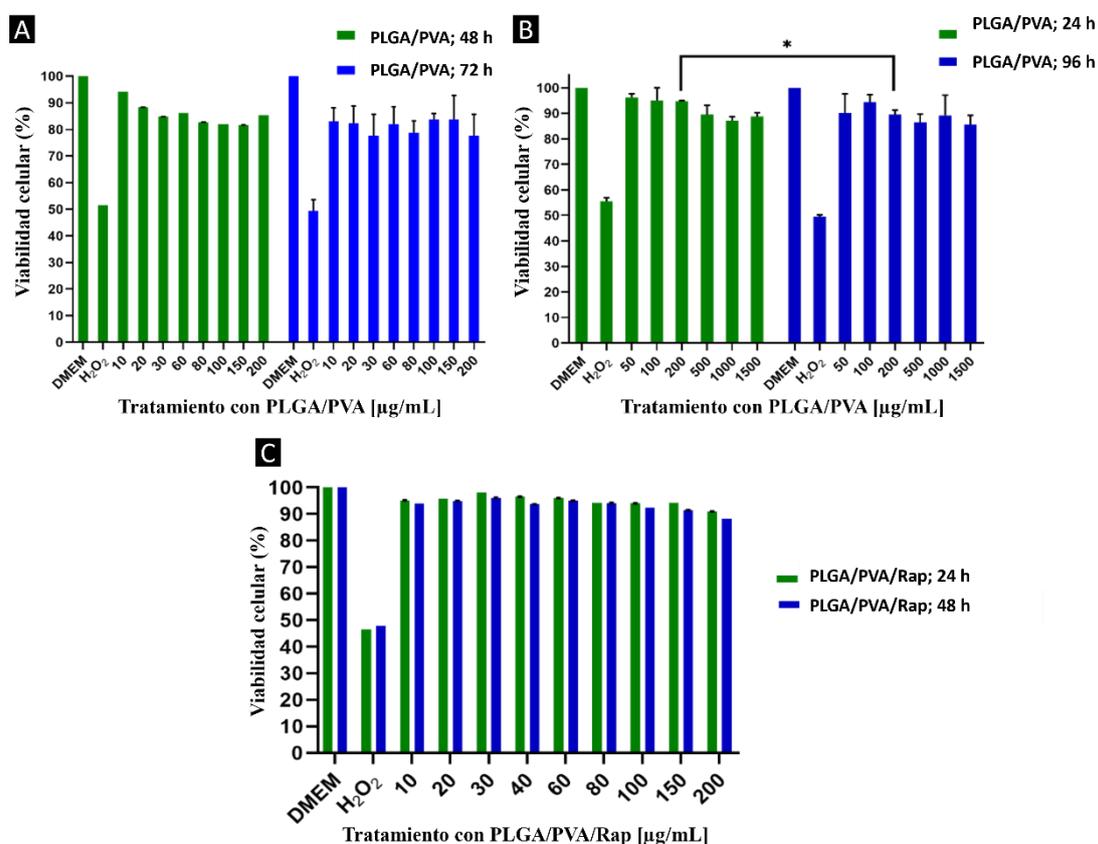


Figura 21. Viabilidad celular de MIO-M1 después del tratamiento con PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap. (A) Células MIO-M1 tratadas con PLGA/PVA durante 48 y 72 h; (B) Células MIO-M1 tratadas con PLGA/PVA a altas concentraciones (50-1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 y 96 h; (C) Células MIO-M1 tratadas con PLGA/PVA/Rap durante 24 y 48 h.

18. Diseño y caracterización de los nanoacarreadores funcionalizados para SNC

A partir de los resultados anteriores, se demostró la capacidad de los nanoacarreadores, basados en el polímero PLGA, de transportar efectivamente al fármaco modelo y el método adecuado de esterilización que no provoca modificaciones fisicoquímicas en el nanotransportador. Ante estos resultados y dado que el interés principal de este estudio

es diseñar un nanotransportador que sea capaz de atravesar la BHE, fue funcionalizado con los surfactantes Ps80 o Plx188 para que le den la capacidad de atravesar esta barrera. A continuación, se muestra la caracterización de los nanoacarreadores funcionalizados:

- PLGA/PVA/Ps80
- PLGA/PVA/Ps80/Rap
- PLGA/PVA/Plx188
- PLGA/PVA/Plx188/Rap

18.1 Características morfológicas de los sistemas funcionalizados

En la **Figura 22** se muestran las micrografías de los nanoacarreadores funcionalizados sin fármaco y con fármaco. En las formulaciones de PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap (**Figura 22A** y **22B**) se alcanzan a observar los nanoacarreadores esféricos, aunque éstos están embebidos posiblemente en el surfactante Ps80. En el caso de las formulaciones de PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap (**Figura 22C** y **22D**) se observan unos nanoacarreadores lisos y esféricos, cuyo tamaño también es homogéneo.

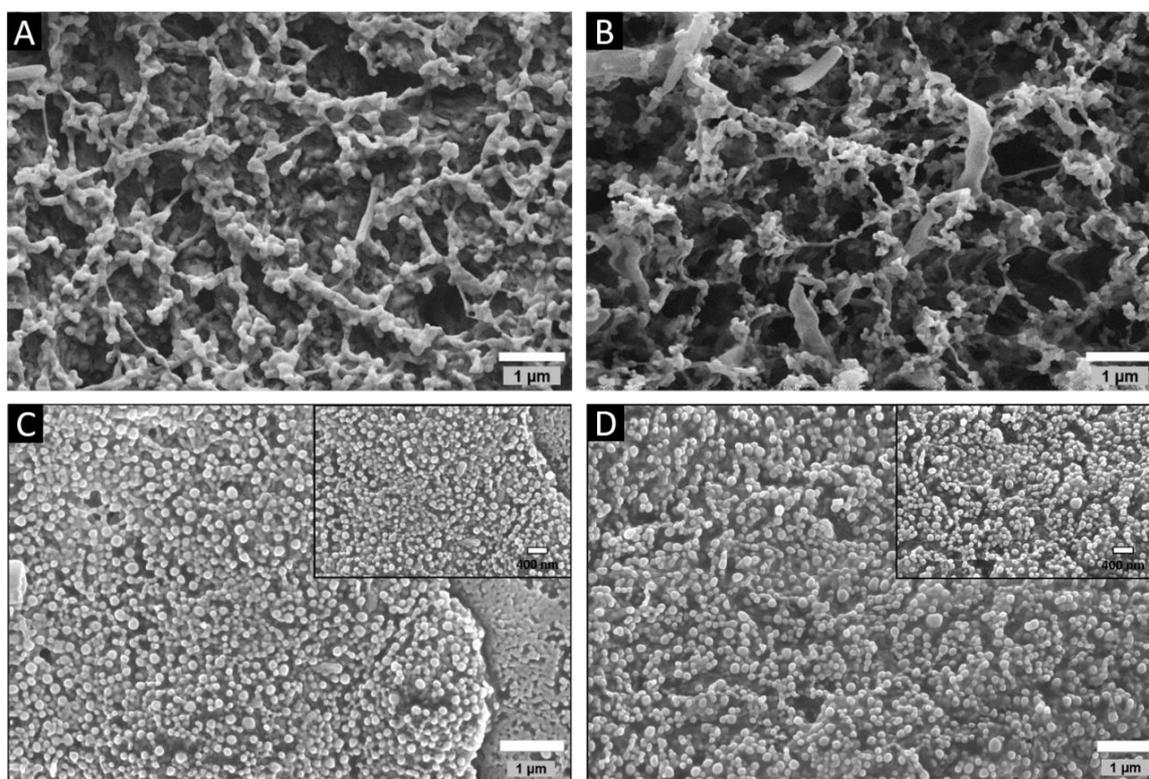


Figura 22. Morfología de nanoacarreadores funcionalizados. (A) PLGA/PVA/Ps80; (B) PLGA/PVA/Ps80/Rap; (C) PLGA/PVA/Plx188; (D) PLGA/PVA/Plx188/Rap.

18.2 Propiedades fisicoquímicas de los sistemas funcionalizados

18.2.1 Análisis de tamaño y potencial Z de los sistemas funcionalizados

La talla y potencial Z de los nanoacarreadores funcionalizados, PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Plx188, se muestran en la **Tabla 6**. El nanoacarreador PLGA/PVA/Ps80 sin esterilizar presentó una talla de 201.966 ± 1.343 nm (**Tabla 6A**) y no hubo cambios significativos con el nanoacarreador irradiado con luz UV. En la **Tabla 6B** se muestra el tamaño inicial de PLGA/PVA/Ps80/Rap con 231.5 ± 2.967 nm y después de la radiación UV se obtuvo un tamaño de 239.6 ± 2.702 nm. El PDI obtenido antes y después de la esterilización fue de alrededor de 0.1 y aunque es mayor que en PLGA/Ps80, este valor sigue indicando que tenemos aproximadamente el 90 % de los nanoacarreadores con el tamaño reportado. En cuanto al potencial Z, éste no tuvo prácticamente ningún cambio después de la esterilización, obteniendo una carga de -17.2 ± 0.153 mV después de 2 h de radiación UV.

El nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188 sin esterilizar tuvo un tamaño de 212.73 ± 4.87 nm y con un potencial Z de -17.66 ± 0.40 mV (**Tabla 6C**). Después de la esterilización por 2 h con luz UV, no se presenciaron cambios significativos ni en el tamaño ni en el potencial Z. Como se observa en la **Tabla 6D**, el nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188/Rap no se vio afectado después de la radiación UV, conservando un tamaño de 210.2 ± 4.12 nm y carga de -19.73 ± 0.115 mV en los nanoacarreadores esterilizados.

Tabla 6. Caracterización física de los nanoacarreadores antes y después de la esterilización con radiación UV durante 2 h.

A) PLGA/PVA/Ps80			
	Talla (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
<i>Control</i>	201.966 ± 1.343	0.0696 ± 0.036	-17.466 ± 0.25
<i>UV</i>	200.833 ± 0.602	0.083 ± 0.04	-17.9 ± 0.4
B) PLGA/PVA/Ps80/Rap			
	Talla (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
<i>Control</i>	231.5 ± 2.967	0.113 ± 0.005	-17.1 ± 0.231
<i>UV</i>	239.6 ± 2.702	0.115 ± 0.02	-17.2 ± 0.153
C) PLGA/PVA/Plx188			
	Talla (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
<i>Control</i>	212.73 ± 4.87	0.053 ± 0.02	-17.66 ± 0.40
<i>UV</i>	216.133 ± 6.5	0.047 ± 0.055	-18.266 ± 0.862
D) PLGA/PVA/Plx188/Rap			
	Talla (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
<i>Control</i>	211.86 ± 4.037	0.045 ± 0.017	-18.53 ± 0.288
<i>UV</i>	210.2 ± 4.12	0.06 ± 0.019	-19.73 ± 0.115

18.2.2 Análisis de infrarrojo para los sistemas funcionalizados

Para la caracterización química, se analizaron todos los excipientes usados para los nanoacarreadores PLGA/PVA/Ps80, PLGA/PVA/Ps80/Rap, PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap (**Figura 23**). El nanoacarreador PLGA/PVA/Ps80 presentó picos a las siguientes longitudes de onda: 2945 cm^{-1} , 1747 cm^{-1} , 1168 cm^{-1} y 1086 cm^{-1} que corresponden a PLGA y 1454 cm^{-1} , 1426 cm^{-1} y 1383 cm^{-1} , que corresponden a PVA. En

cuanto a PLGA/PVA/Ps80/Rap, éstas presentan los picos en 3216 cm^{-1} y 1022 cm^{-1} que corresponden a PVA y 2933 cm^{-1} , 1751 cm^{-1} y 1078 cm^{-1} que corresponden a PLGA (Figura 23A). En cuanto a PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap, Plx188 mostró un estiramiento en el enlace C-H (2881 cm^{-1}) y un estiramiento en C-O (1108 cm^{-1}).

Al analizar el FTIR de las formulaciones, se puede observar que el patrón de bandas de PLGA/PVA/Plx188 (2953 cm^{-1} , 2947 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} , 1386 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} y 1082 cm^{-1}) y PLGA/PVA/Plx188/Rap (2953 cm^{-1} , 2947 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} , 1386 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} y 1082 cm^{-1}) es muy similar y que además éste coincide con el IR del PLGA en la mayoría de las bandas como 2953 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} y 1082 cm^{-1} (Figura 23B).

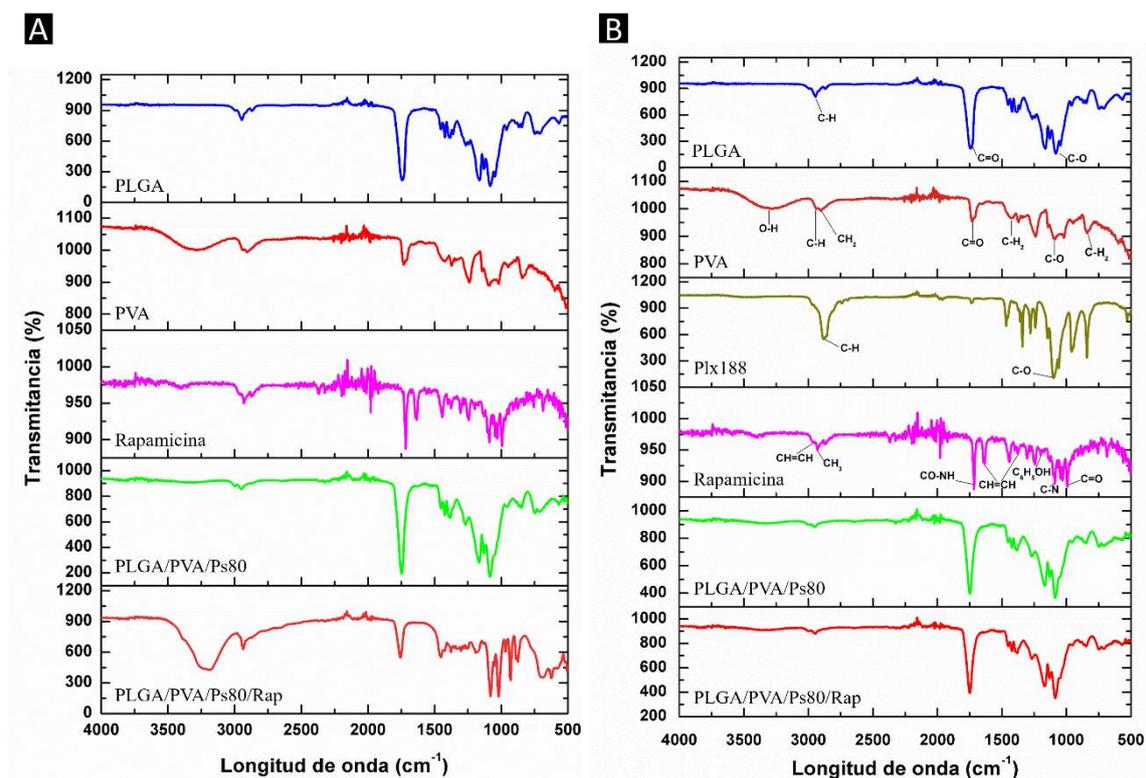


Figura 23. Espectro infrarrojo de los excipientes y los nanoacarreadores funcionalizados. (A) FTIR de los excipientes, PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap; (B) FTIR de los excipientes, PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap.

18.2.3 Análisis termogravimétrico de los nanoacarreadores funcionalizados

El Ps80 mostró una degradación térmica simple entre 331 °C y 443 °C (Figura 24A y Figura 24C). En el caso de las formulaciones, la temperatura de degradación que presentó la formulación de PLGA/PVA/Ps80 fue de 207 °C a 307 °C y para PLGA/PVA/Ps80/Rap fue de 205 °C a 278 °C .

En cuanto a los nanoacarreadores PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap (Figura 24B y Figura 24C), Plx188 presentó una pérdida de peso de 252 °C a 367 °C , PLGA/PVA/Plx188 inició su descomposición en 216 °C hasta 329 °C y PLGA/PVA/Plx188/Rap inició su descomposición en 216 °C y terminó en 326 °C .

Ambas formulaciones, con rapamicina y sin rapamicina, presentaron una menor temperatura de degradación en las formulaciones en comparación con los excipientes.

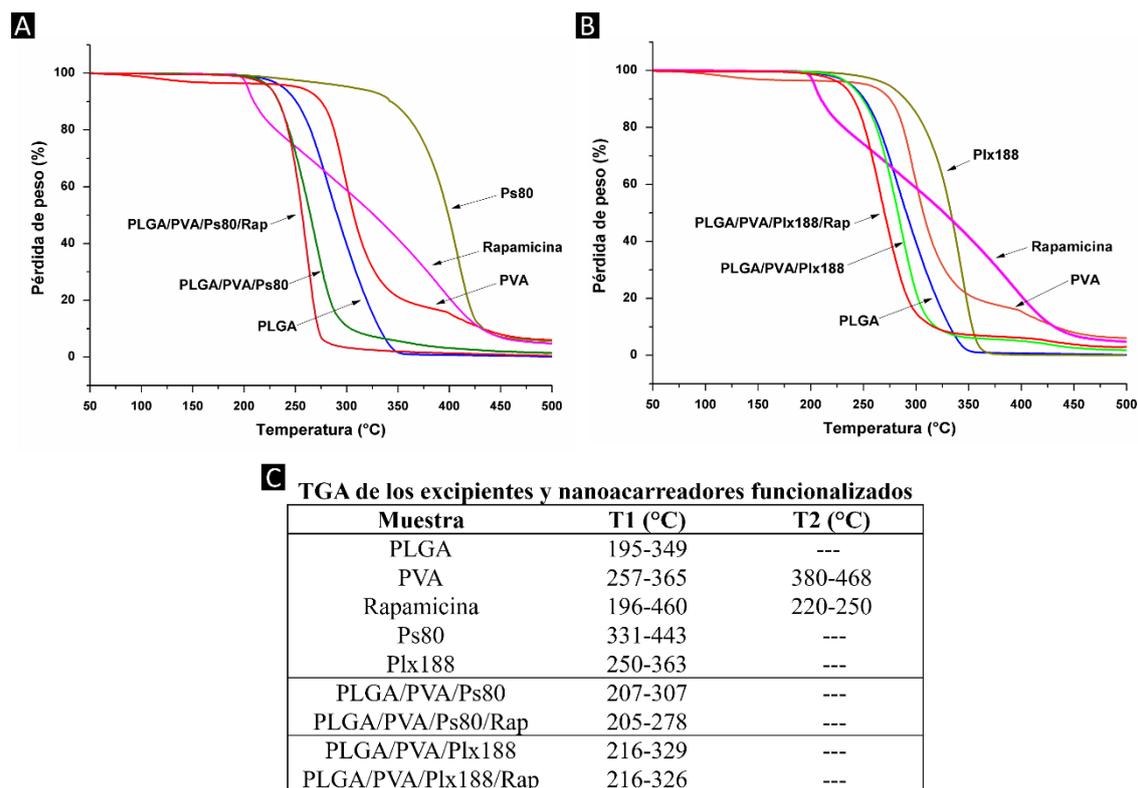


Figura 24. Análisis termogravimétrico de los excipientes y los nanoacarreadores funcionalizados. (A) Termograma de excipientes, PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap; (B) Termograma de excipientes, PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap; (C) Tabla con temperaturas de descomposición

18.2.4. Propiedades térmicas de los nanoacarreadores funcionalizados

Los eventos térmicos se presentan en la [Figura 25](#), donde se observan los cambios clásicos en la entalpía debido a las propiedades físicas y químicas de cada material en función de la temperatura.

En las formulaciones PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap ([Figura 25A](#) y [Figura 25C](#)), el surfactante Ps80 sufrió 2 cambios térmicos a las temperaturas de 121 °C y 124 °C, más otro pequeño cambio exotérmico a los 149 °C. En PLGA/PVA/Ps80 se presentaron cambios endotérmicos a los 154 °C y 165 °C y en PLGA/PVA/Ps80/Rap se presentaron dos cambios de entalpía a 155 °C y 166 °C. Para ambas formulaciones, estos picos se asemejan al fenómeno presentado en PVA.

En cuanto a los nanoacarreadores PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap ([Figura 25B](#) y [Figura 25C](#)), el surfactante Plx188 presentó una Tg de 56 °C. Además, el nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188 presentó un pico a los 54 °C, correspondiendo a la Tg de PLGA y un segundo patrón a 156 °C y 166 °C, los cuales podrían corresponder a la Tm de PVA y Tm de PLGA, respectivamente. En el nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188/Rap se observaron los picos endotérmicos a 53 °C, 155 °C y 165 °C, los cuales podrían corresponder a la Tg de PLGA, Tm de PVA y Tm de PLGA, respectivamente.

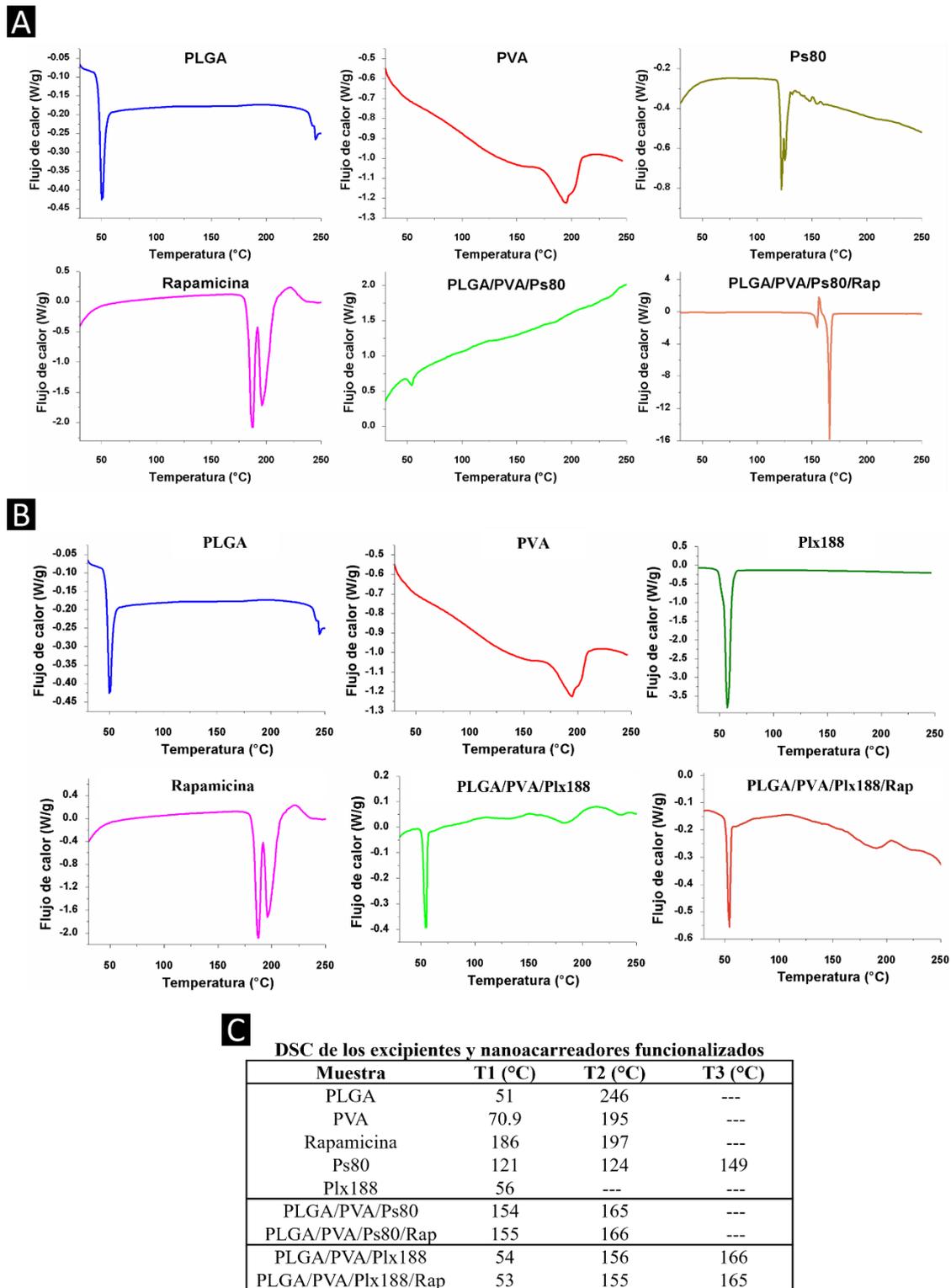


Figura 25. Calorimetría diferencial de barrido de los excipientes y los nanoacarreadores funcionalizados. **A)** Análisis térmico de excipientes, PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap; **B)** Análisis térmico de excipientes, PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap; **(C)** Tabla con temperaturas de los cambios térmicos.

