



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**NANOPARTÍCULAS DE PLGA PARA FAVORECER EL
DIRECCIONAMIENTO CEREBRAL DE FÁRMACOS**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

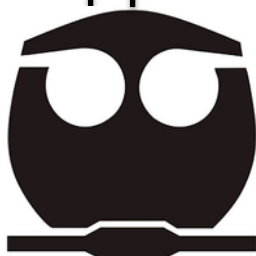
P R E S E N T A

VANIA ALEJANDRA DOMÍNGUEZ TORRES

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**TUTOR DEL TRABAJO
DR. GERARDO LEYVA GÓMEZ**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO.

PRESIDENTE: NOVELO TORRES ALMA MIRIAM

VOCAL: AMADOR GONZALEZ ENRIQUE

SECRETARIO: LEYVA GOMEZ GERARDO (ASESOR)

SUPLENTE 1: JUAREZ OSORNIO CARLOS

SUPLENTE 2: BERNAL CHAVEZ SERGIO ALBERTO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNAM- FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO F, LABORATORIO 307.

ASESOR DEL TEMA:

DR. GERARDO LEYVA GÓMEZ

SUSTENTANTE:

VANIA ALEJANDRA DOMÍNGUEZ TORRES

AGRADECIMIENTOS.

El Dr. Gerardo Leyva Gómez agradece el financiamiento otorgado por el programa CONACyT A1-S-15759.

ÍNDICE.

1.	Introducción.....	9
2.	Nanopartículas de PLGA.....	12
2.1	Síntesis de PLGA	15
2.2	Polimerización de apertura de anillo (ROP).....	16
2.3	Propiedades fisicoquímicas del PLGA	21
3.	Métodos de obtención de nanopartículas de PLGA.	26
3.1	Formación de nanopartículas en un solo paso: nanoprecipitación (desplazamiento de solvente).....	27
3.2	Métodos convencionales basados en emulsificación.	28
3.2.1	Método emulsificación- evaporación de solvente: emulsión única.....	28
3.2.2	Método emulsificación- evaporación de solvente: emulsión doble.....	29
3.2.3	Método de emulsificación- difusión de solvente.....	30
3.2.4	Método <i>salting-out</i> : emulsificación inversa.	30
3.3	Secado por aspersión.	31
3.4	Nuevos métodos de diseño para NP de PLGA.	34
3.4.1	Técnica PRINT.....	34
3.4.2	Plataformas microfluídicas.	35
4.	Caracterización de nanopartículas de PLGA.....	42
5.	Modificaciones superficiales de nanopartículas de PLGA.....	44
5.1	Polietilenglicol (PEG).....	45
5.1.1	Estrategias de PEGilación.	46
5.2	Quitosano.	49
5.2.1	Modificación superficial de NP de PLGA con quitosano vía interacción electrostática.	49
5.2.2	Modificación superficial química de NP de PLGA con quitosano.	51
5.3	Polisorbato.	52
5.4	Vitamina E TPGS.	52
5.5	Metacrilatos (EUDRAGIT®).	53
5.6	Lecitinas.....	54
5.7	Modificación superficial del copolímero PLGA mediante hidrólisis y aminólisis. 56	
5.7.1	Hidrólisis.	56
5.7.2	Aminólisis.....	57