18.3 Estabilidad de los nanoacarreadores funcionalizados en dispersión

En la *Tabla 7* se presentan los resultados del estudio de estabilidad. Durante ambas condiciones de almacenamiento, no se observó floculación o coalescencia de los nanoacarreadores y el PDI no demostró modificaciones importantes. No obstante, se evidenció un decremento en el tamaño de partícula directamente proporcional con el tiempo, lo cual probablemente se debe a la degradación normal de los nanoacarreadores mediante hidrólisis. El PDI presentó valores inferiores a 0.1, lo que sugiere alta homogeneidad en la población de partículas y una distribución monomodal. El potencial Z también presentó un ligero cambio con el paso de las semanas, alcanzando una disminución de 3 mV después de 6 meses en dispersión.

Tabla 7. Estabilidad de los nanoacarreadores PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Plx188 almacenados a 4 °C y temperatura ambiente

PLGA/PVA/Ps80			
A) 4 °C	Talla (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
<i>Tiempo inicial</i>	209.9 ± 2.715	0.091 ± 0.015	-16.5 ± 0.153
<i>4 semanas</i>	208.1 ± 1.457	0.05 ± 0.047	-18.7 ± 0.529
<i>8 semanas</i>	207.4 ± 3.602	0.032 ± 0.022	-20.3 ± 0.451
<i>12 semanas</i>	204.2 ± 1.328	0.088 ± 0.043	-18.3 ± 0.057
<i>24 semanas</i>	192 ± 1.873*	0.047 ± 0.028	-15 ± 0.321
B) Temp. amb			
<i>Tiempo inicial</i>	210.8 ± 2.095	0.054 ± 0.023	-18.5 ± 0.153
<i>4 semanas</i>	204.4 ± 3.873*	0.032 ± 0.023	-19.5 ± 0.874
<i>8 semanas</i>	199.2 ± 1.721*	0.072 ± 0.047	-18.1 ± 0.651
<i>12 semanas</i>	191.1 ± 2.06*	0.055 ± 0.024	-15.3 ± 0.208
<i>24 semanas</i>	190.3 ± 2.417*	0.029 ± 0.035	-11.3 ± 0.289
* <i>p</i> < 0.05			
PLGA/PVA/Plx188			
C) 4 °C	Talla (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
<i>Tiempo inicial</i>	223.4 ± 3.811	0.058 ± 0.008	-16.4 ± 0.404
<i>4 semanas</i>	226.5 ± 5.074	0.031 ± 0.03	-17.9 ± 0.436
<i>8 semanas</i>	221 ± 7.016	0.048 ± 0.031	-20.6 ± 0.503
<i>12 semanas</i>	217.2 ± 4.359	0.079 ± 0.037	-19.3 ± 0.755
<i>24 semanas</i>	205.7 ± 2.723*	0.037 ± 0.019	-14 ± 0.379
D) Temp. amb			
<i>Tiempo inicial</i>	215.4 ± 4.153	0.05 ± 0.029	-17.8 ± 0.451
<i>4 semanas</i>	217 ± 3.009	0.046 ± 0.038	-19 ± 0.265
<i>8 semanas</i>	214.2 ± 2.084	0.034 ± 0.016	-17.6 ± 0.361
<i>12 semanas</i>	205 ± 1.992*	0.05 ± 0.022	-19 ± 2.46
<i>24 semanas</i>	205.5 ± 2.06*	0.057 ± 0.021	-12.2 ± 0.115
* <i>p</i> < 0.05			

18.4. Perfil de liberación de los nanoacarreadores funcionalizados

Al igual que la liberación de la rapamicina a partir del nanoacarreador PLGA/PVA mencionado anteriormente, la liberación del fármaco desde los nanoacarreadores PLGA/PVA/Ps80/Rap y PLGA/PVA/Plx188/Rap, presentaron un comportamiento

bifásico en ambas formulaciones. La liberación de rapamicina a partir de PLGA/PVA/Ps80/Rap se muestra en la [Figura 26A](#). Aquí cabe destacar que, después de 0.5 h de iniciado el ensayo de liberación se logra liberar un $9.51 \% \pm 3.3263$; a las 1.5 h se ha liberado un $19.31 \% \pm 3.4605$ y a las 72 h se alcanza la liberación del $50.64 \% \pm 4.2945$. Además, la eficiencia de entrapamiento fue del 34.7 %.

Por otro lado, la liberación de rapamicina a partir de PLGA/PVA/Plx188/Rap logró la estabilidad de la pendiente elevada de liberación después de las 5 h, donde la liberación del fármaco empieza a tener una salida lenta y gradual ($47.46 \% \pm 0.6903$ a las 7 h) hasta alcanzar un $82.25 \% \pm 4.8266$ a las 97 h ([Figura 26B](#)). De manera interesante, esta formulación presentó una mayor EE con un 43.64 %.

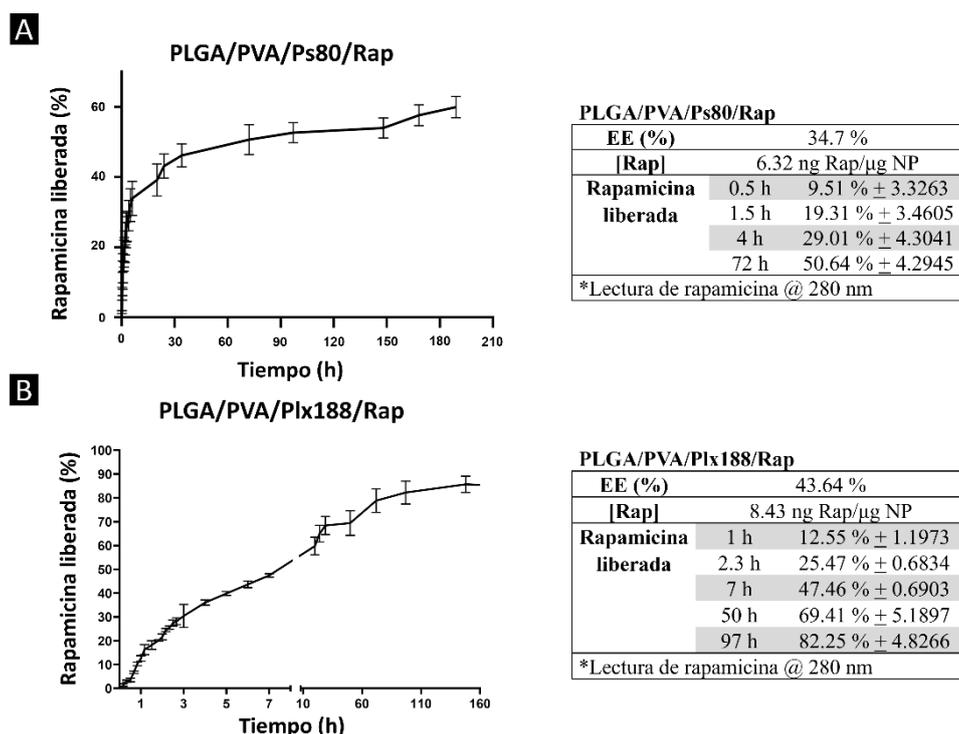


Figura 26. Perfil de liberación de los nanoacarreadores funcionalizados. **(A)** Perfil de liberación de rapamicina y el porcentaje de entrapamiento de PLGA/PVA/Ps80/Rap; **(B)** Perfil de liberación de rapamicina y el porcentaje de entrapamiento de PLGA/PVA/Plx188/Rap.

18.4.1 Modelos matemáticos

El modelo de predicción de la liberación del fármaco tanto para PLGA/PVA/Ps80/Rap como para PLGA/PVA/Plx188/Rap, se ajustó a la ecuación de Korsmeyer-Peppas ([Figura 27](#)). Como se puede observar con PLGA/PVA/Ps80/Rap en la [Figura 27A](#), el modelo matemático de Higuchi tiene un coeficiente de correlación (R^2) de 0.92, pero un valor de 0.97 para el modelo Korsmeyer-Peppas.

En la [Figura 27B](#), los valores de R^2 para el modelo Higuchi y Korsmeyer-Peppas son muy similares (0.94 y 0.96) para PLGA/PVA/Plx188/Rap. El efecto “burst” mencionado anteriormente tiene una liberación lineal, por lo que, al analizar esa región con los modelos matemáticos, el modelo que mejor se ajustó fue al modelo orden cero.

A

Perfil de liberación de rapamicina ajustado a modelos matemáticos				
Modelos Matemáticos	Ecuación	R ²	K	n
Orden cero	$Q_t = Q_0 + K_0 t$	0.81	0.43	0
Primer orden	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$	0.61	0.02	0
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$	0.92	5.82	0
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_\infty = K_k t^n$	0.97	17.66	0.23

Q_t : cantidad de fármaco liberado en el tiempo t ; Q_0 : cantidad inicial de fármaco en la forma de dosificación; Q_∞ : cantidad total de fármaco disuelto cuando la forma de dosificación se agota; K_0 , K_1 , K_H , K_s , K_k : constantes de tasa de liberación; n : exponent de liberación (indicador del mecanismo de liberación del fármaco).

B

Perfil de liberación de rapamicina ajustado a modelos matemáticos				
Modelos Matemáticos	Ecuación	R ²	K	n
Orden cero	$Q_t = Q_0 + K_0 t$	0.83	2.13	0
Primer orden	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$	0.52	0.066	0
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$	0.94	15.60	0
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_\infty = K_k t^n$	0.96	23.57	0.37

Perfil de liberación de rapamicina (efecto explosión)				
Modelos matemáticos	Ecuación	R ²	K	n
Orden cero	$Q_t = Q_0 + K_0 t$	0.99	14.01	0
Primer orden	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$	0.85	1.32	0
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$	0.99	19.89	0
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_\infty = K_k t^n$	0.99	15.05	0.91

Q_t : cantidad de fármaco liberado en el tiempo t ; Q_0 : cantidad inicial de fármaco en la forma de dosificación; Q_∞ : cantidad total de fármaco disuelto cuando la forma de dosificación se agota; K_0 , K_1 , K_H , K_s , K_k : constantes de tasa de liberación; n : exponent de liberación (indicador del mecanismo de liberación del fármaco).

Figura 27. Modelos matemáticos analizados para la liberación del fármaco a partir de los nanoacarreadores funcionalizados. **(A)** Modelos matemáticos analizados para la liberación de rapamicina a partir de PLGA/PVA/Ps80/Rap; **(B)** Modelos matemáticos analizados para la liberación de rapamicina a partir de PLGA/PVA/Plx188/Rap.

19. Internalización de los nanoacarreadores funcionalizados

En el caso de las células MIO-M1, se observa la internalización de PLGA/PVA/Ps80/C6, la cual es comparable con el control que tiene sólo C6. En el caso de SH-SY5Y, se observa que incluso hay una mayor internalización de PLGA/PVA/Ps80/C6 que de C6, con lo que se concluye que los nanoacarreadores pueden internalizar a esta línea celular de manera más eficiente (Figura 28A y Figura 28B).

Después del tratamiento con el nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188/C6 durante 2 h, se comprobó la internalización exitosa en ambas líneas celulares (Figura 28C y Figura 28D). De manera interesante, en las células SH-SY5Y se observó una mayor internalización de la molécula C6 previamente encapsulada en el nanoacarreador que la molécula sola, lo cual sugiere que PLGA/PVA/Plx188 puede internalizar a las células y además con mayor eficacia que una molécula lipofílica.

20. Citotoxicidad de los nanoacarreadores funcionalizados

20.1 Morfología celular

Después del tratamiento con PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVAPs80/Rap durante 72 h (Figura 29A) en las células MIO-M1, no se observan cambios morfológicos relevantes con excepción de las células tratadas con PLGA/PVAPs80/Rap a 150 $\mu\text{g/mL}$, donde las células tienen un ligero cambio morfológico, siendo éstas ligeramente más redondas. En el caso de las células SH-SY5Y (Figura 29B), no se ven cambios morfológicos aun después del tratamiento con PLGA/PVA/Ps80/Rap.

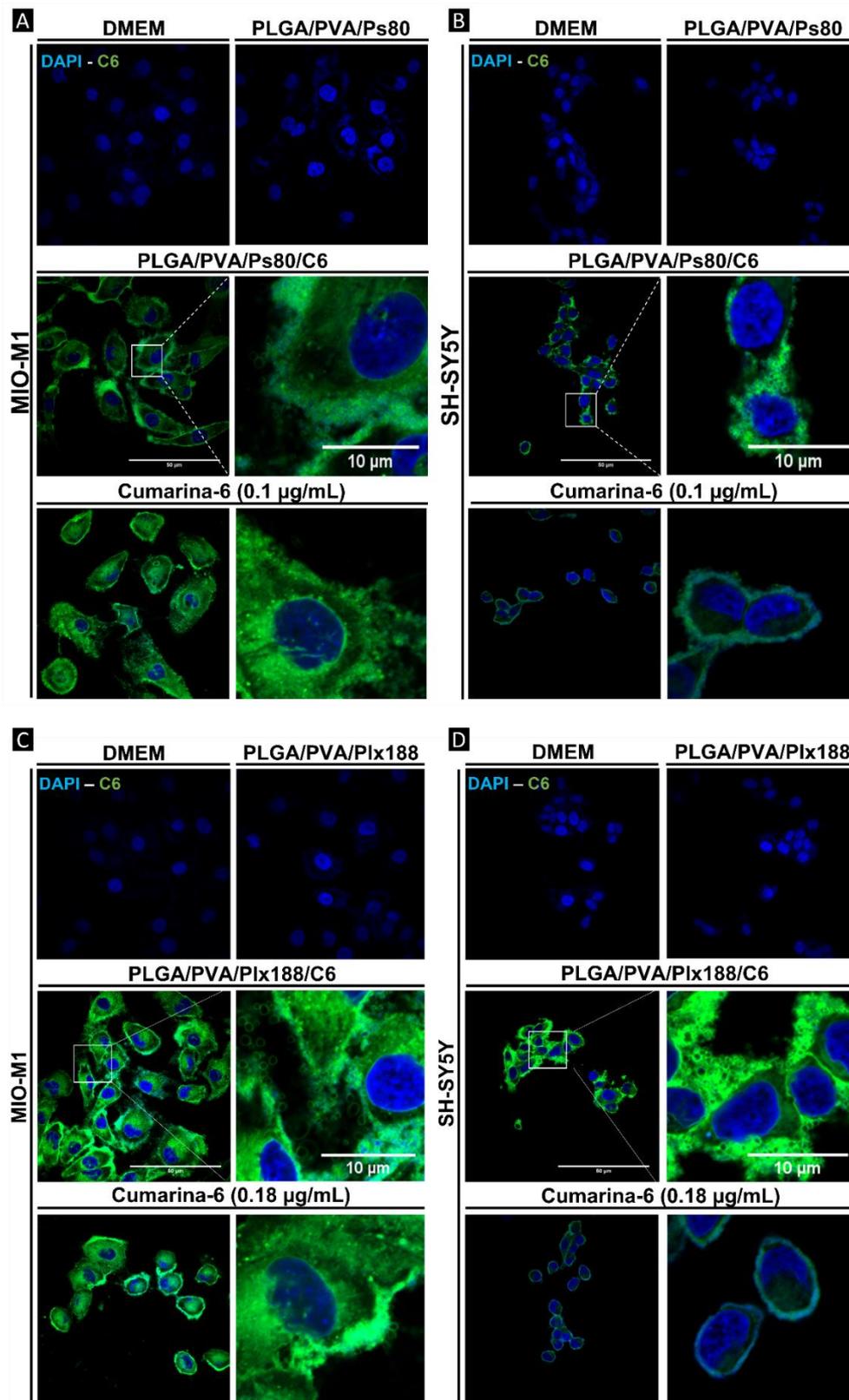


Figura 28. Internalización *in vitro* de los nanoacarreadores funcionalizados después del tratamiento con 150 $\mu\text{g/mL}$ durante 2.5 h. **(A)** Internalización de PLGA/PVA/Ps80/C6 en las células MIO-M1; **(B)** Internalización de PLGA/PVA/Ps80/C6 en las células SH-SY5Y; **(C)** Internalización de PLGA/PVA/Plx188/C6 en las células MIO-M1; **(D)** Internalización de PLGA/PVA/Plx188/C6 en las células SH-SY5Y.

Por otro lado, en las células MIO-M1 el tratamiento con PLGA/PVA/Plx188 no parece tener un efecto negativo (Figura 29C). En el caso del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap, se observa una ligera reducción en el tamaño de las células MIO-M1. En cambio, en las células SH-SY5Y (Figura 29D) no se observaron cambios morfológicos después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap.

20.2 Efecto en la viabilidad celular después del tratamiento con nanoacarreadores funcionalizados

El tratamiento con PLGA/PVA/Ps80 en las células MIO-M1 durante 24 h no disminuyó la viabilidad celular, pero con el tratamiento de 72 h empezó a disminuir la viabilidad celular de manera estadísticamente significativa a partir de 500 µg/mL, alcanzando una disminución en la viabilidad celular hasta el ~70 % (Figura 30A). El tratamiento con PLGA/PVA/Ps80/Rap no disminuyó la viabilidad celular después del tratamiento durante 72 h. En cambio, el tratamiento durante 24 h mostró una disminución en la viabilidad celular de manera estadísticamente significativa (Figura 30B). A pesar de que la disminución en la viabilidad celular se observó en mayor medida a altas concentraciones, para alcanzar una concentración terapéutica de la rapamicina se requiere una concentración de 30 µg/mL del nanoacarreador PLGA/PVA/Ps80/Rap. El tratamiento con PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap en la línea celular SH-SY5Y no disminuyó la viabilidad celular después de la exposición por 24 h ni 72 h (Figura 30C; Figura 30D).

Por otro lado, el nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188 no disminuyó la viabilidad celular de las células MIO-M1 a concentraciones terapéuticas durante 24 h y 72 h, pero sí se observa una disminución en la viabilidad celular conforme aumenta la concentración de PLGA/PVA/Plx188, alcanzando una viabilidad celular del ~70 % y ~50 % para el tratamiento durante 24 h y 72 h, respectivamente (Figura 30E). En el caso del nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188/Rap, la viabilidad celular se mantuvo en ~100 % incluso a altas concentraciones y durante 24 h y 72 h (Figura 30F). En las células SH-SY5Y, la viabilidad celular disminuyó de manera estadísticamente significativa con el tratamiento de PLGA/PVA/Plx188 colocadas durante 72 h en comparación con el tratamiento durante 24 h (Figura 30G). En cambio, con PLGA/PVA/Plx188/Rap, la viabilidad se mantuvo por encima del 90 % con el tratamiento durante 24 h, pero disminuyó después de 72 h de tratamiento, aunque dicho cambio no fue estadísticamente significativo (Figura 30H).

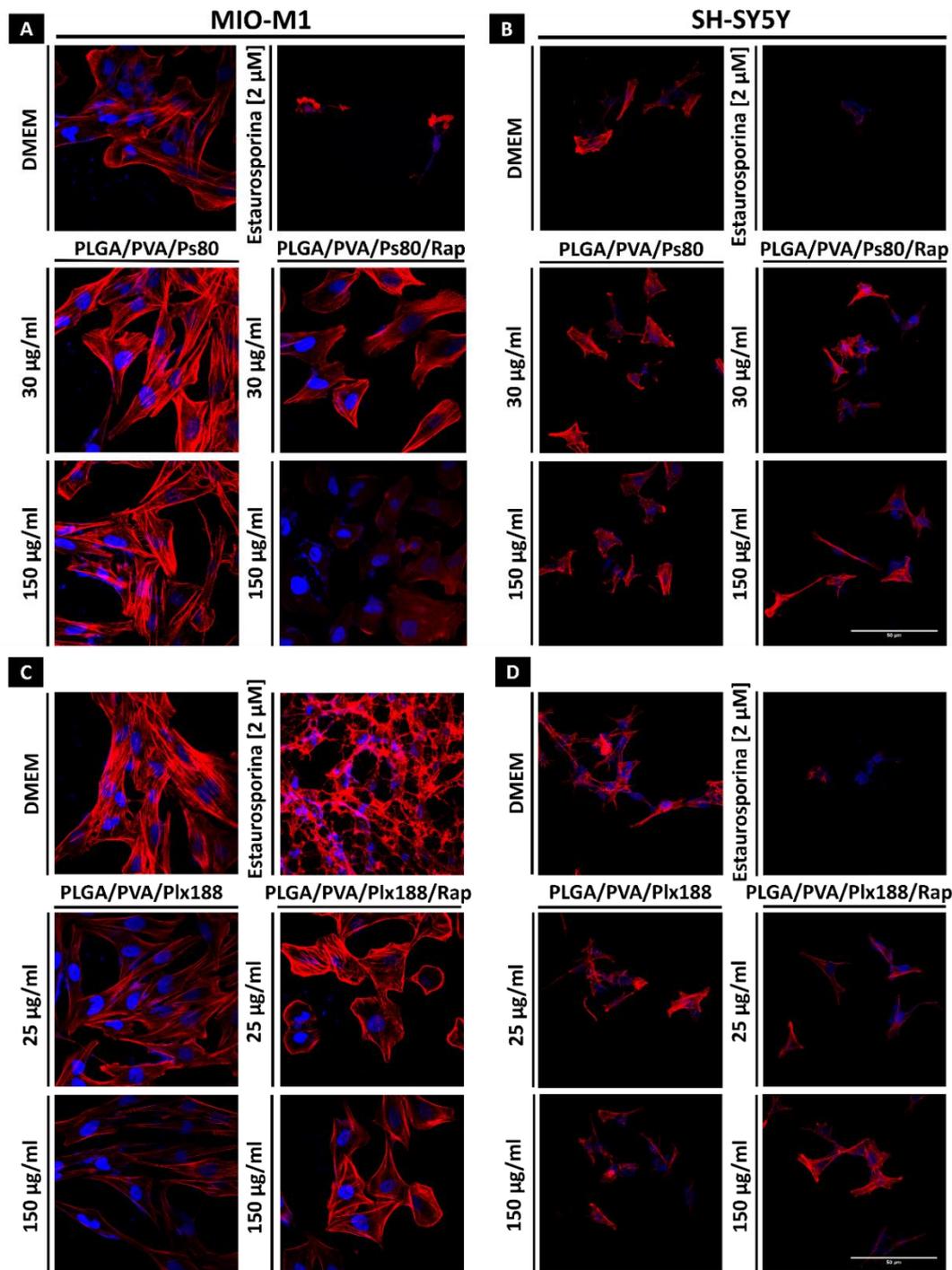


Figura 29. Morfología celular con tinción de F-actina después del tratamiento con los nanoacarreadores funcionalizados con y sin fármaco. **(A)** Tinción de células MIO-M1 después del tratamiento con PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap a las concentraciones de 30 µg/mL y 150 µg/mL durante 72 h; **(B)** Tinción de células SH-SY5Y después del tratamiento con PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap a las concentraciones de 30 µg/mL y 150 µg/mL durante 72 h; **(C)** Tinción de células MIO-M1 después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap a las concentraciones de 25 µg/mL y 150 µg/mL durante 72 h; **(D)** Tinción de células SH-SY5Y después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap a las concentraciones de 25 µg/mL y 150 µg/mL durante 72 h.