5.8	Modificaciones superficiales de Nanopartículas y el cáncer.	58
5.8.1	Liberación dirigida pasiva.	60
5.8.2	Liberación dirigida activa.	61
5.8.3	Células cancerosas como blanco.	62
5.9	Conjugación de ligandos para mejorar el direccionamiento de fármacos al cerebro. 63	
5.9.1	Barreras fisiológicas.	64
5.9.2	Enfoque de ligando dirigido.	66
5.10	Visualización del direccionamiento de NP de PLGA mediante imágenes <i>in vivo</i> . 75	
6.	Ejemplos de aplicaciones de NP de PLGA para el direccionamiento cerebral.	79
6.1	Nanopartículas de PLGA-Quitano cargadas con análogos de hormona liberadora de tirotrópina (antiepilépticas).	79
6.2	Nanopartículas de PLGA-Colesterol en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.	89
6.3	Nanopartículas de PLGA cargadas con Olanzapina para mejorar el tratamiento de la esquizofrenia.	95
6.4	Nanopartículas de PLGA cargadas con clozapina y risperidona en el tratamiento para la esquizofrenia.	102
6.5	Nanopartículas de PLGA-Tween 80 cargadas con proteína de unión a vitamina D para el tratamiento de Alzheimer.	116
6.6	Plataformas microfluídicas para desarrollar NP de PLGA dirigidas al SNC en la terapia contra VIH.	126
6.7	Ejemplos adicionales de aplicación de NP de PLGA para favorecer el direccionamiento cerebral.	149
7.	Estado actual y desafíos de las NP de PLGA como sistemas de liberación de fármacos novedosos en aplicaciones clínicas.	151
8.	Nanopartículas, una alternativa en la formulación de vacunas contra COVID-19. ...	159
9.	Conclusiones.	169
10.	Referencias.	171

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Imágenes de NP de PLGA por microscopia electrónica de barrido (MEB).....	13
Figura 2. Hidrólisis de PLGA.....	15
Figura 3. Producción del copolímero PLGA a través de la reacción de ROP.....	19
Figura 4. Representación del proceso de internalización de nanopartículas de PLGA en las células.....	23
Figura 5. Aspectos por considerar para el diseño de NP.....	27
Figura 6. Representación gráfica de diferentes técnicas de preparación de NP de PLGA.....	33
Figura 7. Vista esquemática de geometrías microfluídicas basadas en gotas.....	38
Figura 8. Posibilidades de modificación superficial en NP de PLGA para aumentar su tiempo en circulación y favorecer el direccionamiento a su objetivo.....	45
Figura 9. Estrategias de PEGilación.....	48
Figura 10. Modificación superficial con quitosano en NP de PLGA.....	51
Figura 11. Ilustración esquemática de NP de PLGA modificada con Lecitina.....	56
Figura 12. Modificación del polímero PLGA mediante hidrólisis y amino lisis.....	58
Figura 13. Descripción gráfica de direccionamiento pasivo y activo.....	62
Figura 14. Mecanismos de endocitosis de NP de PLGA modificadas superficialmente.....	68
Figura 15. Evaluación de la eficacia del direccionamiento de NP de PLGA mediante técnicas de imagen <i>in vivo</i>	77
Figura 16. Estructuras químicas de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y análogos NP-355 y NP-647.....	81
Figura 17. Reactivos y condiciones de reacción para la síntesis de los análogos de TRH NP-355 y NP-647.....	82
Figura 18. Evaluación del cruce de BBB mediante microscopía de fluorescencia de diferentes partes de cerebro de rata.....	87
Figura 19. Captación <i>in vitro</i> de MIX-NP en células hipocampales.....	94
Figura 20. Perfil de difusión de la Olanzapina de una solución de fármaco y de NP de PLGA.....	98
Figura 21. Difusión <i>ex vivo</i> de Olanzapina de una solución del fármaco libre y de NP de PLGA a través de la mucosa nasal de oveja.....	99
Figura 22. Estado histopatológico de la mucosa nasal de oveja posterior a 2 h de exposición con diferentes muestras.....	100
Figura 23. Perfil de concentración de Olanzapina en el cerebro después de la administración intranasal (i.n.) de NP y solución de fármaco y la administración intravenosa (i.v.) de solución de fármaco en ratas.....	101
Figura 24. Diagrama de flujo de la formación de NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS utilizando el secador por aspersión Buchi Nano B-90.....	103
Figura 25. Microscopía electrónica de transmisión de NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS a 34 000x y 80.0 kV.....	107
Figura 26. Espectros P-XRD de CLZ pura (A), RIS pura (B), PLGA (C), mezcla física de polímero y fármaco (CLZ/RIS) (D) y NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS secadas por aspersión (E).....	109
Figura 27. Espectros FT-IR de CLZ pura (A), RIS pura (B), mezcla física de polímero y fármaco (CLZ/RIS) (C), PLGA (D) y NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS secadas por aspersión (E).....	110
Figura 28. Termograma de PLGA (A), mezcla física CLZ-RIS con PLGA (B), CLZ pura (C), RIS pura (D) y NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS (E).....	112
Figura 29. Perfil de liberación de fármaco <i>in vitro</i> de CLZ y RIS de NP de PLGA de bajo peso molecular (viscosidad inherente 0.2 dL/g) y alto peso molecular (viscosidad inherente 0.4 dL/g).....	114
Figura 30. Citotoxicidad <i>in vitro</i> en células PC-12 (ensayo MTT) de medio DMEM, CLZ-RIS puras, NP sin fármacos y NP de PLGA (viscosidad inherente 0.2 y 0.4 dL/g) cargadas con CLZ-RIS.....	115