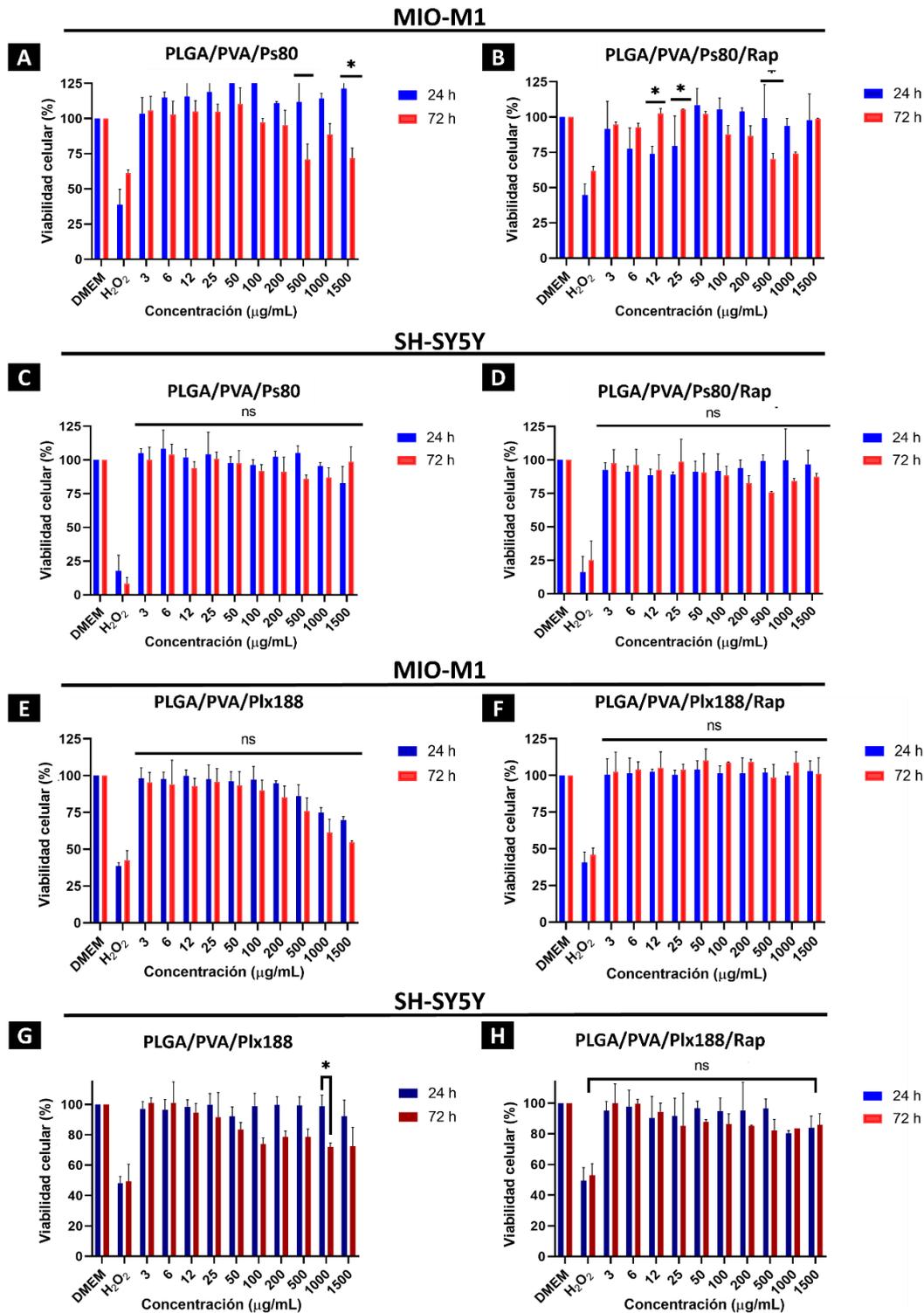


Figura 30. Citotoxicidad de los nanoacarreadores funcionalizados a concentraciones terapéuticas y altas concentraciones. (A) Tratamiento en células MIO-M1 con PLGA/PVA/Ps80 durante 24 h y 72 h; (B) Tratamiento en células MIO-M1 con PLGA/PVA/Ps80/Rap durante 24 h y 72 h; (C) Tratamiento en células SH-SY5Y con PLGA/PVA/Ps80 durante 24 h y 72 h; (D) Tratamiento en células SH-SY5Y con PLGA/PVA/Ps80/Rap durante 24 h y 72 h.; (E) Tratamiento en células MIO-M1 con PLGA/PVA/Plx188 durante 24 h y 72 h; (F) Tratamiento en células MIO-M1 con PLGA/PVA/Plx188/Rap durante 24 h y 72 h; (G) Tratamiento en células SH-SY5Y con PLGA/PVA/Plx188 durante 24 h y 72 h. (H) Tratamiento en células SH-SY5Y con PLGA/PVA/Plx188/Rap durante 24 h y 72 h. (Prueba t-student; $\alpha = 0.05$).

20.3 Efecto en apoptosis después del tratamiento con los nanoacarreadores funcionalizados

20.3.1 Activación de apoptosis de inicio temprano y tardío en células MIO-M1

Después del tratamiento con los nanoacarreadores con fármaco y sin fármaco a 2 concentraciones durante 72 h, se puede concluir que PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap (Tabla 8A), así como PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap (Tabla 8B), no causan apoptosis, es decir que son inocuas en las células MIO-M1.

Tabla 8. Ensayo de apoptosis con la marca anexina V y 7-AAD en células MIO-M1

A) Células MIO-M1 con tratamiento PLGA/PVA/Ps80 o PLGA/PVA/Ps80/Rap				
Tratamiento ($\mu\text{g/mL}$)	Vivas (%)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis tardía (%)	Muertas (%)
DMEM	99.18	0.02	0.40	0.40
Estauosporina (2 μM)	24.15	4.95	50.15	20.75
PLGA/PVA/Ps80 (30)	91.80	8.20	0	0
PLGA/PVA/Ps80 (150)	94.55	5.35	0.10	0
PLGA/PVA/Ps80/Rap (30)	92.65	7.30	0.05	0
PLGA/PVA/Ps80/Rap (150)	89.35	10.60	0.05	0
B) Células MIO-M1 con tratamiento PLGA/PVA/Plx188 o PLGA/PVA/Plx188/Rap				
Tratamiento ($\mu\text{g/mL}$)	Vivas (%)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis tardía (%)	Muertas (%)
DMEM	99.18	0.02	0.40	0.40
Estauosporina (2 μM)	24.15	4.95	50.15	20.75
PLGA/PVA/Plx188 (25)	90.55	9.40	0.05	0
PLGA/PVA/Plx188 (150)	89.95	9.75	0.25	0.05
PLGA/PVA/Plx188/Rap (25)	88.25	11.55	0.20	0
PLGA/PVA/Plx188/Rap (150)	87.55	12.20	0.25	0

20.3.2 Activación de la caspasa-3 y caspasa-9 después del tratamiento con los nanoacarreadores funcionalizados en las células MIO-M1

En la Figura 31A y Figura 31B se puede corroborar que no hay activación de la caspasa-3 después del tratamiento con ambos nanoacarreadores con y sin rapamicina en las células MIO-M1, concluyendo que ambas formulaciones son eficaces como vehículo del fármaco rapamicina, ya que no causan citotoxicidad.

Además, después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap, se buscó la presencia de caspasa-9 como indicador de apoptosis de inicio temprano. En la Figura 31C se observa que después de 72 h de tratamiento con los nanoacarreadores, no hay activación de caspasa-9 incluso a altas concentraciones. Todos los controles (+) muestran la activación de caspasas por la inducción con estauosporina, mostrando la presencia de caspasas activas.

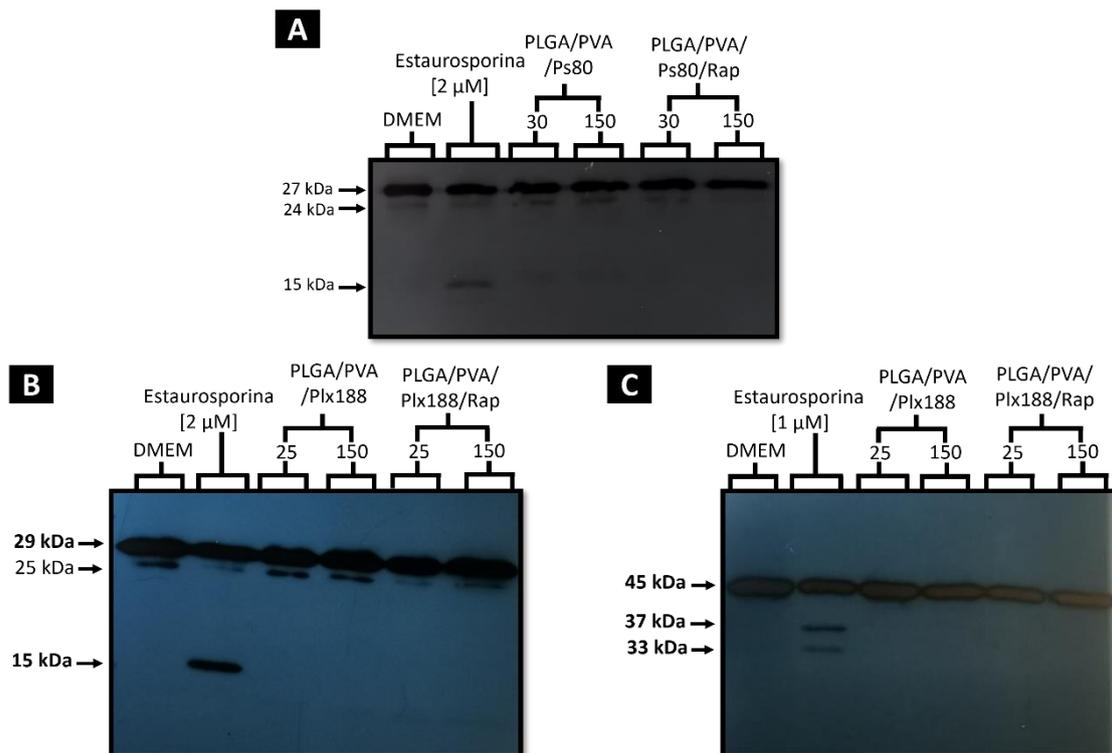


Figura 31. Caspasa-3 y caspasa-9 después del tratamiento con nanoacarreadores funcionalizados a concentración terapéutica y alta concentración en línea celular MIO-M1 durante 72 h. **(A)** Caspasa-3 después del tratamiento con PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap; **(B)** Caspasa-3 después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap; **(C)** Caspasa-9 después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap.

21. Validación del modelo celular inducible para SCA7

Hasta este punto, se probó que los nanoacarreadores funcionalizados no son tóxicos y son adecuados para su potencial uso para el tratamiento de la enfermedad SCA7. A continuación, se seleccionó al sistema PLGA/PVA/Plx188/Rap para el tratamiento del modelo celular inducible de SCA7 debido a que presentó una mayor EE y además se pudo cuantificar casi el 100 % de la rapamicina liberada casi a los 4 días, convirtiendo a este nanoacarreador el más prometedor para probar el efecto terapéutico en el tratamiento de SCA7 en un modelo *in vitro*.

21.1 Determinación de la concentración óptima de doxiciclina para la inducción del modelo *in vitro*

En la **Figura 32** se muestra la curva de doxiciclina para la inducción del transgen de *ATXN7*. A muy bajas concentraciones de doxiciclina (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no se observó la formación de agregados en el modelo que contiene el transgen *ATXN7/Q10* y con el transgen de *ATXN7/64Q* apenas se logró ver un agregado en la imagen representativa. Debido al número de agregados proteicos, se seleccionó la concentración de doxiciclina de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ya que resultó ser la más reproducible para analizar el efecto de las células con SCA7.

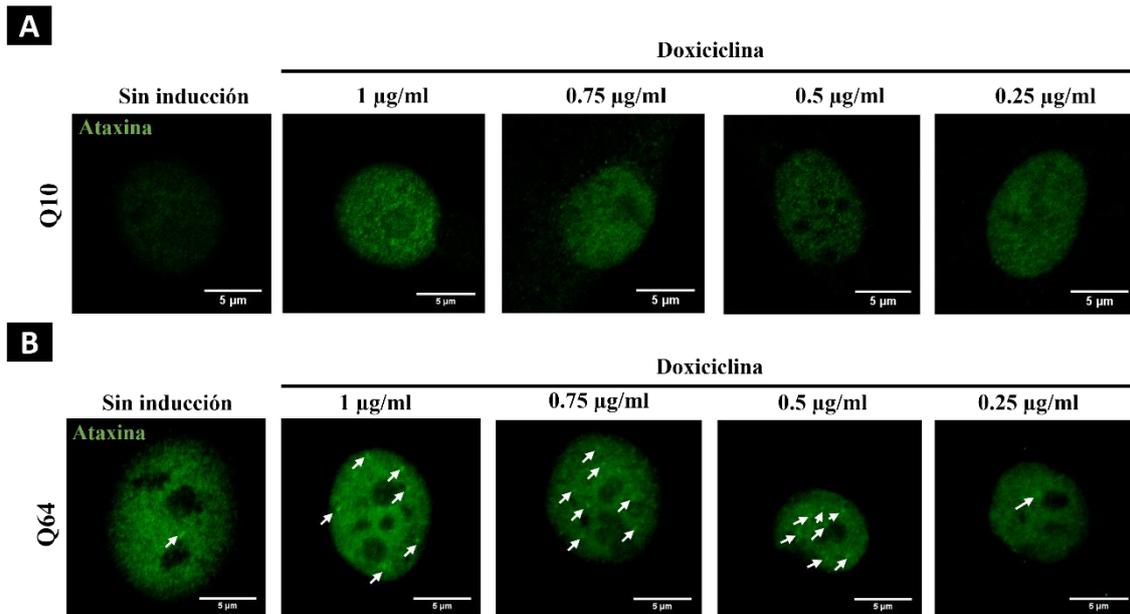


Figura 32. Curva de doxiciclina para la inducción del transgen *ATXN7*. **(A)** Modelo celular con transgen *ATXN7/Q10*; **(B)** Modelo celular con transgen *ATXN7/Q64*. La inducción para la expresión del transgen se realizó con doxiciclina en un rango de 0.25-1 µg/mL. La inmunofluorescencia con el anticuerpo α -ataxina-7 mostró los agregados de ataxina-7 formados (flechas).

21.2 Validación del modelo celular inducible

En la **Figura 33** se muestra el modelo celular inducible con los genes de interés *ATXN7/Q10* o *ATXN7/Q64*. En la figura se comprueba que, al no realizar la inducción con doxiciclina, no se lleva a cabo la expresión del transgen *ATXN7*. En cambio, después de la inducción con doxiciclina, se observa la expresión de *ATXN7*. La señal de c-Myc, la cual colocaliza con *ATXN7*, indica que la presencia de *ATXN7* es la inducida por doxiciclina, es decir la exógena. Cabe resaltar que, en la caracterización del modelo celular inducible, se verificó un aumento en la expresión de *ATXN7* a través de qRT-PCR a nivel de transcrito, así como de la presencia de la proteína normal y mutante a través de inmunoblot.

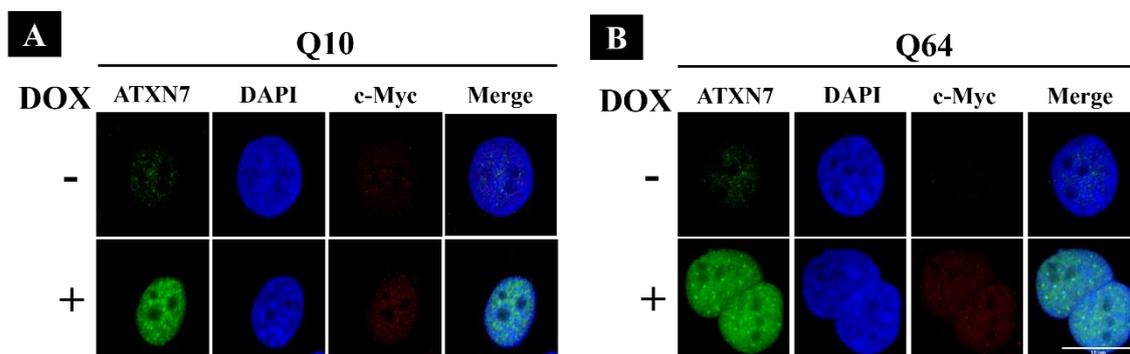


Figura 33. Modelo celular inducible con la mutación *ATXN7-Q64* o *ATXN7-Q10*. **A)** Modelo celular inducible con *ATXN7/Q10* sin inducir o con 1 µg/mL de doxiciclina; **B)** Modelo celular inducible con *ATXN7/Q64* sin inducir o con 1 µg/mL. La marca c-Myc nos indica la presencia de la proteína de ataxina-7 exógena.

21.2.1 Apoptosis en modelo celular inducible

En la Figura 34 se presenta el WB realizado con los extractos proteicos del modelo celular con diferentes tiempos de inducción. En la Figura 34, la procaspasa-9, enzima inactiva, está presente en todos los carriles con un peso de 48 kDa. En cambio, en el carril d) se observa la presencia de caspasa-9, enzima activa, con los pesos de 34 kDa y 37 kDa.

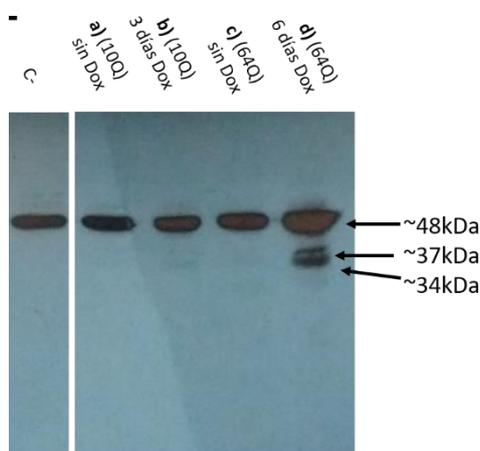


Figura 34. Apoptosis en modelo celular inducible con la mutación *ATXN7-Q64* o *ATXN7-Q10*. **A)** WB con proteína del modelo celular inducible con 10Q y 64Q, sin Dox y con Dox, con el anticuerpo α -caspasa3; **B)** WB con proteína del modelo celular inducible con 10Q y 64Q, sin Dox y con Dox, con el anticuerpo α -caspasa9.

22. Eficiencia Terapéutica del nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188/Rap en el modelo celular inducible

22.1 Efecto del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap en el modelo celular inducible

Posterior a la verificación de que la inducción del modelo celular con 1 $\mu\text{g/mL}$ de doxiciclina durante 24 h forma agregados proteicos de ataxina-7 en la clona que contiene 64Q (Figura 33), se decidió analizar el efecto del sistema nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188/Rap.

A continuación, se probó el tratamiento con el nanoacarreador de PLGA/PVA/Plx188/Rap, utilizando la concentración terapéutica de 25 $\mu\text{g/mL}$ en el modelo celular inducible con 64Q, el cual tiene presencia de agregados proteicos.

22.1.1 Activación del sistema de autofagia a través de la administración de PLGA/PVA/Plx188/Rap

Con la finalidad de evaluar la actividad autofágica en el modelo celular inducible de MIO-M1 (Q64) tras la aplicación los tratamientos con los nanoacarreadores PLGA/PVA/Plx188, PLGA/PVA/Plx188/Rap o rapamicina sola (control positivo de la inducción de la actividad autofágica), inhibimos la autofagia con cloroquina (CQ) para bloquear la fusión de los autofagosomas con los lisosomas y teñimos los autofagosomas con anticuerpos contra la proteína LC3 (marcador de autofagosomas) para la evaluación de su acumulación mediante ensayos de inmunofluorescencia. En el modelo celular inducible con el transgen *ATXN7-Q64*, posterior al tratamiento con cloroquina junto con

la administración de PLGA/PVA/Plx188/Rap o rapamicina, fue muy evidente la señal obtenida de activación de autofagia por la sonda GFP-LC3-RFP-LC3ΔG, en comparación con el sistema vacío. Esto verifica que tanto la rapamicina sola como el sistema nanoacarreador pueden activar el sistema de autofagia con la finalidad de disminuir agregados proteicos anormales (Figura 35).