Figura 31. Caracterización de NP DBP-PLGA-T80.....	120
Figura 32. Efecto de NP de PLGA cargadas con DBP sobre la polimerización y acumulación de A β	121
Figura 33. Efecto inhibitorio de las NP DBP-PLGA-T80 sobre la acumulación de A β en el hipocampo de ratones 5XFAD.....	123
Figura 34. Efecto inhibitorio de las NP de PLGA cargadas con DBP sobre la activación glial reactiva y la pérdida neuronal.....	124
Figura 35. Efecto inhibitorio de las NP de PLGA cargadas con DBP sobre el deterioro cognitivo.....	125
Figura 36. Representación esquemática de los enfoques convencional y microfluídico, utilizados para producir NP de PLGA cargadas con EFV.....	127
Figura 37. Grupos funcionales de las NP de PLGA durante las diferentes etapas del proceso de funcionalización con un péptido de unión al receptor de transferrina.....	129
Figura 38. Imágenes de MET de NP de PLGA cargadas con EFV producidas mediante el método convencional y microfluídico.....	135
Figura 39. Perfil de liberación <i>in vitro</i> de EFV de NP de PLGA producidas mediante microfluídica.....	137
Figura 40. Análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (¹ H NMR) de NP de PLGA no funcionalizadas y funcionalizadas con péptido de unión al receptor de transferrina.....	138
Figura 41. Actividad metabólica de las células hCMEC/D3 y ND7/23 incubadas con diferentes concentraciones de EFV libre, NP sin fármaco, NP sin fármaco funcionalizadas, NP cargadas con EFV y NP cargadas con EFV funcionalizadas durante 24 h.....	140
Figura 42. Porcentaje de hemólisis asociado con EVF libre, NP sin fármaco, NP sin fármaco funcionalizadas, NP cargadas con EFV y NP cargadas con EFV funcionalizadas.....	142
Figura 43. Imágenes de MEB de la morfología de glóbulos rojos posterior a su incubación con 50 μ M de NP sin fármaco y NP cargadas con EFV, durante 3 h.....	143
Figura 44. Nivel de interacción entre las células hCMEC/D3 y las NP de PLGA producidas por microfluídica, funcionalizadas y no funcionalizadas.....	145
Figura 45. Nivel de interacción entre células hCMEC/D3 y NP de PLGA producidas por microfluidos funcionalizadas con péptido de unión al receptor de transferrina.....	146
Figura 46. Permeabilidad de EFV en forma libre, así como cargado en NP no funcionalizadas o funcionalizadas, a través de un modelo de BBB <i>in vitro</i>	148
Figura 47. Vía de administración de productos farmacéuticos comercializados actualmente.....	152
Figura 48. Clasificación de 10 sistemas de liberación de fármacos (DDS) con base en la proporción de los ensayos clínicos globales y las publicaciones globales (eje horizontal), y la proporción de productos aprobados por la FDA con respecto a los ensayos clínicos en EUA (eje vertical).....	154
Figura 49. Ensayos pre-clínicos y clínicos actuales de las vacunas contra COVID-19, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) al 8 de diciembre de 2020.....	161
Figura 50. Estructura de SARS-CoV-2, virus de ARN monocatenario de sentido positivo que comparte una similitud genética de 79.6% con el SARS-CoV y que codifica las proteínas S, M, E y N.....	162
Figura 51. (A) Representación esquemática de la estructura de nanopartículas lipídicas (LNP). (B) Principio e importancia del pKa en el mecanismo de acción de los lípidos ionizables. (C) Micrografía electrónica criogénica de LNP con un aumento de 110,000x.....	164
Figura 52. Estructuras de componentes empleados en la formulación de nanopartículas lipídicas.....	166