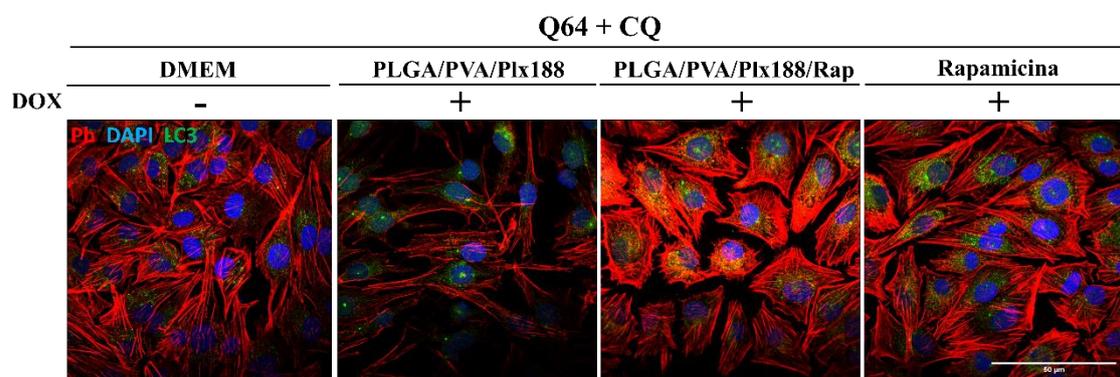


Figura 35. Inducción de autofagia. Pretratamiento con cloroquina en las células con el transgen *ATXN7*-Q64 y su posterior tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap o rapamicina resultó en la recuperación del sistema de autofagia previamente inhibido con cloroquina. Se utilizó la sonda GFP/LC3/RFP/(LC3ΔG), la cual libera la proteína GFP en presencia de autofagia. Se realizó una co-tinción con faloidina (Ph).

22.1.2 Eliminación de agregados proteicos

En la Figura 36A se muestra el tratamiento en el modelo celular inducible con 64Q. Después del tratamiento con el sistema nanoacarreador vacío (PLGA/PVA/Plx188) se observan agregados proteicos nucleares. Por otro lado, claramente se ve que después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap, disminuyen significativamente los agregados de ataxina-7. De manera interesante, la rapamicina sola presenta también la eliminación los agregados de ataxina-7, sin embargo, prácticamente en todos los campos analizados, las células presentaron micronúcleos y núcleos deformes posiblemente como efecto tóxico de la rapamicina. Así mismo, las células tratadas con rapamicina presentaron mayores niveles de citotoxicidad (datos no mostrados).

La Figura 36B representa la cuantificación de los agregados proteicos de ataxina-7. El modelo celular tratado con PLGA/PVA/Plx188/Rap tiene más del 50 % de células con menos de 5 agregados cada una y alrededor de un 20 % de células entre 6 y 10 agregados cada una. De manera importante, las células que cuentan con más de 11 agregados por célula son mínimas.

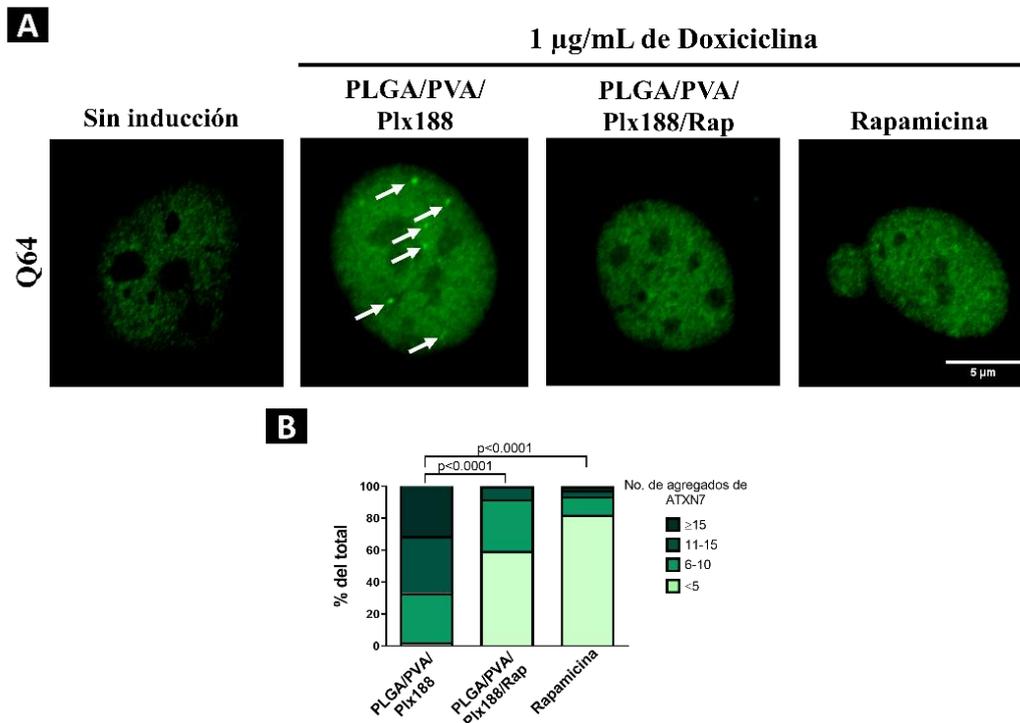


Figura 36. Eliminación de agregados proteicos en modelo celular inducible con la mutación *ATXN7*-Q64.

A) Modelo celular inducido con 1 µg/mL durante 24 h y su tratamiento con PLGA/PVA/Plx188, PLGA/PVA/Plx188/Rap o rapamicina durante 24 h; B) Cuantificación de los agregados proteicos en las células después del tratamiento con el nanoacarreador.

22.1.3 Recuperación de la forma activa de caspasa-9 después del tratamiento con el nanoacarreador

El modelo celular con el transgen *ATXN7*-Q64 fue tratado con PLGA/PVA/Plx188 o PLGA/PVA/Plx188/Rap. Después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188 se observó ligeramente la presencia de caspasa-9, mientras que después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap, no se observó su activación, mostrando una recuperación de los mecanismos de muerte celular programada, concluyendo que el tratamiento logró disminuir la muerte celular por apoptosis ocasionada por la mutación (Figura 37A). En la Figura 37B se realizaron las mismas condiciones de tratamiento, pero en ninguna condición se observó caspasa-3 activada, por lo que después del tratamiento, las células bajo ninguna condición se encontraban en el proceso de apoptosis tardía, con excepción del control positivo que fue tratado previamente con estaurosporina.

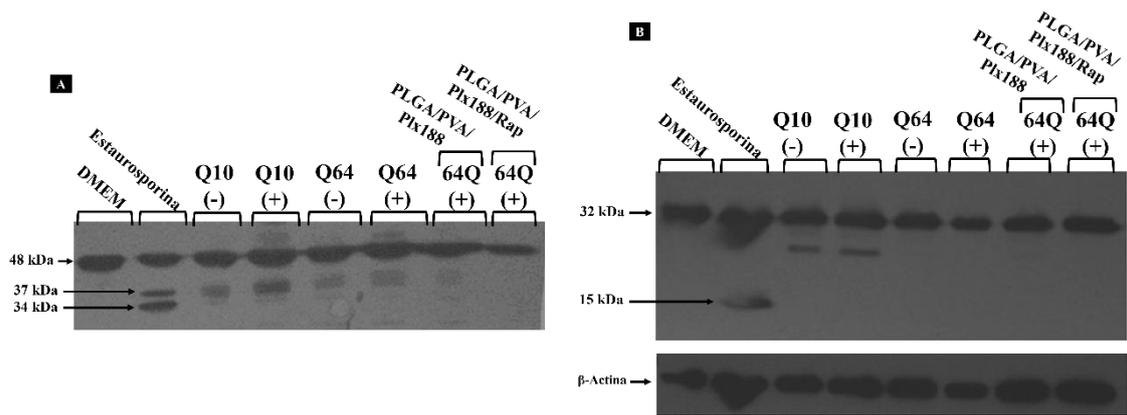


Figura 37. Tratamiento del modelo celular con el transgen *ATXN7-Q64*. El tratamiento se realizó durante 72 h con PLGA/PVA/Plx188 o PLGA/PVA/Plx188/Rap. Los signos (-) y (+) indican si hubo inducción o no con doxiciclina. La inducción con doxiciclina se realizó durante 72 h. **A)** Caspasa-9; **B)** Caspasa-3.

VIII. DISCUSIÓN

El uso experimental de nanotransportadores para la administración de fármacos ha aumentado en los últimos años, debido a que es posible proteger un fármaco para que no sea metabolizado, aumente su tiempo de vida media e incluso, pueda actuar como un sistema de liberación controlada y/o tejido específico, logrando disminuir los efectos secundarios. Por esto, la aparición de la nanotecnología farmacéutica ha sido de gran importancia. El tamaño nanométrico del transportador, la solubilización del fármaco, el aumento en la eficiencia en la encapsulación del fármaco y su internalización en las células, la liberación controlada, así como la protección del fármaco del microambiente, son algunas de las tantas ventajas de este medio innovador de administración de fármacos [79]. Además, el escape del sistema reticuloendotelial (RES) permite una mejor administración de los fármacos evitando ser opsonizado, y con ello, evitar su endocitosis por el sistema inmunológico (Capítulo 8 de [117]).

22. El reto de la elaboración de los nanoacarreadores

La metodología seleccionada para la elaboración de los nanoacarreadores poliméricos fue emulsificación-difusión. Este método tiene la ventaja de que usa infraestructura de fácil acceso, es eficiente, versátil, altamente reproducible y es de fácil escalamiento. La distribución del tamaño obtenido es estrecha y tiene un mínimo estrés físico al no requerir altas temperaturas [118,119]. Además, los solventes que se utilizan no son tóxicos a diferencia de otros métodos como el método emulsificación-evaporación, el cual usa disolventes orgánicos potencialmente tóxicos como cloroformo [120] o diclorometano [121]. Existen otras metodologías como nanoprecipitación, en la cual se precipitan los nanoacarreadores mediante una gota que se va dejando caer en la solución, pero su desventaja es que tiene una baja eficiencia en la formación de estos nanoacarreadores y baja eficiencia de entrapamiento del fármaco [122].

Los excipientes que fueron utilizados para la elaboración de los nanoacarreadores fueron seleccionados debido a que se ha demostrado que son materiales inocuos y biodegradables, incluso todos los excipientes están aceptados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos de América. El PLGA es un polímero sintético altamente utilizado en el área médica, el cual está formado por la polimerización del ácido láctico con el ácido glicólico mediante enlaces éster. Su alta biocompatibilidad se debe a los productos obtenidos por la hidrólisis, ácido láctico y ácido glicólico, los cuales son convertidos en metabolitos o eliminados a través del ciclo de Krebs sin alterar la viabilidad celular [97,123]. El PVA es generalmente seleccionado por excelencia para la obtención de un tamaño nanométrico y homogéneo de los nanoacarreadores, por lo que el sistema base nanoparticulado lo hace susceptible a la manufactura de estas entidades con una posibilidad de ser utilizado en sistemas biológicos [98].

Por otro lado, se seleccionó el fármaco modelo “rapamicina” con capacidad de inducir el sistema de autofagia, con la finalidad de eliminar agregados proteicos presentes en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y algunas ataxias espinocerebelosas (SCAs). El efecto de este fármaco ha sido ampliamente documentado

en estudios *in vitro* degradando agregados proteicos anormales. Sin embargo, las características fisicoquímicas de este fármaco hidrofóbico han limitado su uso a nivel sistémico, por lo que su biodisponibilidad es limitada [90,124–127].

Como se observó en la primera fase del proyecto, se desarrollaron nanoacarreadores basados en estos polímeros y se determinó que sí se podían estructurar condiciones fisicoquímicas compatibles para su uso en un sistema *in vivo*. Las micrografías de las formulaciones PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap demostraron tener una superficie lisa y esférica (Figura 13), lo cual es adecuado porque con estas características son propensos a fluir y no haya riesgo de que se aglomeren, además de tener una menor superficie de contacto, lo que disminuye su unión a proteínas plasmáticas [78,91].

Como se observa en la Tabla 3, el tamaño de los nanoacarreadores se encuentra por debajo de los 250 nm, dicha evaluación realizada a través de DLS, lo que nos proporciona el tamaño hidrodinámico con alta sensibilidad, el cual considera el revestimiento del estabilizante en el solvente (en este caso el agua) de la formulación [128]. El tamaño en particular es de gran relevancia, ya que se ha demostrado que, en conjunto con su morfología y estructura, esta formulación es adecuada para el transporte de fármacos [129,130]. Sathya y col. probaron en el 2020 una formulación de PLGA con un tamaño de $177 + 5.9$ nm que transportaba el fármaco fitol, la cual al ser administrada a ratas Wistar través de la comida, logró atravesar la BHE y disminuir los efectos tóxicos sin necesidad de estar previamente funcionalizada.

Adicionalmente, se ha descrito que nanoacarreadores menores a 300nm logran llegar al SNC, además de tener una amplia movilidad vía torrente sanguíneo a través de capilares de bajo calibre, lo que elimina la probabilidad de formar trombos en los conductos sanguíneos [93,131].

Por otro lado, la técnica DLS usa el movimiento browniano de las partículas para determinar su tamaño en función de la velocidad a la que se mueven, dando como resultado una distribución de tamaños de una población de nanoacarreadores en suspensión, proporcionando un diámetro hidrodinámico promedio [132]. Conforme a nuestros resultados, los tres sistemas nanoacarreadores diseñados presentaron valores considerablemente menores que 0.1, indicando que la formulación es altamente homogénea, lo cual nos permite tener una mejor caracterización de la formulación para la liberación del fármaco y en el mecanismo de internalización en la célula.

Finalmente, un potencial Z relativamente elevado es lo ideal para obtener una alta estabilidad de la formulación. El potencial Z es la carga total que una partícula adquiere en un medio particular y este depende de la química de la superficie y del dispersante. Para dispersiones estabilizadas electrostáticamente, a mayor valor de potencial Z, mayor estabilidad en la dispersión [133]. En el caso de las formulaciones aquí presentadas, el PVA estabiliza la formulación porque una fracción del PVA permanece asociada al nanoacarreador formando una red interconectada con el polímero en la interfase, por lo que estabiliza a la formulación de forma electrostática [98].

Conforme a las características analizadas en los sistemas, fue factible acoplar un fármaco hidrofóbico (rapamicina) mediante su encapsulación. La eficiencia de entrapamiento fue del 43.7 %, es decir que la concentración equivalente de rapamicina fue de 9.4 ng Rap/ μ g de nanopartículas. Además, el perfil de liberación de la rapamicina mostró una

liberación bifásica y prolongada que duró hasta los 7 días. Estas características determinaron que un sistema nanoacarreador basado en PLGA, puede transportar un fármaco hidrofóbico mediante una liberación controlada, lo cual favorece la biodisponibilidad y el efecto de éste.

23. Un método de esterilización confiable

Un sistema nanoacarreador tiene que cumplir con características de un producto farmacológico, por lo que un punto de preocupación era determinar un método efectivo de esterilización que no afecte las características fisicoquímicas del producto y que pueda ser de fácil escalamiento, ya que los sistemas están planteados para ser utilizados de manera periférica en un sistema *in vivo* y para que sean dirigidos al SNC [134].

Las formulaciones con implicaciones médicas para su administración *in vivo* requieren condiciones de manufactura estériles [135]. Sin embargo, el ambiente estéril no siempre es posible, por lo que el uso de métodos de esterilización sería la forma más eficaz cuando se requiere un control más riguroso de posibles contaminantes. Cabe destacar que de acuerdo con la Farmacopea de Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés), las formulaciones deben ser estériles, sin embargo, aún no hay suficiente investigación sobre diferentes condiciones y métodos de esterilización.

Existen diversos métodos de esterilización como los métodos químicos, calor, filtración y energías ionizantes, pero es necesario investigar qué metodología no afecta las propiedades fisicoquímicas de los nanoacarreadores. Se sabe que los métodos de esterilización mencionados son eficaces, pero pueden causar alteraciones en los nanoacarreadores poliméricos [136,137]. En particular, la esterilización con calor, radiación γ y filtración han sido analizadas en nanoacarreadores poliméricos con diferentes surfactantes en su superficie y como es de esperar, todos los métodos han afectado alguna propiedad fisicoquímica (tamaño, PDI y/o potencial Z) de los nanoacarreadores de una forma u otra excepto la filtración. Sin embargo, la filtración requiere que el tamaño de los nanoacarreadores sea menor que 200 nm y en fluidos no-viscosos [138].

El tamaño obtenido en los nanoacarreadores formulados en este proyecto fueron mayores que 200 nm. Incluso la formulación PLGA/PVA/Plx188/Rap se encuentra en el límite de esterilización por filtración por tener una talla de 211.86 ± 4.037 nm, por lo que existiría el riesgo de que algunas partículas no logren atravesar el filtro por la distribución de tamaño y/o que se deformen.

Por lo tanto, se decidió analizar algunas alternativas como la radiación γ porque tiene la capacidad para atravesar superficies y sin aumentar la temperatura en la muestra. Nosotros propusimos el uso de 2 dosis diferentes, 5 kGy y 10 kGy, ya que a partir de 25kGy se han observado afectaciones como el aumento en el peso molecular de los polímeros por la formación de radicales y el entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas e incluso entre las cadenas de surfactante y polímero. Además, posterior a la esterilización, se ha reportado que puede ser complicada la obtención de una dispersión homogénea y la liberación del fármaco puede ser influenciado negativamente [139–141].

Mientras tanto, existe evidencia reciente en el tratamiento de esterilización a través de radiación UV en sistemas de nanotubos y partículas metálicas, demostrando ser eficaz para eliminar microorganismos y sin afectar las características fisicoquímicas ni a la corona proteica que recubre dichos nanoacarreadores [142,143]. Nosotros decidimos utilizar 2 h como tiempo de exposición con radiación UV para evitar los posibles efectos negativos ocasionados por la alta dosis de radiación [144]. Cabe resaltar que la radiación UV es de fácil acceso y escalamiento. Actualmente hay industrias de alimentos y farmacéuticas donde la radiación UV provee un método de esterilización seguro y efectivo. Esta radiación mata virus, bacterias, levaduras y hongos en cuestión de segundos, por lo que puede extender el tiempo de almacenamiento y valor nutricional [144].

Las formulaciones de PLGA/PVA y PLGA/PVA/Rap fueron minuciosamente caracterizadas fisicoquímica y biológicamente antes y después de la esterilización con radiación UV y radiación γ . Después de la esterilización del sistema PLGA/PVA con radiación UV, no se observaron cambios estadísticamente significativos en tamaño, PDI ni potencial Z (Tabla 3). En cambio, la radiación γ provocó ciertos efectos. Después de la esterilización a 5 y 10 kGy, éste nanoacarreador sufrió un cambio estadísticamente significativo en el tamaño (209.6 ± 1.95 nm y 217.0 ± 1.96 nm, respectivamente) (Tabla 3) posiblemente debido a la escisión de las cadenas del polímero ocasionada por la energía a la que fue expuesta la formulación [144]. Además, el índice de polidispersión se redujo posiblemente por la misma escisión de cadenas mencionada anteriormente (para mayor detalle, el lector es dirigido a [144,145]). Por otro lado, el potencial Z se hizo más negativo después de la esterilización. Como el tamaño del nanoacarreador disminuyó después de la radiación posiblemente por efecto de escisión de cadenas, al sufrir esta ruptura, la medición del potencial Z está más cerca del núcleo del nanoacarreador, donde los iones están más concentrados [146], entonces al romper las cadenas del PVA, disminuye el tamaño y aumenta la carga.

Aunque el nanosistema PLGA/PVA irradiado con radiación γ no mostró ninguna modificación química aparente después del análisis con FTIR, interesantemente a partir del análisis de TGA, se observó menor temperatura de degradación que en los excipientes (Figura 16 y [144]). Esto posiblemente fue debido a que el nanoacarreador posee una mayor área de superficie por su tamaño nanométrico, haciéndolo más reactivo que los excipientes.

Por último, estudiamos el efecto biológico en células del SNC. El tratamiento con el nanoacarreador esterilizado con radiación γ a 5 kGy y 10 kGy ($200 \mu\text{g/mL}$), provocó cambios morfológicos de las células. Se observó un incremento en el área celular y la presencia de regiones menos densas, principalmente en el centro. Dicho efecto fue similar al control de estrés celular tratado con H_2O_2 (Figura 20) [144]. El efecto observado después del tratamiento con el nanoacarreador esterilizado es común en fibroblastos de humano, los cuales después de ser expuestos a un microambiente con especies reactivas de oxígeno, cambian su morfología a una forma expandida, aplanada e irregular, lo que causa un estado de senescencia celular [147,148]. Con estos resultados concluimos que a pesar de que el efecto de la esterilización no fue observado en el análisis químico, su efecto tóxico sí se observa a nivel celular, generando alteraciones significativas a este nivel.

La misma evaluación fisicoquímica se realizó en los nanoacarreadores funcionalizados después de ser esterilizados con radiación UV y γ . En la [Tabla 6](#) se mostraron los efectos físicos ocasionados después de la esterilización, concluyendo que no hubo cambios significativos tras la radiación UV. Mientras que después de la radiación γ , se observaron cambios significativos en el tamaño, PDI y potencial Z (resultados no mostrados).

Dado que la radiación γ provocó cambios físicos en los nanoacarreadores y a su vez estos nanoacarreadores provocaron cambios morfológicos en las células utilizadas, se seleccionó la radiación UV por 2 h como técnica adecuada para lograr una completa esterilización que no provoca ningún cambio significativo en el nanoacarreador ni en las células (para mayor detalle consultar [144]). Además, es una técnica conveniente por su rapidez, accesibilidad y seguridad, cuyo funcionamiento es debido a que la radiación electromagnética con alta energía es absorbida por los ácidos nucleicos de las células, produciendo dímeros de timina que pueden matar o inactivar bacterias, virus y protozoarios [149].

24. Estabilidad química de los componentes del nanosistema

El análisis de FTIR de todas las formulaciones funcionalizadas mostró que todos los excipientes tuvieron su espectro previamente reportado en la literatura. De manera interesante, no todos los picos característicos de rapamicina se observan en PLGA/PVA/Ps80/Rap ni en PLGA/PVA/Plx188/Rap como 1714 cm^{-1} , con lo que podemos concluir que el fármaco se encuentra en el interior de los nanoacarreadores molecularmente disperso.

Además, el patrón de PLGA/PVA/Ps80 únicamente se parece al de PLGA, lo cual pudiese significar que el arreglo del PVA en PLGA/PVA/Ps80 y PLGA/PVA/Ps80/Rap es diferente, sin embargo, el objetivo es que los nanoacarreadores funcionen como un transportador de la rapamicina y que ésta se encuentre dispersa. Dado que no hay nuevos picos formados en el FTIR, se concluye que la rapamicina no formó enlaces con el nanoacarreador ni se cristalizó. En cambio, comparando los espectros entre PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap, éstos son prácticamente idénticos, por lo que el principal componente del nanoacarreador es el PLGA.

Finalmente, se puede concluir que durante la elaboración de los nanoacarreadores funcionalizados, no hubo formación de nuevos enlaces y que la rapamicina no interactuó químicamente con los polímeros que conforman a las formulaciones. Una interacción deseable del fármaco con los nanoacarreadores es la formada mediante enlaces tipo Van der Waals debido a su debilidad. Esta encapsulación de la rapamicina es benéfica debido a la protección del fármaco de una posible degradación.

Para las formulaciones funcionalizadas, en comparación con los excipientes, la temperatura de degradación de las formulaciones fue menor ([Figura 24](#)). Esto ocurrió posiblemente porque el nanoacarreador, al tener un tamaño nanométrico, presentan una mayor superficie de contacto y por lo tanto tienen una mayor reactividad que los componentes puros. Entonces, la transmisión de calor es más eficiente en los nanoacarreadores, degradándose antes.

Por otro lado, en los termogramas de las formulaciones funcionalizadas, no presentaron cambios en sus temperaturas de fusión ni temperaturas de transición vítrea antes y después de la incorporación de la rapamicina, indicando una encapsulación exitosa y entrapamiento homogéneo del fármaco en estado amorfo, lo cual refuerza los resultados observados en FTIR [158]. Dado que la temperatura de fusión de la rapamicina es más alta que la del PLGA, la rapamicina cristalina podría disolverse en el PLGA fundido durante el análisis de DSC y, por lo tanto, cambiar a una forma amorfa [159].

25. Estabilidad del sistema y vida de anaquel

La estabilidad se realizó siguiendo la NOM-073-SSA1-2005 sobre la estabilidad de fármacos y medicamentos, en la cual se pide el análisis de la estabilidad de la forma farmacéutica en las condiciones en las que se recomienda su almacenamiento y bajo condiciones aceleradas.

Los nanoacarreadores funcionalizados y almacenados a 4 °C mantuvieron su estabilidad hasta las 12 semanas (Tabla 7). Las formulaciones almacenadas a temperatura ambiente (condición acelerada) mantuvieron su tamaño estable hasta por 8 semanas (Tabla 7), pero dichos cambios aun no son estadísticamente significativos.

La disminución en el tamaño que se observa en todas las condiciones podría estar relacionado a la degradación esperada de los nanoacarreadores, con lo que se empieza a liberar el fármaco. Así, cuando la formulación es hidratada, el agua induce el hinchamiento del polímero, seguido de la hidrólisis y finalmente provoca la erosión del nanoacarreador [160]. Tal como se esperaba, las formulaciones almacenadas a temperatura ambiente sufrieron un cambio en el tamaño más rápido que aquellas almacenadas a 4 °C. Esto ocurrió porque a condiciones aceleradas de almacenamiento, es decir que, a una mayor temperatura, la reacción de hidrólisis está acelerada [161].

El potencial Z también disminuyó en ambas formulaciones durante el tiempo en dispersión, pero con la condición acelerada la disminución fue mayor. La disminución del potencial Z posiblemente ocurrió por la desorción y/o ruptura de las cadenas de los surfactantes de cada formulación ocasionada por la hidrólisis.

Los surfactantes utilizados en este trabajo (PVA, Ps80 y Plx188) no tienen carga, es decir que son no iónicos [98]. Se ha sugerido que el pH en el microambiente lleva a una catálisis ácida y básica del PLGA [161], por lo que es posible que aparte de la ruptura y/o desorción de las cadenas de los surfactantes por la hidrólisis durante el ensayo de estabilidad de las formulaciones en dispersión, el potencial Z haya disminuido por el cambio en el pH del microambiente.

Los mecanismos que afectan la estabilidad de la dispersión son la repulsión electrostática y repulsión estérica. Ante esta premisa, es importante mencionar que todos los sistemas elaborados se mantienen en liofilización, es decir que de esa forma se mantienen en anaquel, por lo que son altamente estables y no hay presencia de hidrólisis. Cuando estas formulaciones son hidratadas, son estables por lo menos las primeras 8 semanas, siendo un tiempo de estabilidad adecuado [162].

26. Liberación del fármaco

La liberación del fármaco en todas las formulaciones ocurrió en 2 fases, primero una liberación aumentada (“burst effect”) para luego mantener una liberación controlada y sostenida. En cuanto a PLGA/PVA/Ps80/Rap, el “burst effect” de rapamicina ocurrió aproximadamente las primeras 4 horas, tiempo en el que se había liberado el 29.01 % de la rapamicina y a las 72 h el 50.64 % (Figura 26). En esta formulación se alcanzó muy rápido la meseta de la liberación del fármaco y apenas a las 200 h se había alcanzado casi el 60 %, pero después de ese tiempo, ya no se observó liberación (datos no mostrados).

Esto ocurrió posiblemente porque los nanoacarreadores se adsorbieron a la bolsa de microdiálisis, evitando que se liberara todo el contenido de la bolsa. Lo anterior mencionado ya se ha reportado en la literatura. Venkateswarlu y col., elaboraron nanoacarreadores lipídicos sólidos con diferentes triglicéridos, lecitina de soya, Plx188 y el modificador de carga estearilamina para encapsular el fármaco lipofílico clozapina. Con la liberación *in vitro*, ellos reportaron la retención de nanoacarreadores en la membrana de diálisis, aunque aun así reportaron una liberación del fármaco de hasta 27.83-50.91 % después de 48 h [163].

Por otro lado, Lu y col. usaron nanoacarreadores de PLGA para la liberación del fármaco paclitaxel. La liberación alcanzada después de 2 h fue del 66.9 % y la liberación acumulada alcanzó el ~80 % a las 50 h. Para disminuir el “burst effect”, agregaron quitosán a la formulación, cambiando el potencial Z de -20.8 ± 1.1 mV a 25.6 ± 0.6 mV, con lo cual disminuyeron el “burst effect” a 14.3 % a las 2 h [164].

Es posible que en nuestra formulación PLGA/PVA/Ps80/Rap, el surfactante Ps80 de alguna forma se haya unido a la rapamicina y que por eso no hayamos podido cuantificarla por completo durante su liberación. En caso de que esa haya sido la situación, eso sería contraproducente para el objetivo de usar esa formulación como nanoacarreador, ya que podría ser que no permita la actividad de la rapamicina por estar unida al Ps80. Previamente, se ha reportado que el recubrimiento de nanoacarreadores con 1 % de Ps80 disminuye la liberación del fármaco de los nanotransportadores [157].

Finalmente, la formulación PLGA/PVA/Plx188/Rap presentó una liberación aumentada las primeras 7 h, donde se liberó el 47.46 % y hasta las 160 h se alcanzó una liberación casi del 90 % (Figura 26). La adsorción del fármaco a la bolsa de microdiálisis podría explicar en parte por qué no se logró cuantificar el 100 % del fármaco.

La EE de cada formulación es muy importante, ya que, a mayor cantidad de fármaco entrampado, menor cantidad de nanoacarreador será utilizado y menor riesgo de citotoxicidad. Para la formulación PLGA/PVA/Rap, hubo una EE del 43.7 %, pero al funcionalizar la formulación con Ps80, la EE disminuyó hasta un 34.7 %. Dicha disminución en el entrampamiento del fármaco también fue reportada por Wilson y col., donde tras recubrir los nanoacarreadores con 1 % de Ps80, se redujo ligeramente la carga del fármaco, argumentando que esta disminución en la carga del fármaco pudo deberse al escape del fármaco en el medio durante el proceso de recubrimiento [157].

PLGA/PVA/Plx188/Rap presentó una EE muy similar a la de PLGA/PVA (43.64 %), por lo que el Plx188 parece no tener interferencia al momento de la encapsulación del fármaco durante la formación del nanoacarreador. Es conveniente que la carga del fármaco dentro

de cualquier transportador sea alta para minimizar la cantidad del sistema de entrega usado por mililitro de solvente. Aquí, PLGA/PVA/Plx188/Rap demostró tener una capacidad de carga de fármaco mayor que PLGA/PVA/Ps80/Rap (Figura 26).

Después de analizar los perfiles de liberación, las 3 formulaciones se ajustaron al modelo matemático sobre liberación de fármacos de Korsmeyer-Peppas. Este modelo matemático generalmente es el que explica la liberación de las formulaciones de nanoacarreadores poliméricos y/o cuando hay más de un fenómeno de liberación involucrado [162,165]. El coeficiente “n” de la ecuación nos dice si la liberación sigue la ley de Fick, es decir que está gobernada por la difusión del fármaco ($n < 0.5$), que sigue la Ley de Fick pero que está gobernada por la difusión y el hinchamiento del polímero ($0.5 < n < 1$), o que el mecanismo no sigue la Ley de Fick ($n = 1$).

En todos los casos, el coeficiente n (Tabla 5, Figura 27) mostró que la liberación de la rapamicina de las 3 formulaciones está gobernada únicamente por la difusión del fármaco. Brevemente, al ser hidratadas las formulaciones, el agua puede entrar al nanoacarreador haciendo que el PLGA se hinche e inicie su hidrólisis, durante lo cual la rapamicina se va difundiendo hacia el medio externo [166].

Sharma y col. elaboraron unos nanoacarreadores de PLGA para una administración intranasal de lorazepam. La mejor formulación demostró tener un tamaño de 176 ± 0.5 nm y DL de 83 ± 0.5 %. La liberación de lorazepam se ajustó al modelo Korsmeyer-Peppas, obteniendo un valor n menor a 0.5, sugiriendo que la liberación de lorazepam sigue la ley de Fick (difusión) [167]. De manera similar, Saqib y col. elaboraron unos nanoacarreadores poliméricos de poli- ϵ -caprolactona cargadas con anfotericina B. El tamaño obtenido fue de 183 nm con EE del 85 %, cuya liberación se ajustó al modelo de Korsmeyer-Peppas, aunque en este caso, la liberación del fármaco estuvo controlada por transporte anómalo (no sigue la Ley de Fick) [168].

La ventaja de la liberación lenta de los fármacos es para disminuir las veces de administración y para que haya menos efectos secundarios. En la actualidad hay interés en disminuir el “burst effect” de los nanoacarreadores porque la liberación inicial del fármaco es mayor a la concentración terapéutica recomendada y podría causar toxicidad celular. Cuando el nanoacarreador del fármaco paclitaxel fue modificado con quitosán para disminuir el “burst effect”, también lograron disminuir la citotoxicidad [164].

27. Un sistema nanoacarreador funcionalizado para la entrega farmacológica en el SNC

El conocer que nuestro sistema nanoacarreador basado en PLGA/PVA puede ser viable como un vehículo farmacológico, así como la implementación sencilla de un método de control de esterilización compatible con el sistema, nos llevó a tratar de estructurar un vehículo capaz de llegar al SNC. Dado que la accesibilidad al SNC está ampliamente limitada por la BHE, fue importante funcionalizar los sistemas nanoparticulados con la finalidad de “enmascarar” al acarreador farmacológico para lograr atravesar hacia el microambiente del cerebro.

Para esto, se seleccionaron los surfactantes no iónicos Ps80 y Plx188 para ser analizados de manera independiente. Los surfactantes comúnmente son utilizados para reducir la

tensión superficial de la interfase entre la solución orgánica que contiene al polímero y la fase acuosa. Además, promueven la formación de los nanoacarreadores y su estabilización, mientras alteran la interacción entre la nanoformulación y las células [150]. En este sentido, se ha demostrado que el Ps80 puede aumentar la acumulación de nanoacarreadores en el cerebro mediante la adsorción de ApoB o ApoE al nanoacarreador cuando se encuentra en el torrente sanguíneo, por lo que, al llegar a la BHE, estos nanoacarreadores son reconocidos por el receptor de LDL de las células endoteliales de la BHE. Por lo tanto, los nanoacarreadores se internalizan hacia el cerebro mediante endocitosis dependiente de receptor [109]. Mientras tanto, el Plx188 tiene la capacidad de inhibir la proteína de eflujo P-gp para permanecer dentro de la célula [151]. En general, la presencia de surfactantes no iónicos permite un decremento en el depósito de proteínas en la superficie, incrementando el tiempo de circulación [98].

El transporte de fármacos a través de la BHE involucra diferentes rutas, por lo que el diseño de nanotransportadores recubiertos con diferentes surfactantes les confiere la habilidad de atravesar la BHE usando el transporte activo o pasivo. Debido a que el transporte pasivo no requiere ligandos específicos, sino el efecto de mayor permeabilidad y retención (efecto EPR, por sus siglas en inglés), además de los parámetros críticos que son tamaño, potencial Z y tiempo de vida en la circulación sanguínea, los cuales pueden ser modulados mediante el recubrimiento con polímeros hidrofílicos, en el presente trabajo, se decidió favorecer el transporte activo, ya que facilita la captación de los nanoacarreadores por las propias células, de manera más sensible y específica.

El transporte activo está clasificado en 3 subcategorías: transcitosis mediada por transportador, la mediada por adsorción y la mediada por receptor [152]. La transcitosis mediada por transportador implica el transporte de un sustrato selectivo, en la que se lleva a cabo la internalización de pequeñas biomoléculas hacia el cerebro. La transcitosis mediada por adsorción es un proceso no específico que involucra la interacción de péptidos o proteínas con carga positiva y microdominios con carga negativa en la membrana de células endoteliales cerebrales. La transcitosis mediada por receptor es un transportador altamente selectivo y específico relacionado con la unión entre ligandos blanco y receptores expresados en las células endoteliales cerebrales [153,154].

El transporte activo mediado por receptor se basa en el uso de los receptores de transferrina con el ligando lactoferrina o transferrina, receptor LDL con el ligando LDL o ApoE y el receptor de glutatión con el ligando glutatión. Este mecanismo, que es el que seleccionamos, es el más prometedor para el transporte de fármacos hacia el cerebro [44].

Kreuter y col. fueron de los pioneros en utilizar el Ps80 como surfactante para recubrir el nanoacarreador PBCA cargado con los fármacos dalgina o loperamida. Después de la administración vía sanguínea, estos nanoacarreadores adsorben las Apo B y E, por lo que son capaces de atravesar la BHE al imitar a las lipoproteínas, las cuales pueden ingresar a las células endoteliales de los capilares cerebrales mediante endocitosis vía receptor [109]. Bajo esta evidencia, el mecanismo de internalización de los surfactantes utilizados en el presente estudio es mediante transporte activo.

Un punto importante para considerar antes de utilizar un nanoacarreador farmacológico hacia el SNC son sus características fisicoquímicas. Los nanoacarreadores funcionalizados, a diferencia de PLGA/PVA, al incorporarles el fármaco en la formulación, el tamaño aumentó de 201.96 ± 1.343 nm a 231.5 ± 2.967 nm en

PLGA/PVA/Ps80 (Tabla 6). El aumento en el tamaño después de cargar el fármaco no ocurre en todas las formulaciones y no necesariamente está relacionado con la carga del fármaco. Sathya y col. elaboraron unos nanotransportadores de PLGA usando como surfactante al PVA y fitol como fármaco. El nanotransportador con fármaco tuvo un tamaño de 177 ± 5.9 nm, mientras que la formulación sin fármaco fue considerablemente más pequeña con 91.1 ± 1.9 nm. En este ejemplo hay que considerar que para el gran aumento en el tamaño pudo deberse a la eficiencia de entrapamiento, la cual mencionan que fue del 92.14 ± 0.29 % [121].

De manera interesante para el nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188, el tamaño obtenido antes y después de incorporar el fármaco se mantuvo estable (212.73 ± 4.87 nm contra 211.86 ± 4.037 nm, respectivamente) (Tabla 6). El tamaño ideal para un nanoacarreador depende de la aplicación y la capacidad de carga de fármaco deseada. En general, los nanotransportadores deberían tener un tamaño menor a 400 nm para prevenir el reconocimiento de RES y su posterior eliminación por el sistema inmune. Además, su tamaño determina su distribución *in vivo*. Por ejemplo, en el caso de cáncer, su tamaño debería ser idealmente menor a 100 nm para beneficiarse del efecto mejorado de permeabilidad y retención para la extravasación en tumores, en cambio, para enfermedades neurodegenerativas, el uso de nanotransportadores con un tamaño alrededor de 200 nm hace que haya una disminución en la carga del fármaco, requiriendo mayor cantidad del nanotransportador para alcanzar una eficacia terapéutica, lo cual no sería deseable. En un artículo de Utreja y col., en el 2020, hicieron una revisión bibliográfica sobre los nanoacarreadores en medicina y sus diferentes usos. En ese artículo se pueden apreciar los diversos tamaños de los nanoacarreadores según su aplicación deseada [98,131].

Las formulaciones funcionalizadas presentaron un potencial Z similar al de PLGA/PVA y además no hubo cambio en dicha carga al incorporar el fármaco (Tabla 6). Por lo tanto, los nanoacarreadores funcionalizados tienen todas las características físicas necesarias para tener buena estabilidad, en especial en dispersión [144,155,156].

Cabe destacar que la presencia de los surfactantes, Ps80 y Plx188, podrían “ocultar” la carga negativa de los nanoacarreadores, ya que las cadenas de los surfactantes parecen cubrir la superficie de estas formulaciones, por lo que el potencial Z real podría ser mayor. Aunado a lo anterior mencionado, en el caso del Plx188, éste no solo provee una estabilidad electrostática, como ocurre con las formulaciones con potencial Z de moderado a alto, sino que la repulsión estérica también funciona para la estabilidad de los nanoacarreadores, donde el Plx188 actúa como un resorte alejando a los nanoacarreadores cercanos [91]. La ventaja de la estabilidad por repulsión estérica es que no se ve afectada con el pH del medio de dispersión como con la estabilidad electrostática, donde algunas moléculas pueden cambiar incluso su carga de positivo a negativo [157].

Con esto podemos concluir que las formulaciones PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap son doblemente estables por la carga y la repulsión estérica. Además, el tamaño y potencial Z obtenido en las formulaciones funcionalizadas con Ps80 o Plx188 son adecuados como nanotransportador para el SNC y sin que provoquen neurotoxicidad.

28. Internalización del sistema funcionalizado en SNC

La formulación PLGA/PVA/C6 (Figura 19) logró internalizar en mayor medida a las células MIO-M1 que la C6 sola, lo cual significa que estos nanoacarreadores son eficientes para internalizar a las células y ser usadas como nanotransportadores. Así mismo, las formulaciones funcionalizadas fueron analizadas en las líneas celulares MIO-M1 y SH-SY5Y por ser células de origen glial y neuronal, respectivamente.

La formulación PLGA/PVA/Ps80/C6 internalizó de igual manera a las células MIO-M1 que C6, pero se observó una mayor internalización en las células SH-SY5Y que C6, comprobando su eficacia como nanoacarreador (Figura 28). Esta formulación internalizó más en las células SH-SY5Y posiblemente porque esta formulación presentó una liberación de explosión alta, en la que las primeras 5 horas de liberación, alcanzó a liberar más del 30 % del fármaco.

En el caso de PLGA/PVA/Plx188/C6 se observó una internalización similar entre la formulación y C6 libre en las células MIO-M1, pero claramente hubo una mayor internalización en las células SH-SY5Y usando el nanoacarreador (Figura 28).

Finalmente, cabe resaltar que el polímero base de PLGA ya dentro del SNC, puede favorecer la internalización celular vía clatrina dependiente, lo que facilita la pinocitosis en este tejido, ya que las células cerebrales solo presentan vías de internalización clatrina-dependiente [169].

29. Los sistemas nanoacarreadores mostraron una baja citotoxicidad

29.1 Efecto de los nanoacarreadores en la morfología de las células

La formulación PLGA/PVA/Ps80/Rap a 150 $\mu\text{g/mL}$ presentó un ligero cambio morfológico en las células MIO-M1 ocasionado posiblemente por la alta concentración de rapamicina, ya que la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ corresponde a la concentración terapéutica de la rapamicina (Figura 29).

Existen antecedentes sobre cambios morfológicos ocasionados por la rapamicina. Romero y col. observaron que el tratamiento con 109 nM de rapamicina en el hongo *Ustilago maydis* no alteró su crecimiento, pero ocasionó un mayor tamaño y modificó la morfología celular, caracterizada por la presencia de estructuras celulares con varios septos y núcleos. Esto sugiere que la rapamicina tiene un papel en la morfología celular y metabolismo lipídico en *U. maydis* mediante TORC1 [170].

Al igual que Aguilar y col. y que PLGA/PVA/Ps80/Rap, después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap a una concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$, se observa un ligero cambio morfológico en las células MIO-M1 en comparación con las células tratadas con PLGA/PVA/Plx188 (Figura 29). Este efecto también es probable que haya ocurrido por efecto de la rapamicina. En este sentido, se ha reportado que fuertes inductores de autofagia también activan la nucleofagia, por lo que se empiezan a degradar componentes importantes de la envoltura nuclear como la lámina B1, produciendo un efecto tóxico [171].

A pesar de los cambios morfológicos que fueron observados después de poner tratamiento a alta concentración, éstos fueron muy ligeros. En cambio, en el control positivo con estaurosporina, los cambios morfológicos observados fueron más parecidos a los ocurridos durante un proceso apoptótico como disminución en el tamaño, fragmentación nuclear y desprendimiento de las células del cubreobjeto.

Por lo tanto, basándonos en que hubo ausencia de estos indicadores apoptóticos en las células tratadas con estas formulaciones, nuestros resultados sugieren un bajo potencial de toxicidad para las líneas celulares utilizadas.

29.2 Efecto de los nanoacarreadores sobre la viabilidad celular

El tratamiento con PLGA/PVA no mostró disminución en la viabilidad celular, con y sin fármaco, en ambas líneas celulares (Figura 21). En cambio, después del tratamiento con PLGA/PVA/Ps80, ocasionó una reducción en la viabilidad celular a altas concentraciones y PLGA/PVA/Ps80/Rap no causó toxicidad en las células MIO-M1. Además, ningún tratamiento en las células SH-SY5Y provocó disminución en la viabilidad celular (Figura 30). Esto posiblemente ocurrió a causa del surfactante Ps80. Se ha reportado que algunos estabilizantes o surfactantes utilizados en la elaboración de nanoacarreadores poliméricos pueden ocasionar cierto grado de toxicidad [172]. Sin embargo, el Ps80 es un surfactante que ha sido ampliamente estudiado y es probable que estos nanoacarreadores no ocasionen toxicidad cuando sean aplicadas a concentraciones terapéuticas.

Después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188, se observó cierto grado de citotoxicidad con comportamiento dosis-dependiente en las células MIO-M1 (Figura 30E), pero dicho fenómeno está ausente en PLGA/PVA/Plx188/Rap (Figura 30F). Estos resultados posiblemente se deban a la presencia del surfactante Plx188 y que cuando se usa el nanoacarreador con rapamicina, éste ayude a mejorar la viabilidad celular, aunque hacen falta más estudios antes de realizar cualquier conclusión. En cambio, en las células SH-SY5Y se observó una disminución en la viabilidad celular estadísticamente significativa al comparar el tratamiento con PLGA/PVA/Plx188 durante 24 h y 72 h, posiblemente por consecuencia de la hidrólisis del nanoacarreador y por acidificación del medio de cultivo. De manera importante, el tratamiento de las células SH-SY5Y con PLGA/PVA/Plx188/Rap no afectó de manera estadísticamente significativa la viabilidad celular después del tratamiento por 72 h (Figura 30H), por lo que la administración de la rapamicina mediante este nanoacarreador no parece ser tóxica.