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Rutas sintéticas para obtención del copolímero PLGA.....	20
Tabla 2. Ejemplos de nanopartículas de PLGA y sus métodos de obtención.....	41
Tabla 3. Parámetros y métodos de caracterización de NP de PLGA.....	43
Tabla 4. Pros, contras y aplicabilidad de ligandos de direccionamiento cerebral más utilizados.....	74
Tabla 5. Tipo de endocitosis de ejemplos de funcionalizadores de NP de PLGA.....	75
Tabla 6. Efecto de los análogos de TRH NP-355 y NP-647 libres y de las NP de PLGA-quitosano cargadas con ellos en convulsiones inducidas por Pentilentetrazol.....	88
Tabla 7. Efecto del diámetro de la espesa y la viscosidad inherente (VI) del polímero PLGA sobre las características de las NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS.....	107
Tabla 8. Tamaño medio de partícula, PDI (índice de polidispersidad), potencial Z, eficiencia de encapsulación y carga de fármaco de NP de PLGA vacías y cargadas con EFV obtenidas mediante los métodos convencional (nanoprecipitación) y microfluídico.....	134
Tabla 9. Análisis de espectro de rayos X por energía dispersiva (EDS) de NP de PLGA cargadas con EFV producidas mediante los métodos convencional y microfluídico.....	136
Tabla 10. Otros ejemplos de aplicación de NP de PLGA con direccionamiento al cerebro.....	149
Tabla 11. Relación entre la cantidad de medicamentos genéricos y medicamentos nuevos.....	153
Tabla 12. Número de publicaciones, ensayos clínicos y productos comercializados de 10 tecnologías farmacéuticas avanzadas (1980-2017).....	156
Tabla 13. Formulaciones inyectables basadas en PLGA de liberación sostenida aprobadas por la FDA.....	158

1. Introducción.

Debido a las crecientes barreras técnicas, la investigación y el desarrollo (I&D) de nuevas entidades moleculares (NEM) se ha visto disminuido, generando que nuevos sistemas de liberación de fármacos, como las nanopartículas (NP) atraigan una atención generalizada, debido a que este tipo de sistemas puede mejorar considerablemente las propiedades fisicoquímicas del fármaco, haciendo que tenga un mejor efecto terapéutico en comparación con la administración del fármaco en una forma farmacéutica diferente a éste sistema de liberación.

Las nanopartículas son sistemas coloidales de estructura compacta con un tamaño de alrededor de 100 nm, donde el agente terapéutico es encapsulado dentro de la matriz coloidal o se recubre sobre la superficie de la partícula por conjugación o adsorción. Las NP son los sistemas de liberación de fármacos mayormente utilizados en el estudio de enfermedades neurodegenerativas, debido a que poseen una carga de fármaco relativamente alta y un tamaño diminuto, además de liberar el ingrediente activo al sitio específico a una velocidad controlada y sostenida.

Diversos tipos de polímeros sintéticos (p. ej. el ácido poliláctico-co-glicólico [PLGA]), polímeros naturales (p. ej. quitosano, sulfato de condroitina y ácido hialurónico), han sido utilizados en el desarrollo de NP. Entre estos diversos materiales, el PLGA es uno de los polímeros preferidos para la fabricación de NP destinadas a la administración de fármacos sitio dirigida, debido a sus características de biocompatibilidad y biodegradabilidad. El PLGA puede degradarse en ácido láctico (LA) y ácido glicólico (GA), mismos que pueden ingresar a vías metabólicas. Por lo tanto, se puede aplicar de forma segura a la preparación de formulaciones inyectables, ya que este polímero ha sido aprobado por la FDA (Food and drug administration) y la EMA (European Medicines Agency) para su aplicación en este tipo de formulaciones. Adicionalmente a las características mencionadas, el PLGA se puede modificar químicamente para dar biofuncionalidad (es decir, capacidad de direccionamiento al blanco deseado), así como proporcionar un tiempo de circulación en sangre prolongado.

Moléculas pequeñas, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos con diversas propiedades fisicoquímicas pueden encapsularse o ser adsorbidos en la superficie externa de estas NP de PLGA. Siendo así, que la modificación superficial conveniente, tanto como su bioseguridad favorable, pueden elevar la factibilidad de aplicar NP de PLGA en la clínica.

Las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Huntington, entre otras, representan un gran problema para las familias y la sociedad. Las investigaciones científicas relacionadas avanzan con lentitud, siendo una de las principales razones, que la patogenia conocida es solo la punta del iceberg. Otra razón es que varias barreras fisiológicas, especialmente barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés), impiden que las sustancias terapéuticas lleguen al sitio de acción. De hecho, el 98% de los fármacos potenciales que pueden mejorar la terapia de diversas enfermedades del sistema nervioso central (SNC) no se encuentran en la clínica debido a su incapacidad para cruzar BBB. Los fármacos en el tratamiento clínico de enfermedades neurodegenerativas se administran comúnmente por vía oral y, en términos generales, la eficiencia de focalización cerebral es bastante baja. La tecnología de nanolibración brinda esperanza para las enfermedades neurodegenerativas. El uso de nanoportadores que encapsulen fármacos con propiedades fisicoquímicas no favorables para su transporte a través de BBB (p. ej. fármacos hidrofílicos, ya que la unión compacta entre las células endoteliales del cerebro evita el transporte paracelular) puede mejorar el transporte de ellos, a través de esta barrera, en enfermedades neurodegenerativas y apuntar a regiones relevantes del cerebro para procesos regenerativos.

Existen varios receptores presentes en la superficie de BBB, particularmente para diferentes proteínas, péptidos y anticuerpos. Estos últimos, se utilizan como ligandos que se pueden anclar a las NP mediante modificaciones superficiales, ayudando a su translocación a través de transcitosis mediada por receptores. Al mismo tiempo, el vehículo catiónico cruza BBB a través de transcitosis mediada por absorción. Una estrategia más es la transcitosis mediada por transportador que utiliza algunos nutrientes como la glucosa y el glutatión, uniéndose a la superficie del transportador y facilitando su translocación.

En este Trabajo Monográfico de Actualización (TMA), se analizarán los diferentes métodos de obtención de NP de PLGA, así como de las posibles modificaciones superficiales que estas NP pueden experimentar para poder superar BBB, mejorando así, el direccionamiento cerebral y, por tanto, su efectividad. Finalmente, se mostrarán algunos ejemplos de estudios con NP de PLGA para direccionamiento cerebral y de nanosistemas de PLGA, aprobados por la FDA.

2. Nanopartículas de PLGA.

Las nanopartículas son estructuras sólidas y esféricas (**Figura 1**) con un tamaño alrededor de 100 nm, elaboradas a partir de polímeros naturales o sintéticos. Los polímeros naturales incluyen materiales inorgánicos como la hidroxiapatita y azúcares complejos, como el quitosano y el hialuronano, mientras que los polímeros sintéticos incluyen materiales comparativamente más hidrófobos, como los α -hidroxiácidos (una clase de polímeros que contiene poli anhídridos, al ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), entre otros) ¹. En los últimos años, las NP han sido ampliamente estudiadas por las ciencias biomédicas, ya que son consideradas transportadores multifacéticos para la acción sitio-específica de fármacos, pudiendo transportar diversas sustancias como macromoléculas biológicas y fármacos, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, a células específicas y órganos como el cerebro, el hígado y los pulmones, permitiendo también tener una liberación controlada de estas sustancias ². Las nanoestructuras ofrecen ventajas de gran alcance, por ejemplo, la mejora la captación celular debido al tamaño reducido de partícula, mayor eficacia de atrapamiento de fármacos y concentraciones mínimas inhibitorias menores¹.

La acción sitio-específica de los fármacos a una dosis terapéuticamente óptima y un régimen de dosificación determinado, se puede lograr controlando parámetros tales como tamaño de partícula, propiedades superficiales y tasa de liberación, durante la síntesis y el diseño de las nanopartículas. Sin embargo, para que una nanopartícula pueda ser utilizada como un sistema de liberación de fármacos, debe poseer propiedades tales como biocompatibilidad, compatibilidad con fármacos y una adecuada cinética de biodegradación¹.