29.3 Efecto de los nanoacarreadores sobre la apoptosis

La ausencia de apoptosis analizada mediante la marca de Anexina V se muestra en la Tabla 8. Grabowski y col. usaron nanoacarreadores de PLGA de ~200 nm y diferentes estabilizantes (PVA, Plx188 y quitosán) en macrófagos THP-1 de humano. Ellos observaron que a concentraciones terapéuticas (hasta 0.1 mg/mL) no hubo toxicidad con excepción de los nanoacarreadores con quitosán [172]. Aquí podemos observar que PLGA/PVA/Plx188 y PLGA/PVA/Plx188/Rap son totalmente inocuas hasta 150 µg/mL en las células MIO-M1, cuyo resultado es consistente con la literatura previamente reportada.

De manera adicional al ensayo de anexina V, se buscó la presencia de caspasa-3 y caspasa-9 activada en las células MIO-M1 tratadas con las formulaciones funcionalizadas durante 72 h (Figura 31), debido a que se han reportado diversos nanoacarreadores (metálicos, poliméricos, lipídicos, dendrímeros, basadas en proteínas, entre otras) que podrían ocasionar algún tipo de toxicidad. Los nanoacarreadores podrían provocar la generación de ROS, podrían dañar físicamente la membrana plasmática causando ruptura en la membrana o unirse a proteínas de membrana como NADPH oxidasa, canales de Ca^{2+} y receptores de membrana, por lo que pueden inducir una señalización oxidativa mediante el incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular y activación de cascadas de segundos mensajeros [173].

De manera exitosa, logramos corroborar la ausencia de apoptosis en las células MIO-M1 después del tratamiento con los nanoacarreadores funcionalizados.

30. Validación Terapéutica

Para la validación terapéutica, la formulación PLGA/PVA/Ps80/Rap fue descartada porque no cumplió con nuestros requerimientos buscados para el ensayo de efectividad terapéutica. La formulación PLGA/PVA/Plx188/Rap tuvo una mayor EE y además se pudo cuantificar casi el 100 % de la rapamicina liberada, la cual ocurrió aproximadamente a los 4 días. La liberación del fármaco de PLGA/PVA/Plx188/Rap se analizó también en la región inicial, es decir en la zona del “burst effect” (Figura 27B). Dicha región se ajustó mejor al orden cero, es decir que la liberación inicial es independiente de la concentración, pero sí es dependiente del tiempo. Este dato puede ser importante, ya que significa que aunque tengamos una concentración muy alta o baja de rapamicina en un inicio, la liberación será dependiente del tiempo y pasado el efecto de explosión, la liberación será prolongada (que el fármaco se libera en un tiempo diferente del administrado), sostenida (que controla la liberación pero sin controlar la concentración del fármaco), controlada (que mantiene la concentración en plasma constantes y predecibles) y únicamente dependiente de la difusión de la rapamicina.

30.1 Validación del modelo celular inducible MIO-M1

Para este proyecto, nosotros seleccionamos un modelo celular inducible en lugar de uno estable debido a que la proteína con la mutación es altamente tóxica para la célula, por lo que en un modelo estable sería más complicada su evaluación por tener un mayor número de variables a considerar. Con el modelo celular inducible con el sistema Tet-On, se pudo reproducir exitosamente la formación de agregados proteicos de ataxina-7, considerados la principal causa patogénica de la enfermedad, así como la toxicidad ocasionada por los mismos agregados proteicos.

El sistema Tet-On permite la modulación del gen de interés mediante la administración de tetraciclinas (doxiciclina). Es por eso que es un sistema altamente confiable que ayuda a reproducir las enfermedades de manera más específica. Además, como el sistema regulador permite la activación de la expresión génica mediante la adición de la doxiciclina, se puede usar el mismo modelo como control negativo, disminuyendo el fondo ocasionado por el uso de diferentes células. Además, es una ventaja que para reproducir los marcadores descritos en la enfermedad de SCA7, se requiera la adición de

doxiciclina, ya que de esta forma las células no están en constante estrés debido a la presencia continua de doxiciclina, como es el caso del sistema Tet-Off [175].

La determinación de la concentración óptima de doxiciclina para iniciar la expresión del transgen de *ATXN7-Q10* o *ATXN7-Q64* (Figura 32) sirvió para obtener la mayor cantidad de agregados proteicos con la menor concentración de doxiciclina. En la Figura 33 se comprobó la presencia de estos agregados proteicos en la clona con el gen mutado y no se observa señal de la proteína ataxina-7 en ausencia de doxiciclina, con lo que se corrobora que el modelo celular inducible funciona adecuadamente.

Además, en la Figura 34 se mostró que, a partir del modelo celular inducible, la clona con el gen mutado presenta activación de caspasa-3, indicador de apoptosis. Wang y col., usaron un modelo para la enfermedad de SCA7 que consistió en la expresión de ataxina-7/Q75 en un cultivo neuronal primario de cerebelo. A los 6 días de haber infectado las células, se observó muerte neuronal ocasionada por la proteína mutante. Posteriormente, se comprobó que la muerte ocurrió por apoptosis mediante la inducción de la formación de caspasa-3 y caspasa-9 sin activar a la caspasa-8, es decir que la apoptosis fue iniciada por la señalización de la mitocondria mediante la liberación de citocromo C y Smac [68].

Con estos resultados podemos concluir que nuestro modelo logró reproducir exitosamente la formación de agregados proteicos y la apoptosis que es ocasionada por la presencia de la proteína mutante de ataxina-7.

30.2 Efecto del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap en el modelo celular inducible

El nanoacarreador PLGA/PVA/Plx188/Rap fue evaluado para conocer su potencial terapéutico en la reversión del fenotipo del modelo *in vitro*. La sonda fluorescente GFP-LC3-RFP-LC3 Δ G es útil para observar el flujo autofágico, la cual es escindida por las proteasas endógenas ATG4, por lo que GFP-LC3 es degradado mediante la autofagia [176]. En la Figura 36 se muestra el tratamiento en el modelo celular inducible con el transgen *ATXN7-Q64*. De manera inicial, se colocó un pretratamiento con cloroquina para detener la autofagia [177] y se observa que tanto el tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap como con rapamicina, aumentó considerablemente el flujo autofágico a pesar de que éste había sido inhibido con la cloroquina. De esta manera comprobamos que el tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap aumenta la autofagia y, por lo tanto, mediante este mecanismo, se lograron eliminar los agregados proteicos de ataxina-7 mutante (Figura 35).

Anteriormente ha sido reportado en la literatura que la mutación de SCA7 provoca la muerte de las células por apoptosis [61,178]. Dada la ausencia de caspasa-3 y caspasa-9 después del tratamiento con PLGA/PVA/Plx188/Rap, podemos concluir que la eliminación de los agregados proteicos por el tratamiento con rapamicina demostrada en la Figura 35, ayudó a disminuir la toxicidad ocasionada por dichos agregados, disminuyendo la muerte celular.

Se ha sugerido y observado que la presencia de agregados proteicos dentro de las células es citotóxica. Wang y col., en el 2005 usaron la proteína ataxina-7Q65 y la transfectaron en un cultivo neuronal primario de cerebelo con adenovirus recombinante. Su hipótesis inicial fue que, si la proteólisis específica es requerida para la muerte neuronal inducida por *mATXN7*, entonces debe de haber fragmentos de ataxina-Q75 en neuronas

cerebelares. Sin embargo, tras 2 a 6 días de transfección, el estudio reveló que FL-*mATXN7* también causa toxicidad y muerte neuronal en cerebelo [68].

Aquí es importante destacar que a pesar de que los nanoacarreadores con rapamicina y la rapamicina sola ayudaron a disminuir los agregados proteicos, las células tratadas con la rapamicina sola presentaron micronúcleos y núcleos deformes (Figura 35A). Esto posiblemente se deba a que, al ser un fuerte inductor de autofagia, también activa la nucleofagia, degradando componentes importantes de la envoltura nuclear, produciendo un efecto tóxico. La rapamicina, aparte de inducir autofagia, la inactivación de TORC1 desencadena la nucleofagia a través del eje Nem1/Spo7- Pah1, que localiza adecuadamente el componente de micronucleofagia Nvj1 y el receptor de nucleofagia [179]. Además, se ha sugerido que la falla en la nucleofagia puede ser la causa de gran variedad de enfermedades con cuerpos de inclusión nucleares, en donde la acumulación de proteínas mutantes como huntingtina y ataxina causan la enfermedad de Huntington y SCAs, respectivamente [171]. Esto nos sugiere que la concentración terapéutica de rapamicina necesaria para eliminar los agregados proteicos provocó cierto grado de estrés celular, pero la rapamicina internalizada en un nanoacarreador deja de producir efectos adversos en las células por la propiedad que tienen estos nanoacarreadores para la liberación lenta y prolongada del fármaco y, por ende, la activación paulatina de los sistemas de autofagia, lo que lo hace mucho más eficaz.

La liberación prolongada es un objetivo muy buscado en tecnología farmacéutica por sus diversas ventajas. Din y col., usaron una nueva vía de administración del fármaco anticancerígeno irinotecán mediante una formulación modificada a partir de nanoacarreadores lipídicos sólidos. Con esa nueva formulación, lograron disminuir los efectos secundarios ocasionados por el fármaco como pérdida de peso y daño en la zona de administración, además de haber logrado una concentración en plasma a un nivel relativamente bajo hasta por 60 h en ratas [180]. Incluso hay estudios en los que buscan disminuir el “burst effect” con la finalidad de que el efecto sea lo más noble posible mediante una liberación lenta y sostenida [180–183]. El “burst effect” ocurre por el fármaco que quedó atrapado cerca de la superficie de las partículas o por un pobre atrapamiento, por lo que fácilmente se difunde fuera del nanotransportador durante el contacto inicial con el fluido biológico [181].

Con lo anterior mencionado comprobamos la importancia e interés del uso de los nanoacarreadores como vehículo para la administración de fármacos. En el caso de PLGA/PVA/Plx188/Rap, el “burst effect” de la rapamicina no afectó la morfología de las células, sugiriendo que la concentración liberada en las primeras horas no alcanzó concentraciones tóxicas o de estrés para la célula. Además, dado que pudimos eliminar de manera significativa los agregados proteicos formados dentro del modelo celular inducible, la formulación de PLGA/PVA/Plx188/Rap es un potencial candidato como tratamiento de la enfermedad de SCA7 en un modelo *in vivo*.

IX. CONCLUSIONES

- A) Al terminar este trabajo podemos concluir que los nanoacarreadores elaborados tienen las características fisicoquímicas adecuadas para ser probadas en un modelo *in vivo* de la enfermedad de SCA7.

- B) Se determinó un método de esterilización eficaz de los nanoacarreadores funcionalizados, el cual resultó ser eficiente en la eliminación de microorganismos viables, sin alterar las características fisicoquímicas de los sistemas.
- C) Los sistemas funcionalizados resultaron ser inocuos para modelos celulares de SNC, tanto para células humanas neuronales como gliales.
- D) Los sistemas funcionalizados tienen alta capacidad de entregar el fármaco modelo en células de SNC.
- E) La formulación PLGA/PVA/Plx188/Rap fue probada de manera exitosa en un modelo celular patológico de SCA7. Hasta el momento se comprobó que este nanoacarreador protege y transporta la rapamicina de manera adecuada con el tratamiento durante 24 h y es capaz de eliminar los agregados anormales de ataxina-7 mutada mediante la activación de la autofagia.

En resumen, dado que todos los genes alterados en las ataxias cerebelosas dominantes parecen funcionalmente diferentes, pero operan en rutas compartidas incluyendo mal-plegamiento proteico y agregación, daño en el sistema de control de calidad de proteínas, desregulación de la transcripción génica, toxicidad de RNA y alteraciones en la transmisión sináptica, estos nanoacarreadores también podrían servir como un potencial tratamiento contra otras SCAs.

X. PERSPECTIVAS

1. Valorar el efecto de la disminución de la apoptosis en el modelo celular inducible posterior a la administración del sistema nanoacarreador farmacológico.
2. Determinar si el sistema es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica mediante el uso de un modelo de barrera hematoencefálica.
3. Evaluar el sistema PLGA/PVA/Plx188/Rap en el modelo murino *knock in* (SCA7^{140Q/5Q}).
4. Determinar la vía y forma farmacéutica de administración del nanoacarreador en un modelo *in vivo*.

XI. REFERENCIAS

1. Kim, J.S.; Cho, J.W. Hereditary Cerebellar Ataxias: A Korean Perspective. *J Mov Disord* 2015, 8, 67–75, doi:10.14802/jmd.15006/J.
2. Soong, B.W.; Morrison, P.J. Spinocerebellar Ataxias. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier B.V., 2018; Vol. 155, pp. 143–174.
3. Sullivan, R.; Yan, W.; O'Connor, E.; Houlden, H. Spinocerebellar Ataxia: An Update. *Journal of Neurology* 2019, 266, 533–544, doi:10.1007/s00415-018-9076-4.
4. Bird Thomas D, M. Hereditary Ataxia Overview. In; Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Eds.; GeneReviews: University of Washington, Seattle, 2019; pp. 1–38.
5. Magaña, J.; Tapia-Guerrero, Y.; Velázquez-Pérez, L.; Cerecedo-Zapata, C.; Maldonado-Rodríguez, M.; Jano-Ito, J.; Leyva-García, N.; González-Piña, R.; Martínez-Cruz, E.; Hernández-Hernández, O.; et al. Analysis of CAG Repeats in Five SCA Loci in Mexican Population: Epidemiological Evidence of a SCA7 Founder Effect. *Clin Genet* 2014, 85, 159–165, doi:10.1111/cge.12114.
6. Horton, L.C.; Frosch, M.P.; Vangel, M.G.; Weigel-Difranco, C.; Berson, E.L.; Schmahmann, J.D. Spinocerebellar Ataxia Type 7: Clinical Course, Phenotype-Genotype Correlations, and Neuropathology. *Cerebellum* 2013, 12, 176–193, doi:10.1007/s12311-012-0412-4.
7. Velázquez-Pérez, L.; Cerecedo-Zapata, C.M.; Hernández-Hernández, O.; Martínez-Cruz, E.; Tapia-Guerrero, Y.S.; González-Piña, R.; Salas-Vargas, J.; Rodríguez-Labrada, R.; Gurrola-Betancourth, R.; Leyva-García, N.; et al. A Comprehensive Clinical and Genetic Study of a Large Mexican Population with Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Neurogenetics* 2015, 16, 11–21, doi:10.1007/s10048-014-0424-y.
8. Martin, J.J. *Spinocerebellar Ataxia Type 7*; 1st ed.; Elsevier B.V., 2012; Vol. 103.
9. Trang, H.; Stanley, S.Y.; Thorner, P.; Faghfoury, H.; Schulze, A.; Hawkins, C.; Pearson, C.E.; Yoon, G. Massive CAG Repeat Expansion and Somatic Instability in Maternally Transmitted Infantile Spinocerebellar Ataxia Type 7. *JAMA Neurol* 2015, 72, 219–223, doi:10.1001/jamaneurol.2014.1902.
10. Carvalho Donis, K.; Preusser Mattos, E.; Anjos Silva, A.; Vasata Furtado, G.; Luiza Saraiva-Pereira, M.; Bannach Jardim, L.; Alex Saute, J. Infantile Spinocerebellar Ataxia Type 7: Case Report and a Review of the Literature. *Journal of the Neurological Sciences* 2015, 354, 118–121, doi: 10.1016/j.jns.2015.04.040.
11. van de Warrenburg, B.P.C.; Frenken, C.W.G.M.; Ausems, M.G.E.M.; Kleefstra, T.; Sinke, R.J.; Knoers, N.V.A.M.; Kremer, H.P.H. Striking Anticipation in Spinocerebellar Ataxia Type 7: The Infantile Phenotype [7]. *Journal of Neurology* 2001, 248, 911–914, doi:10.1007/s004150170082.
12. Benton, C.S.; de Silva, R.; Rutledge, S.L.; Bohlega, S.; Ashizawa, T.; Zoghbi, H.Y. Molecular and Clinical Studies in SCA-7 Define a Broad Clinical Spectrum and the Infantile Phenotype. *Neurology* 1998, 51, 1081–1086, doi:10.1212/WNL.51.4.1081.
13. Alcauter, S.; Barrios, F.A.; Díaz, R.; Fernández-Ruiz, J. Gray and White Matter Alterations in Spinocerebellar Ataxia Type 7: An in Vivo DTI and VBM Study. *Neuroimage* 2011, 55, 1–7, doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.12.014.
14. Michalik, A.; Martin, J.J.; van Broeckhoven, C. Spinocerebellar Ataxia Type 7 Associated with Pigmentary Retinal Dystrophy. *European Journal of Human Genetics* 2004, 12, 2–15, doi: 10.1038/sj.ejhg.5201108.
15. Michalik, A.; Martin, J.J.; van Broeckhoven, C. Spinocerebellar Ataxia Type 7 Associated with Pigmentary Retinal Dystrophy. *European Journal of Human Genetics* 2004, 12, 2–15.
16. Rüb, U.; Schöls, L.; Paulson, H.; Auburger, G.; Kermer, P.; Jen, J.C.; Seidel, K.; Korf, H.W.; Deller, T. Clinical Features, Neurogenetics and Neuropathology of the Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias Type 1, 2, 3, 6 and 7. *Progress in Neurobiology* 2013, 104, 38–66.

17. Manrique, R.K.; Noval, S.; Aguilar-Amat, M.J.; Arpa, J.; Rosa, I.; Contreras, I. Ophthalmic Features of Spinocerebellar Ataxia Type 7. *J Neuro-Ophthalmol* 2009, 2009.
18. Campos-Romo, A.; Graue-Hernandez, E.O.; Pedro-Aguilar, L.; Hernandez-Camarena, J.C.; Rivera-De La Parra, D.; Galvez, V.; Diaz, R.; Jimenez-Corona, A.; Fernandez-Ruiz, J. Ophthalmic Features of Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Eye (Basingstoke)* 2018, 32, 120–127, doi:10.1038/eye.2017.135.
19. Galvez, V.; Diaz, R.; Hernandez-Castillo, C.R.; Campos-Romo, A.; Fernandez-Ruiz, J. Olfactory Performance in Spinocerebellar Ataxia Type 7 Patients. *Parkinsonism and Related Disorders* 2014, 20, 499–502, doi: 10.1016/j.parkreldis.2014.01.024.
20. Hernandez-Castillo, C.R.; Galvez, V.; Morgado-Valle, C.; Fernandez-Ruiz, J. Whole-Brain Connectivity Analysis and Classification of Spinocerebellar Ataxia Type 7 by Functional MRI. *Cerebellum and Ataxias* 2014, 1, doi:10.1186/2053-8871-1-2.
21. Rodríguez-Labrada, R.; Martins, A.C.; Magaña, J.J.; Vazquez-Mojena, Y.; Medrano-Montero, J.; Fernandez-Ruiz, J.; Cisneros, B.; Teive, H.; McFarland, K.N.; Saraiva-Pereira, M.L.; et al. Founder Effects of Spinocerebellar Ataxias in the American Continents and the Caribbean. *Cerebellum* 2020, 19, 446–458.
22. Faruq, M.; Srivastava, A.K.; Singh, S.; Gupta, R.; Dada, T.; Garg, A.; Behari, M.; Mukerji, M. Spinocerebellar Ataxia 7 (SCA7) in Indian Population: Predilection of ATXN7-CAG Expansion Mutation in an Ethnic Population. *Indian Journal of Medical Research* 2015, 142, 187–198.
23. Jonasson, J.; Juvonen, V.; Sistonen, P.; Ignatius, J.; Johansson, D.; Björck, E.J.; Wahlström, J.; Melberg, A.; Holmgren, G.; Forsgren, L.; et al. Evidence for a Common Spinocerebellar Ataxia Type 7 (SCA7) Founder Mutation in Scandinavia. *European Journal of Human Genetics* 2000, 8, 918–922, doi: 10.1038/sj.ejhg.5200557.
24. Greenberg, J.; Solomon, G.A.E.; Vorster, A.A.; Heckmann, J.; Bryer, A. Origin of the SCA7 Gene Mutation in South Africa: Implications for Molecular Diagnostics [1]. *Clinical Genetics* 2006, 70, 415–417.
25. Smith, D.C.; Atadzhyanov, M.; Mwaba, M.; Greenberg, J. Evidence for a Common Founder Effect amongst South African and Zambian Individuals with SCA7. *J Neurol Sci* 2015, 354, 75–78.
26. Magaña, J.J.; Gómez, R.; Maldonado-Rodríguez, M.; Velázquez-Pérez, L.; Tapia-Guerrero, Y.S.; Cortés, H.; Leyva-García, N.; Hernández-Hernández, O.; Cisneros, B. Origin of the Spinocerebellar Ataxia Type 7 Gene Mutation in Mexican Population. *Cerebellum* 2013, 12, 902–905, doi:10.1007/s12311-013-0505-8.
27. Magaña, J.J.; Gómez, R.; Maldonado-Rodríguez, M.; Velázquez-Pérez, L.; Tapia-Guerrero, Y.S.; Cortés, H.; Leyva-García, N.; Hernández-Hernández, O.; Cisneros, B. Origin of the Spinocerebellar Ataxia Type 7 Gene Mutation in Mexican Population. *Cerebellum* 2013, 12, 902–905, doi:10.1007/s12311-013-0505-8.
28. Magaña, J.J.; Tapia-Guerrero, Y.S.; Velázquez-Pérez, L.; Cerecedo-Zapata, C.M.; Maldonado-Rodríguez, M.; Jano-Ito, J.S.; Leyva-García, N.; González-Piña, R.; Martínez-Cruz, E.; Hernández-Hernández, O.; et al. Analysis of CAG Repeats in Five SCA Loci in Mexican Population: Epidemiological Evidence of a SCA7 Founder Effect. *Clinical Genetics* 2014, 85, 159–165, doi:10.1111/cge.12114.
29. Benomar A.; Krols L.; Stevanin G.; Cancel G.; LeGuern E; ...; van Broeckhoven C.; Brice A. The Gene for Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia with Pigmentary Macular Dystrophy Maps to Chromosome 3p12-P21.1. *Nature Publishing Group* 1995.
30. Lindblad, K.; Savontaus, M.-L.; Stevanin, G.; Holmberg, M.; Digre, K.; Zander, C.; Ehrsson, H.; David, G.; Benomar, A.; Nikoskelainen, E.; et al. An Expanded CAG Repeat Sequence in Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Genome Research* 1996.
31. David, G.; Abbas, N.; Stevanin, G.; Dürr, A.; Yvert, G.; Cancel, G. Cloning of the SCA7 Gene Reveals a Highly Unstable CAG Repeat Expansion. *Nat Genet* 1997, 17, 65–70, doi:10.1038/ng0997-65.
32. Adam, M.P.; Ardinger, H.H.; Pagon, R.A. *Spinocerebellar Ataxia Type 7*; 1998;

33. Mittal Uma; Roy Sanghamitra; Jain Satish; Srivastava Achal K; Mukerji Mitali Post-Zygotic de Novo Trinucleotide Repeat Expansion at Spinocerebellar Ataxia Type 7 Locus: Evidence from an Indian Family. *J Hum Genet* 2005, *50*, 155–157.
34. Nardacchione, A., O.L., B.A., F.A., G.E., D.E., D.M.M. Definition of the Smallest Pathological CAG Expansion in SCA7. 1999.
35. Batra, R.; Nelles, D.A.; Pirie, E.; Corbett, K.D.; Swanson, M.S.; Yeo, G.W. Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9. *Cell* 2017, *170*, 899–912, doi:10.1016/j.cell.2017.07.010.
36. Lee, D.Y.; McMurray, C.T. Trinucleotide Expansion in Disease: Why Is There a Length Threshold? *Current Opinion in Genetics and Development* 2014, *26*, 131–140.
37. Kraus-Perrotta, C.; Lagalwar, S. Expansion, Mosaicism and Interruption: Mechanisms of the CAG Repeat Mutation in Spinocerebellar Ataxia Type 1. *Cerebellum & Ataxias* 2016, *3*, doi:10.1186/s40673-016-0058-y.
38. Pearson, C.E.; Edamura, K.N.; Cleary, J.D. Repeat Instability: Mechanisms of Dynamic Mutations. *Nature Reviews Genetics* 2005, *6*, 729–742.
39. Usdin, K.; House, N.C.M.; Freudenreich, C.H. Repeat Instability during DNA Repair: Insights from Model Systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2015, *50*, 142–167.
40. Katsuno, M.; Watanabe, H.; Yamamoto, M.; Sobue, G. Potential Therapeutic Targets in Polyglutamine-Mediated Diseases. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2014, *14*, 1215–1228.
41. Michalik, A.; Martin, J.J.; van Broeckhoven, C. Spinocerebellar Ataxia Type 7 Associated with Pigmentary Retinal Dystrophy. *European Journal of Human Genetics* 2004, *12*, 2–15.
42. Ansorge, O.; Giunti, P.; Michalik, A.; van Broeckhoven, C.; Harding, B.; Wood, N.; Scaravilli, F. Ataxin-7 Aggregation and Ubiquitination in Infantile SCA7 with 180 CAG Repeats. *Annals of Neurology* 2004, *56*, 448–452, doi:10.1002/ana.20230.
43. Gu, W.; Wang, Y.; Liu, Xingzhou; Zhou, B.; Zhou, Y.; Wang, G. Molecular and Clinical Study of Spinocerebellar Ataxia Type 7 in Chinese Kindreds. *Arch Neurol* 2000, *57*, 1513–1518.
44. Borbolla-Jiménez, F. v; Prado-Audelo, M.L. del; Cisneros, B.; Caballero-Florán, I.H.; Leyva-Gómez, G.; Magaña, J.J. New Perspectives of Gene Therapy on Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias: From Molecular Targets to Novel Nanovectors. *Pharmaceutics* 2021, 1–32.
45. Tercero-Pérez, K.; Cortés, H.; Torres-Ramos, Y.; Rodríguez-Labrada, R.; Cerecedo-Zapata, C.M.; Hernández-Hernández, O.; Pérez-González, N.; González-Piña, R.; Leyva-García, N.; Cisneros, B.; et al. Effects of Physical Rehabilitation in Patients with Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Cerebellum* 2019, *18*, 397–405, doi:10.1007/s12311-019-1006-1.
46. Mookerjee, S.; Papanikolaou, T.; Guyenet, S.J.; Sampath, V.; Lin, A.; Vitelli, C.; DeGiacomo, F.; Sopher, B.L.; Chen, S.F.; la Spada, A.R.; et al. Posttranslational Modification of Ataxin-7 at Lysine 257 Prevents Autophagy-Mediated Turnover of an N-Terminal Caspase-7 Cleavage Fragment. *Journal of Neuroscience* 2009, *29*, 15134–15144, doi:10.1523/JNEUROSCI.4720-09.2009.
47. Cancel, G.; Duyckaerts, C.; Holmberg, M.; Zander, C.; Yvert, G.; Lebre, a S.; Ruberg, M.; Faucheux, B.; Agid, Y.; Hirsch, E.; et al. Distribution of Ataxin-7 in Normal Human Brain and Retina. *Brain* 2000, *123*, 2519–2530, doi:10.1093/brain/123.12.2519.
48. Niewiadomska-Cimicka, A.; Trottier, Y. Molecular Targets and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Neurotherapeutics* 2019, *16*, 1074–1096, doi:10.1007/s13311-019-00778-5.
49. Nakamura, Y.; Tagawa, K.; Oka, T.; Sasabe, T.; Ito, H.; Shiwaku, H.; la spada, A.R.; Okazawa, H. Ataxin-7 Associates with Microtubules and Stabilizes the Cytoskeletal Network. *Human Molecular Genetics* 2012, *21*, 1099–1110, doi:10.1093/hmg/ddr539.

50. Palhan, V.B.; Chen, S.; Peng, G.-H.; Tjernberg, A.; Gamper, A.M.; Fan, Y.; Chait, B.T.; la Spada, A.R.; Roeder, R.G. *Polyglutamine-Expanded Ataxin-7 Inhibits STAGA Histone Acetyltransferase Activity to Produce Retinal Degeneration*; 2005;
51. Burke, T.L.; Miller, J.L.; Grant, P.A. Direct Inhibition of Gen5 Protein Catalytic Activity by Polyglutamine-Expanded Ataxin-7. *Journal of Biological Chemistry* 2013, 288, 34266–34275, doi:10.1074/jbc.M113.487538.
52. Martinez, E.; Palhan, V.B.; Tjernberg, A.; Lymar, E.S.; Gamper, A.M.; Kundu, T.K.; ... Roeder, R.G. Human STAGA Complex Is a Chromatin-Acetylating Transcription Coactivator That Interacts with Pre-mRNA Splicing and DNA Damage-Binding Factors in Vivo. *Mol Cell Biol* 2001, 21, 6782–6795.
53. Helmlinger, D.; Hardy, S.; Sasorith, S.; Klein, F.; Robert, F.; Weber, C.; Miguët, L.; Potier, N.; Van-Dorselaer, A.; Wurtz, J.M.; et al. Ataxin-7 Is a Subunit of GCN5 Histone Acetyltransferase-Containing Complexes. *Human Molecular Genetics* 2004, 13, 1257–1265, doi:10.1093/hmg/ddh139.
54. Helmlinger, D.; Hardy, S.; Abou-Sleymane, G.; Eberlin, A.; Bowman, A.B.; Gansmüller, A.; Picaud, S.; Zoghbi, H.Y.; Trottier, Y.; Tora, L.; et al. Glutamine-Expanded Ataxin-7 Alters TFIIIC/STAGA Recruitment and Chromatin Structure Leading to Photoreceptor Dysfunction. *PLoS Biology* 2006, 4, 0432–0445, doi: 10.1371/journal.pbio.0040067.
55. Weber, J.J.; Sowa, A.S.; Binder, T.; Hübener, J. From Pathways to Targets: Understanding the Mechanisms behind Polyglutamine Disease. *Biomed Res Int* 2014, 2014, doi:10.1155/2014/701758.
56. Garden, G. a; la Spada, A.R. Molecular Pathogenesis and Cellular Pathology of Spinocerebellar Ataxia Type 7 Neurodegeneration. *Cerebellum* 2008, 7, 138–149, doi:10.1007/s12311-008-0027-y.
57. Karam, A.; Trottier, Y. Molecular Targets and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7. In *Polyglutamine disorders*; 2018; pp. 197–218 ISBN 9783319717791.
58. Palhan, V.B.; Chen, S.; Peng, G.; Tjernberg, A.; Gamper, A.M.; Fan, Y.; Chait, B.T.; la Spada, A.R.; Roeder, R.G. Polyglutamine-Expanded Ataxin-7 Inhibits STAGA Histone Acetyltransferase Activity to Produce Retinal Degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005, 102, 8472–8477.
59. Merienne, K.; Friedman, J.; Akimoto, M.; Abou-Sleymane, G.; Weber, C.; Swaroop, A.; Trottier, Y. Preventing Polyglutamine-Induced Activation of c-Jun Delays Neuronal Dysfunction in a Mouse Model of SCA7 Retinopathy. *Neurobiology of Disease* 2007, 25, 571–581, doi: 10.1016/j.nbd.2006.11.002.
60. Yu, X.; Ajayi, A.; Boga, N.R.; Ström, A.L. Differential Degradation of Full-Length and Cleaved Ataxin-7 Fragments in a Novel Stable Inducible SCA7 Model. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012, 47, 219–233, doi:10.1007/s12031-012-9722-8.
61. Zander, C.; Takahashi, J.; Hachimi, K.H. el; Fujigasaki, H.; Albanese, V.; Lebre, A.S.; Stevanin, G.; Duyckaerts, C.; Brice, A. Similarities between Spinocerebellar Ataxia Type 7 (SCA7) Cell Models and Human Brain: Proteins Recruited in Inclusions and Activation of Caspase-3. *Human Molecular Genetics* 2001, 10, 2569–2579.
62. Xu, Z.; Joel Tito, A.; Rui, Y.-N.; Zhang, S. Studying Polyglutamine Diseases in Drosophila. *Experimental Neurology* 2015, 274, 25–41, doi: 10.1016/j.expneurol.2015.08.002.
63. Garden, G.A.; Libby, R.T.; Fu, Y.-H.; Kinoshita, Y.; Huang, J.; Possin, D.E.; Smith, A.C.; Martinez, R.A.; Fine, G.C.; Grote, S.K.; et al. *Polyglutamine-Expanded Ataxin-7 Promotes Non-Cell-Autonomous Purkinje Cell Degeneration and Displays Proteolytic Cleavage in Ataxic Transgenic Mice*; 2002;
64. Janer, A.; Werner, A.; Takahashi-Fujigasaki, J.; lie Daret, A.; Fujigasaki, H.; Takada, K.; Duyckaerts, C.; Brice, A.; Dejean, A.; Sittler, A. SUMOylation Attenuates the Aggregation Propensity and Cellular Toxicity of the Polyglutamine Expanded Ataxin-7. *Human Molecular Genetics* 2010, 19, 181–195, doi:10.1093/hmg/ddp478.
65. Alves, S.; Cormier-Dequaire, F.; Marinello, M.; Marais, T.; Muriel, M.P.; Beaumatin, F.; Charbonnier-Beaupel, F.; Tahiri, K.; Seilhean, D.; el Hachimi, K.; et al. The Autophagy/Lysosome Pathway Is Impaired

in SCA7 Patients and SCA7 Knock-in Mice. *Acta Neuropathologica* 2014, 128, 705–722, doi:10.1007/s00401-014-1289-8.

66. Chort, A.; Alves, S.; Marinello, M.; Dufresnois, B.; Dornbierer, J.G.; Tesson, C.; Latouche, M.; Baker, D.P.; Barkats, M.; el Hachimi, K.H.; et al. Interferon Beta Induces Clearance of Mutant Ataxin 7 and Improves Locomotion in SCA7 Knock-in Mice. *Brain* 2013, 136, 1732–1745, doi:10.1093/brain/awt061.
67. Janer, A.; Martin, E.; Muriel, M.P.; Latouche, M.; Fujigasaki, H.; Ruberg, M.; Brice, A.; Trotter, Y.; Sittler, A. PML Clastosomes Prevent Nuclear Accumulation of Mutant Ataxin-7 and Other Polyglutamine Proteins. *Journal of Cell Biology* 2006, 174, 65–76, doi:10.1083/jcb.200511045.
68. Wang, H.L.; Yeh, T.H.; Chou, A.H.; Kuo, Y.L.; Luo, L.J.; He, C.Y.; Huang, P.C.; Li, A.H. Polyglutamine-Expanded Ataxin-7 Activates Mitochondrial Apoptotic Pathway of Cerebellar Neurons by Upregulating Bax and Downregulating Bcl-XL. *Cellular Signalling* 2006, 18, 541–552, doi:10.1016/j.cellsig.2005.05.024.
69. Smith, C.I.E.; Zain, R. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 2018, 14, doi:10.1146/annurev-pharmtox.
70. Relizani, K.; Grif, G.; Echevarría, L.; Zarrouki, F.; Facchinetti, P.; Vaillend, C.; Leumann, C.; Garcia, L.; Goyenvalle, A. Efficacy and Safety Profile of Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy Mouse Model. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 2017, 8, 144–157, doi:10.1016/j.omtn.2017.06.013.
71. Toonen, L.J.A.; Schmidt, I.; Luijsterburg, M.S.; van Attikum, H.; van Roon-Mom, W.M.C. Antisense Oligonucleotide-Mediated Exon Skipping as a Strategy to Reduce Proteolytic Cleavage of Ataxin-3. *Scientific Reports* 2016, 6, 1–11, doi:10.1038/srep35200.
72. Evers, M.M.; Toonen, L.J.A.; van Roon-Mom, W.M.C. Antisense Oligonucleotides in Therapy for Neurodegenerative Disorders. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2015, 87, 90–103, doi:10.1016/j.addr.2015.03.008.
73. Li, Y.; Yokota, T.; Matsumura, R.; Taira, K.; Mizusawa, H. Sequence-Dependent and Independent Inhibition Specific for Mutant Ataxin-3 by Small Interfering RNA. *Annals of Neurology* 2004, 56, 124–129, doi:10.1002/ana.20141.
74. Keiser, M.S.; Boudreau, R.L.; Davidson, B.L. Broad Therapeutic Benefit after RNAi Expression Vector Delivery to Deep Cerebellar Nuclei: Implications for Spinocerebellar Ataxia Type 1 Therapy. *Molecular Therapy* 2014, 22, 588–595, doi:10.1038/mt.2013.279.
75. Shin, J.W.; Kim, K.H.; Chao, M.J.; Atwal, R.S.; Gillis, T.; MacDonald, M.E.; Gusella, J.F.; Lee, J.M. Permanent Inactivation of Huntington's Disease Mutation by Personalized Allele-Specific CRISPR/Cas9. *Human Molecular Genetics* 2016, 25, 4566–4576, doi:10.1093/hmg/ddw286.
76. Ouyang, S.; Xie, Y.; Xiong, Z.; Yang, Y.; Xian, Y.; Ou, Z.; Song, B.; Chen, Y.; Xie, Y.; Li, H.; et al. CRISPR/Cas9-Targeted Deletion of Polyglutamine in Spinocerebellar Ataxia Type 3-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development* 2018, 27, 756–770, doi:10.1089/scd.2017.0209.
77. Buijssen, R.A.M.; Toonen, L.J.A.; Gardiner, S.L.; van Roon-Mom, W.M.C. Genetics, Mechanisms, and Therapeutic Progress in Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias. *Neurotherapeutics* 2019, 16, 263–286.
78. Nikalje, A.P. Nanotechnology and Its Applications in Medicine. *Medicinal Chemistry* 2015, 5, doi:10.4172/2161-0444.1000247.
79. Haeri, A.; Osouli, M.; Bayat, F.; Alavi, S.; Dadashzadeh, S. Nanomedicine Approaches for Sirolimus Delivery: A Review of Pharmaceutical Properties and Preclinical Studies. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 2018, 46, 1–14, doi:10.1080/21691401.2017.1408123.
80. Forrest, M.L.; Won, C.Y.; Malick, A.W.; Kwon, G.S. In Vitro Release of the MTOR Inhibitor Rapamycin from Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly(ϵ -Caprolactone) Micelles. *Journal of Controlled Release* 2006, 110, 370–377, doi:10.1016/j.jconrel.2005.10.008.

81. di Domenico, F.; Barone, E.; Perluigi, M.; Butterfield, D.A. The Triangle of Death in Alzheimer's Disease Brain: The Aberrant Cross-Talk among Energy Metabolism, Mammalian Target of Rapamycin Signaling, and Protein Homeostasis Revealed by Redox Proteomics. *Antioxidants and Redox Signaling* 2017, 26, 364–387.
82. Simamora, P.; Alvarez, J.M.; Yalkowsky, S.H. Solubilization of Rapamycin. *International Journal of Pharmaceutics* 2001, 213, 25–29, doi:10.1016/S0378-5173(00)00617-7.
83. dos Santos, K.C.; dos Reis, L.R.; Rodero, C.F.; Sábio, R.M.; Junior, A.G.T.; Gremião, M.P.D.; Chorilli, M. Bioproperties, Nanostructured System and Analytical and Bioanalytical Methods for Determination of Rapamycin: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2020, doi:10.1080/10408347.2020.1839737.
84. Mahalati, K.; Kahan, B.D. *Clinical Pharmacokinetics of Sirolimus*;
85. Shah, P.R.; Kute, V.B.; Patel, H. v.; Trivedi, H.L. Therapeutic Drug Monitoring of Sirolimus. *Clinical Queries: Nephrology* 2015, 4, 44–49, doi: 10.1016/j.cqn.2015.11.005.
86. Berger, Z.; Ravikumar, B.; Menzies, F.M.; Oroz, L.G.; Underwood, B.R.; Pangalos, M.N.; Schmitt, I.; Wullner, U.; Evert, B.O.; O'Kane, C.J.; et al. Rapamycin Alleviates Toxicity of Different Aggregate-Prone Proteins. *Human Molecular Genetics* 2006, 15, 433–442, doi:10.1093/hmg/ddi458.
87. Sarkar, S.; Krishna, G.; Imarisio, S.; Saiki, S.; O'Kane, C.J.; Rubinsztein, D.C. A Rational Mechanism for Combination Treatment of Huntington's Disease Using Lithium and Rapamycin. *Human Molecular Genetics* 2008, 17, 170–178, doi:10.1093/hmg/ddm294.
88. Ravikumar, B.; Vacher, C.; Berger, Z.; Davies, J.E.; Luo, S.; Oroz, L.G.; Scaravilli, F.; Easton, D.F.; Duden, R.; O'Kane, C.J.; et al. Inhibition of MTOR Induces Autophagy and Reduces Toxicity of Polyglutamine Expansions in Fly and Mouse Models of Huntington Disease. *Nature Genetics* 2004, 36, 585–595, doi:10.1038/ng1362.
89. Chort, A.; Alves, S.; Marinello, M.; Dufresnois, B.A.; Dornbierer, J.-G.; Tesson, C.; Latouche, M.; Baker, D.P.; Barkats, M.; Hachimi, K.H. el; et al. Interferon Beta Induces Clearance of Mutant Ataxin 7 and Improves Locomotion in SCA7 Knock-in Mice. *Brain* 2013, 136, 1732–1745, doi:10.1093/brain/awt061.
90. Bové, J.; Martínez-Vicente, M.; Vila, M. Fighting Neurodegeneration with Rapamycin: Mechanistic Insights. *Nature Reviews Neuroscience* 2011, 12, 437–452.
91. Domínguez, A.; Suárez-Merino, B.; Goñi-De-Cerio, F. Nanoparticles and Blood-Brain Barrier: The Key to Central Nervous System Diseases. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2014, 14, 766–779.
92. Agrawal, U.; Sharma, R.; Gupta, M.; Vyas, S.P. Is Nanotechnology a Boon for Oral Drug Delivery? *Drug Discovery Today* 2014, 19, 1530–1546.
93. Mohanraj, V.J.; Chen, Y. *Nanoparticles-A Review*; 2006; Vol. 5;
94. Wilson, B.; Samanta, M.K.; Santhi, K.; Kumar, K.P.S.; Paramakrishnan, N.; Suresh, B. Poly(n-Butylcyanoacrylate) Nanoparticles Coated with Polysorbate 80 for the Targeted Delivery of Rivastigmine into the Brain to Treat Alzheimer's Disease. *Brain Research* 2008, 1200, 159–168, doi: 10.1016/j.brainres.2008.01.039.
95. Mehmood, Y.; Tariq, A.; Siddiqui, A. *Brain Targeting Drug Delivery System: A Review*; 2015; Vol. 5;
96. Gabathuler, R. Approaches to Transport Therapeutic Drugs across the Blood-Brain Barrier to Treat Brain Diseases. *Neurobiology of Disease* 2010, 37, 48–57.
97. Pandita, D.; Kumar, S.; Lather, V. Hybrid Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles: Design and Delivery Prospectives. *Drug Discovery Today* 2015, 20, 95–104.
98. Cortés, H.; Hernández-Parra, H.; Bernal-Chávez, S.A.; Prado-Audelo, M.L. del; Caballero-Florán, I.H.; Borbolla-Jiménez, F. v.; González-Torres, M.; Magaña, J.J.; Leyva-Gómez, G. Non-Ionic Surfactants for

- Stabilization of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Uses. *Materials* 2021, 14, 3197, doi:10.3390/ma14123197.
99. Carrio, A.; Schwach, G.; Coudane, J.; Vert, M. Preparation and Degradation of Surfactant-Free PLGA Microspheres. *Journal of Controlled Release* 1995, 37, 113–121, doi:10.1016/0168-3659(95)00070-O.
 100. Rodríguez-Cruz, I.M.; Domínguez-Delgado, C.L.; Escobar-Chávez, J.J.; Leyva-Gómez, G.; Ganem-Quintanar, A.; Quintanar-Guerrero, D. Nanoparticle Infiltration to Prepare Solvent-Free Controlled Drug Delivery Systems. *International Journal of Pharmaceutics* 2009, 371, 177–181, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.12.024.
 101. Strickley, R.G. Solubilizing Excipients Used in Commercially Available Oral and Injectable Formulations. *Pharmaceutical Research* 2004, 21, 201–230.
 102. Shaban, S.M.; Kang, J.; Kim, D.H. Surfactants: Recent Advances and Their Applications. *Composites Communications* 2020, 22, 100537.
 103. Phan, H.T.; Haes, A.J. What Does Nanoparticle Stability Mean? *Journal of Physical Chemistry C* 2019, 123, 16495–16507, doi: 10.1021/acs.jpcc.9b00913.
 104. Salatin, S.; Maleki Dizaj, S.; Yari Khosroushahi, A. Effect of the Surface Modification, Size, and Shape on Cellular Uptake of Nanoparticles. *Cell Biology International* 2015, 39, 881–890, doi:10.1002/cbin.10459.
 105. Batrakova, E. v.; Kabanov, A. v. Pluronic Block Copolymers: Evolution of Drug Delivery Concept from Inert Nanocarriers to Biological Response Modifiers. *Journal of Controlled Release* 2008, 130, 98–106, doi: 10.1016/j.jconrel.2008.04.013.
 106. A.V. Kabanov, E.V. Batrakova, D.W.M. Pluronic® Block Copolymers as Modulators of Drug Efflux Transporter Activity in the Blood–Brain Barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003, 55, 151–164.
 107. Martos, A.; Koch, W.; Jiskoot, W.; Wuchner, K.; Winter, G.; Friess, W.; Hawe, A. Trends on Analytical Characterization of Polysorbates and Their Degradation Products in Biopharmaceutical Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017, 106, 1722–1735, doi: 10.1016/j.xphs.2017.03.001.
 108. Sukmawati, A.; Utami, W.; Yuliani, R.; Da’I, M.; Nafarin, A. Effect of Tween 80 on Nanoparticle Preparation of Modified Chitosan for Targeted Delivery of Combination Doxorubicin and Curcumin Analogue. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 2018, 311, 012024, doi:10.1088/1757-899X/311/1/012024.
 109. Kreuter, J.; Shamenkov, D.; Petrov, V.; Range, P.; Cychutek, K.; Koch-Brandt, C.; Alyautdin, R. Apolipoprotein-Mediated Transport of Nanoparticle-Bound Drugs across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Drug Targeting* 2002, 10, 317–325, doi:10.1080/10611860290031877.
 110. Patel, R.R.; Chaurasia, S.; Khan, G.; Chaubey, P.; Kumar, N.; Mishra, B. Cromolyn Sodium Encapsulated PLGA Nanoparticles: An Attempt to Improve Intestinal Permeation. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016, 83, 249–258, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.084.
 111. Mandegari, M.; Ghasemi-Mobarakeh, L.; Zamani, M. Manipulating the Degradation Rate of PVA Nanoparticles by a Novel Chemical-Free Method. *Polymers for Advanced Technologies* 2019, 30, 2381–2391, doi:10.1002/pat.4683.
 112. Pereira, V.A.; de Arruda, I.N.Q.; Stefani, R. Active Chitosan/PVA Films with Anthocyanins from Brassica Oleraceae (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for Application in Intelligent Food Packaging. *Food Hydrocolloids* 2015, 43, 180–188, doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.05.014.
 113. Zhu, C.; Yang, H.; Shen, L.; Zheng, Z.; Zhao, S.; Li, Q.; Yu, F.; Cen, L. Microfluidic Preparation of PLGA Microspheres as Cell Carriers with Sustainable Rapa Release. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2019, 30, 737–755, doi:10.1080/09205063.2019.1602930.
 114. D’Avila Carvalho Erbetta, C. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Copolymer. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 2012, 03, 208–225, doi:10.4236/jbnb.2012.32027.

115. Tapia-Guerrero, Y.S.; del Prado-Audelo, M.L.; Borbolla-Jiménez, F. v.; Giraldo Gomez, D.M.; García-Aguirre, I.; Colín-Castro, C.A.; Morales-González, J.A.; Leyva-Gómez, G.; Magaña, J.J. Effect of UV and Gamma Irradiation Sterilization Processes in the Properties of Different Polymeric Nanoparticles for Biomedical Applications. *Materials* 2020, *13*, doi:10.3390/ma13051090.
116. Kim, M.S.; Kim, J.S.; Park, H.J.; Cho, W.K.; Cha, K.H.; Hwang, S.J. Enhanced Bioavailability of Sirolimus via Preparation of Solid Dispersion Nanoparticles Using a Supercritical Antisolvent Process. *International Journal of Nanomedicine* 2011, *6*, 2997–3009, doi:10.2147/IJN.S26546.
117. Gupta, R.B.; Kompella, U.B. *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*; Gupta, R.B., Kompella, U.B., Eds.; Taylor and Francis.; Drugs and the pharmaceutical sciences: New York, 2006; Vol. 159.
118. Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A.; Allemann, E.; Fessig, H.; Doelkers, E. *Influence of the Stabilizer Coating Layer on the Purification and Freeze-Drying of Poly(D,L-Lactic Acid) Nanoparticles Prepared by an Emulsion-Diffusion Technique*; 1998; Vol. 15;.
119. Quintanar-Guerrero, D.; Tamayo-Esquivel, D.; Ganem-Quintanar, A.; Allémann, E.; Doelker, E. Adaptation and Optimization of the Emulsification-Diffusion Technique to Prepare Lipidic Nanospheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005, *26*, 211–218, doi: 10.1016/j.ejps.2005.06.001.
120. Mai Hoa, L.T.; Chi, N.T.; Triet, N.M.; Thanh Nhan, L.N.; Chien, D.M. Preparation of Drug Nanoparticles by Emulsion Evaporation Method. *Journal of Physics: Conference Series* 2009, *187*, doi:10.1088/1742-6596/187/1/012047.
121. Sathya, S.; Shanmuganathan, B.; Saranya, S.; Vaidevi, S.; Ruckmani, K.; Pandima Devi, K. Phytol-Loaded PLGA Nanoparticle as a Modulator of Alzheimer's Toxic A β Peptide Aggregation and Fibrillation Associated with Impaired Neuronal Cell Function. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 2018, *46*, 1719–1730, doi:10.1080/21691401.2017.1391822.
122. Hitanga, J.; Sharma, N.; Chopra, H.; Kumar, S. *NANOPRECIPITATION TECHNIQUE EMPLOYED FOR THE DEVELOPMENT OF NANOSUSPENSION: A REVIEW*; 2015; Vol. 4.
123. Ghitman, J.; Biru, E.I.; Stan, R.; Iovu, H. Review of Hybrid PLGA Nanoparticles: Future of Smart Drug Delivery and Theranostics Medicine. *Materials and Design* 2020, *193*.
124. Fujikake, N.; Shin, M.; Shimizu, S. Association between Autophagy and Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience* 2018, *12*.
125. Srinija, P.; Guravaiah, M.; Devi, C.H.M. Rapamycin- A Future Versatile Drug. *International journal of advanced research in biological sciences* 2016, *3*, 283–287.
126. Li, J.; Kim, G.; Blenis, J. Rapamycin: One Drug, Many Effects An Introduction to Rapamycin: History and Mechanism of Action. *Cell Metab* 2014, *19*, 373–379, doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.001.Rapamycin.
127. Singh, A.K.; Kashyap, M.P.; Tripathi, V.K.; Singh, S.; Garg, G.; Rizvi, S.I. Neuroprotection Through Rapamycin-Induced Activation of Autophagy and PI3K/Akt1/MTOR/CREB Signaling Against Amyloid- β -Induced Oxidative Stress, Synaptic/Neurotransmission Dysfunction, and Neurodegeneration in Adult Rats. *Molecular Neurobiology* 2017, *54*, 5815–5828, doi:10.1007/s12035-016-0129-3.
128. Shome, S.; Talukdar, A. das; Tewari, S.; Choudhury, S.; Bhattacharya, M.K.; Upadhyaya, H. Conjugation of Micro/Nanocurcumin Particles to ZnO Nanoparticles Changes the Surface Charge and Hydrodynamic Size Thereby Enhancing Its Antibacterial Activity against Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2021, *68*, 603–615, doi:10.1002/bab.1968.
129. Kobayashi, H.; Watanabe, R.; Choyke, P.L. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics* 2014, *4*, 81–89.
130. Lu, B.; Lv, X.; Le, Y. Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles for Control-Released Drug Delivery. *Polymers (Basel)* 2019, *11*, doi:10.3390/polym11020304.
131. Utreja, P.; Verma, S.; Rahman, M.; Kumar, L. Use of Nanoparticles in Medicine. *Current Biochemical Engineering* 2020, *6*, 7–24, doi:10.2174/2212711906666190724145101.

132. Ahamed, M.; Posgai, R.; Gorey, T.J.; Nielsen, M.; Hussain, S.M.; Rowe, J.J. Silver Nanoparticles Induced Heat Shock Protein 70, Oxidative Stress and Apoptosis in *Drosophila Melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010, *242*, 263–269, doi: 10.1016/j.taap.2009.10.016.
133. Instruments, M. *Zetasizer Nano User Manual MAN0485 Issue 1.1 April 2013 English*; 2007;
134. Tapia-Guerrero, Y.S.; del Prado-Audelo, M.L.; Borbolla-Jiménez, F. v.; Giraldo Gomez, D.M.; García-Aguirre, I.; Colín-Castro, C.A.; Morales-González, J.A.; Leyva-Gómez, G.; Magaña, J.J. Effect of UV and Gamma Irradiation Sterilization Processes in the Properties of Different Polymeric Nanoparticles for Biomedical Applications. *Materials* 2020, *13*, doi:10.3390/ma13051090.
135. Vetten, M.A.; Yah, C.S.; Singh, T.; Gulumian, M. Challenges Facing Sterilization and Depyrogenation of Nanoparticles: Effects on Structural Stability and Biomedical Applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2014, *10*, 1391–1399, doi: 10.1016/j.nano.2014.03.017.
136. Silindir, M.; Özer, A.Y. Sterilization Methods and the Comparison of E-Beam Sterilization with Gamma Radiation Sterilization. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009, *34*, 43–53.
137. Memisoglu-Bilensoy, E.; Hincal, A.A. Sterile, Injectable Cyclodextrin Nanoparticles: Effects of Gamma Irradiation and Autoclaving. *International Journal of Pharmaceutics* 2006, *311*, 203–208, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.12.013.
138. Masson, V.; Maurin, F.; Fessi, H.; Devissaguet, J.P. Influence of Sterilization Processes on Poly(ϵ -Caprolactone) Nanospheres. *Biomaterials* 1997, *18*, 327–335, doi:10.1016/S0142-9612(96)00144-5.
139. Bozdog, S.; Dillen, K.; Vandervoort, J.; Ludwig, A. The Effect of Freeze-Drying with Different Cryoprotectants and Gamma-Irradiation Sterilization on the Characteristics of Ciprofloxacin HCl-Loaded Poly(D,L-Lactide-Glycolide) Nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010, *57*, 699–707, doi:10.1211/0022357056145.
140. Shahabi, S.; Najafi, F.; Majdabadi, A.; Hooshmand, T.; Haghbin Nazarpak, M.; Karimi, B.; Fatemi, S.M. Effect of Gamma Irradiation on Structural and Biological Properties of a PLGA-PEG-Hydroxyapatite Composite. *Scientific World Journal* 2014, *2014*, doi:10.1155/2014/420616.
141. Bittner, B.; Mader, K.; Kroll, C.; Borchert, H.-H.; Kissel, T. *Tetracycline-HCl-Loaded Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres Prepared by a Spray Drying Technique: Influence of γ -Irradiation on Radical Formation and Polymer Degradation*; 1999; Vol. 59;.
142. Dutz, S.; Wojahn, S.; Gräfe, C.; Weidner, A.; Clement, J.H. Influence of Sterilization and Preservation Procedures on the Integrity of Serum Protein-Coated Magnetic Nanoparticles. *Nanomaterials* 2017, *7*, doi:10.3390/nano7120453.
143. Zhao, X.; Zhang, Q.; Chen, D.; Lu, P. Enhanced Mechanical Properties of Graphene-Based Polyvinyl Alcohol Composites. *Macromolecules* 2010, *43*, 2357–2363, doi:10.1021/ma902862u.
144. Tapia-Guerrero, Y.S.; del Prado-Audelo, M.L.; Borbolla-Jiménez, F. v.; Giraldo Gomez, D.M.; García-Aguirre, I.; Colín-Castro, C.A.; Morales-González, J.A.; Leyva-Gómez, G.; Magaña, J.J. Effect of UV and Gamma Irradiation Sterilization Processes in the Properties of Different Polymeric Nanoparticles for Biomedical Applications. *Materials* 2020, *13*, doi:10.3390/ma13051090.
145. Zhang, S.J.; Yu, H.Q. Radiation-Induced Degradation of Polyvinyl Alcohol in Aqueous Solutions. *Water Research* 2004, *38*, 309–316, doi: 10.1016/j.watres.2003.09.020.
146. Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not? *Journal of Controlled Release* 2016, *235*, 337–351, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
147. Hong, S.; Hong, L.; Wu, D.; Li, B.; Liu, C.; Guo, W.; Min, J.; Hu, M.; Zhao, Y.; Yang, Q. Oxidative Damage to Human Parametrial Ligament Fibroblasts Induced by Mechanical Stress. *Molecular Medicine Reports* 2015, *12*, 5342–5348, doi:10.3892/mmr.2015.4115.
148. Hernandez-Segura, A.; Nehme, J.; Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology* 2018, *28*, 436–453.

149. Rastogi, R.P.; Richa; Kumar, A.; Tyagi, M.B.; Sinha, R.P. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids* 2010, 2010.
150. Joseph, A.; Simo, G.M.; Gao, T.; Alhindi, N.; Xu, N.; Graham, D.J.; Gamble, L.J.; Nance, E. Surfactants Influence Polymer Nanoparticle Fate within the Brain. *Biomaterials* 2021, 277, doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121086.
151. Kreuter, J. Influence of the Surface Properties on Nanoparticle-Mediated Transport of Drugs to the Brain. In Proceedings of the Journal of Nanoscience and Nanotechnology; May 2004; Vol. 4, pp. 484–488.
152. Yoo, J.; Park, C.; Yi, G.; Lee, D.; Koo, H. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers (Basel)* 2019, 11, doi:10.3390/cancers11050640.
153. Georgieva, J. v; Hoekstra, D.; Zuhorn, I.S. Smuggling Drugs into the Brain: An Overview of Ligands Targeting Transcytosis for Drug Delivery across the Blood–Brain Barrier. *Pharmaceutics* 2014, 6, 557–583, doi:10.3390/pharmaceutics6040557.
154. Pulgar, V.M. Transcytosis to Cross the Blood Brain Barrier, New Advancements and Challenges. *Frontiers in Neuroscience* 2019, 13, 1–9, doi:10.3389/fnins.2018.01019.
155. Nasiri, F.; Faghfour, L.; Hamidi, M. Preparation, Optimization, and in-Vitro Characterization of α -Tocopherol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLNs). *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2020, 46, 159–171, doi:10.1080/03639045.2019.1711388.
156. Caro, N.; Bruna, T.; Guerreiro, A.; Alvarez-Tejos, P.; Garretón, V.; Piletsky, S.; González-Casanova, J.; Rojas-Gómez, D.; Ehrenfeld, N. Florfenicol Binding to Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles in Model and Real Samples. *Nanomaterials* 2020, 10, doi:10.3390/nano10020306.
157. Wilson, B.; Samanta, M.K.; Santhi, K.; Kumar, K.P.S.; Paramakrishnan, N.; Suresh, B. Poly(n-Butylcyanoacrylate) Nanoparticles Coated with Polysorbate 80 for the Targeted Delivery of Rivastigmine into the Brain to Treat Alzheimer’s Disease. *Brain Research* 2008, 1200, 159–168, doi: 10.1016/j.brainres.2008.01.039.
158. Patel, R.R.; Khan, G.; Chaurasia, S.; Kumar, N.; Mishra, B. Rationally Developed Core-Shell Polymeric-Lipid Hybrid Nanoparticles as a Delivery Vehicle for Cromolyn Sodium: Implications of Lipid Envelop on in Vitro and in Vivo Behaviour of Nanoparticles upon Oral Administration. *RSC Advances* 2015, 5, 76491–76506, doi:10.1039/c5ra12732g.
159. Pascolo, L.; Bortot, B.; Benseny-Cases, N.; Gianoncelli, A.; Tosi, G.; Ruozi, B.; Rizzardi, C.; de Martino, E.; Vandelli, M.A.; Severini, G.M. Detection of PLGA-Based Nanoparticles at a Single-Cell Level by Synchrotron Radiation FTIR Spectromicroscopy and Correlation with X-Ray Fluorescence Microscopy. *International Journal of Nanomedicine* 2014, 9, 2791–2801, doi:10.2147/IJN.S58685.
160. Fredenberg, S.; Wahlgren, M.; Reslow, M.; Axelsson, A. The Mechanisms of Drug Release in Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)-Based Drug Delivery Systems - A Review. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 415, 34–52.
161. Houchin, M.L.; Topp, E.M. Chemical Degradation of Peptides and Proteins in PLGA: A Review of Reactions and Mechanisms. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008, 97, 2395–2404.
162. del Prado-Audelo, M.L.; Magaña, J.J.; Mejía-Contreras, B.A.; Borbolla-Jiménez, F. v.; Giraldo-Gomez, D.M.; Piña-Barba, M.C.; Quintanar-Guerrero, D.; Leyva-Gómez, G. In Vitro Cell Uptake Evaluation of Curcumin-Loaded PCL/F68 Nanoparticles for Potential Application in Neuronal Diseases. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2019, 52, 905–914, doi: 10.1016/j.jddst.2019.05.042.
163. Venkateswarlu, V.; Manjunath, K. Preparation, Characterization and in Vitro Release Kinetics of Clozapine Solid Lipid Nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 2004, 95, 627–638, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.01.005.
164. Lu, B.; Lv, X.; Le, Y. Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles for Control-Released Drug Delivery. *Polymers (Basel)* 2019, 11, doi:10.3390/polym11020304.

165. Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Zou, A.; Li, W.; Yao, C.; Xie, S. DDSolver: An Add-in Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS Journal* 2010, *12*, 263–271, doi:10.1208/s12248-010-9185-1.
166. Fredenberg, S.; Wahlgren, M.; Reslow, M.; Axelsson, A. The Mechanisms of Drug Release in Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)-Based Drug Delivery Systems - A Review. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, *415*, 34–52, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.049.
167. Sharma, D.; Maheshwari, D.; Philip, G.; Rana, R.; Bhatia, S.; Singh, M.; Gabrani, R.; Sharma, S.K.; Ali, J.; Sharma, R.K.; et al. Formulation and Optimization of Polymeric Nanoparticles for Intranasal Delivery of Lorazepam Using Box-Behnken Design: In Vitro and in Vivo Evaluation. *BioMed Research International* 2014, *2014*, doi:10.1155/2014/156010.
168. Saqib, M.; Shabbir Ali Bhatti, A.; Ahmad, N.M.; Ahmed, N.; Shahnaz, G.; Lebaz, N.; Elaissari, A. Amphotericin b Loaded Polymeric Nanoparticles for Treatment of Leishmania Infections. *Nanomaterials* 2020, *10*, doi:10.3390/nano10061152.
169. Saraiva, C.; Praça, C.; Ferreira, R.; Santos, T.; Ferreira, L.; Bernardino, L. Nanoparticle-Mediated Brain Drug Delivery: Overcoming Blood-Brain Barrier to Treat Neurodegenerative Diseases. *Journal of Controlled Release* 2016, *235*, 34–47.
170. Romero-Aguilar, L.; Guerra-Sánchez, G.; Tenorio, E.P.; Tapia-Rodríguez, M.; Matus-Ortega, G.; Flores-Herrera, O.; González, J.; Pardo, J.P. Rapamycin Induces Morphological and Physiological Changes without Increase in Lipid Content in Ustilago Maydis. *Archives of Microbiology* 2020, *202*, 1211–1221, doi:10.1007/s00203-020-01833-y.
171. Papandreou, M.E.; Tavernarakis, N. Nucleophagy Mediators and Mechanisms. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier B.V., 2020; Vol. 172, pp. 1–14 ISBN 9780128220214.
172. Grabowski, N.; Hillaireau, H.; Vergnaud, J.; Tsapis, N.; Pallardy, M.; Kerdine-Römer, S.; Fattal, E. Surface Coating Mediates the Toxicity of Polymeric Nanoparticles towards Human-like Macrophages. *International Journal of Pharmaceutics* 2015, *482*, 75–83, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.11.042.
173. Fröhlich, E. The Role of Surface Charge in Cellular Uptake and Cytotoxicity of Medical Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* 2012, *7*, 5577–5591, doi:10.2147/IJN.S36111.
174. Al-Rawi, M.; Diabaté, S.; Weiss, C. Uptake and Intracellular Localization of Submicron and Nano-Sized SiO₂ Particles in HeLa Cells. *Archives of Toxicology* 2011, *85*, 813–826, doi:10.1007/s00204-010-0642-5.
175. Das, A.T.; Tenenbaum, L.; Berkhout, B. SCIENCE BENTHAM. 2016.
176. Kaizuka, T.; Morishita, H.; Hama, Y.; Tsukamoto, S.; Matsui, T.; Toyota, Y.; Kodama, A.; Ishihara, T.; Mizushima, T.; Mizushima, N. An Autophagic Flux Probe That Releases an Internal Control. *Molecular Cell* 2016, *64*, 835–849, doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.037.
177. Mohsen, S.; Sobash, P.T.; Fahad Algwaiz, G.; Nasef, N.; Al-Zeidaneen, S.A.; Karim, N.A. Autophagy Agents in Clinical Trials for Cancer Therapy: A Brief Review. *Curr. Oncol* 2022, *2022*, 1695–1708, doi:10.3390/curronco.
178. Wang, H.L.; Yeh, T.H.; Chou, A.H.; Kuo, Y.L.; Luo, L.J.; He, C.Y.; Huang, P.C.; Li, A.H. Polyglutamine-Expanded Ataxin-7 Activates Mitochondrial Apoptotic Pathway of Cerebellar Neurons by Upregulating Bax and Downregulating Bcl-XL. *Cellular Signalling* 2006, *18*, 541–552, doi: 10.1016/j.cellsig.2005.05.024.
179. Rahman, M.A.; Mostofa, M.G.; Ushimaru, T. The Nem1/Spo7–Pah1/Lipin Axis Is Required for Autophagy Induction after TORC1 Inactivation. *FEBS Journal* 2018, *285*, 1840–1860, doi:10.1111/febs.14448.
180. Din, F. ud; Kim, D.W.; Choi, J.Y.; Thapa, R.K.; Mustapha, O.; Kim, D.S.; Oh, Y.K.; Ku, S.K.; Youn, Y.S.; Oh, K.T.; et al. Irinotecan-Loaded Double-Reversible Thermogel with Improved Antitumor Efficacy

without Initial Burst Effect and Toxicity for Intramuscular Administration. *Acta Biomaterialia* 2017, 54, 239–248, doi: 10.1016/j.actbio.2017.03.007.

181. Rodrigues de Azevedo, C.; von Stosch, M.; Costa, M.S.; Ramos, A.M.; Cardoso, M.M.; Danhier, F.; Pr at, V.; Oliveira, R. Modeling of the Burst Release from PLGA Micro- and Nanoparticles as Function of Physicochemical Parameters and Formulation Characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* 2017, 532, 229–240, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.118.
182. Li, J.; Sun, L.; Liu, Y.; Yao, H.; Jiang, S.; YunzhuPu; Li, Y.; Zhang, Y. To Reduce Premature Drug Release While Ensuring Burst Intracellular Drug Release of Solid Lipid Nanoparticle-Based Drug Delivery System with Clathrin Modification. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2019, 15, 108–118, doi: 10.1016/j.nano.2018.05.014.
183. Wu, H.Y.; Hu, Z.H.; Jin, T. Sustained-Release Microspheres of Amifostine for Improved Radio-Protection, Patient Compliance, and Reduced Side Effects. *Drug Delivery* 2016, 23, 3704–3711, doi:10.1080/10717544.2016.1223222.