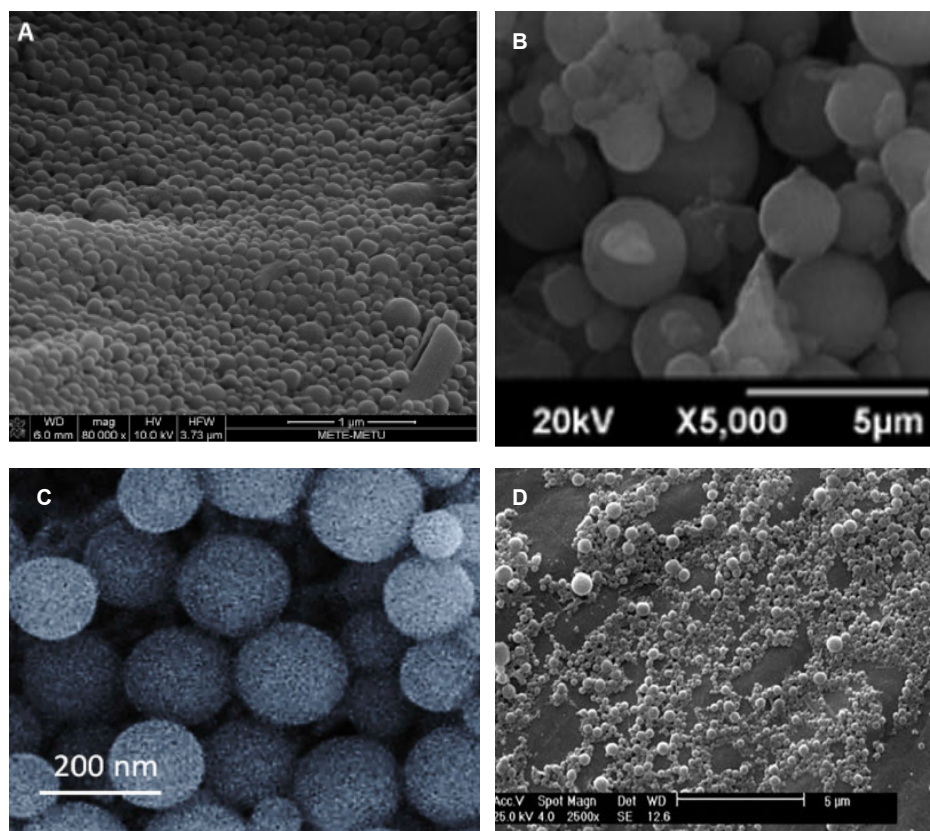


Figura 1. Imágenes de NP de PLGA por microscopía electrónica de barrido (MEB).
A) NP de PLGA cargadas con Paclitaxel y R-flurbiprofeno recubiertas con quitosano.⁵⁰
B) NP de PLGA cargadas con Bacósido-A recubiertas con polisorbato 80.⁴⁹ **C)** NP de PLGA cargadas con selenio modificadas superficialmente con curcumina.⁵¹ **D)** NP de PLGA cargadas con Paclitaxel y Metotrexato ⁵².

Las nanopartículas a base de polímeros han sido utilizadas para liberación sitio-específica de fármacos en terapia contra cáncer, el diagnóstico clínico bioanalítico, para diseñar estructuras base por ingeniería de tejidos, tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, entre otras². Para la síntesis de nanopartículas, se han utilizado una variedad de polímeros, sin embargo, el copolímero PLGA es uno de los polímeros biodegradables más exitosamente desarrollado en este contexto. Entre los diferentes polímeros desarrollados para formular nanopartículas poliméricas, PLGA ha atraído, considerablemente, la atención de los investigadores por las siguientes características: (i) biodegradabilidad completa en medio acuoso y biocompatibilidad, (ii) aprobación por la FDA (Food and Drug Administration) y la EMA (European Medicines Agency) en sistemas de liberación de fármacos para administración

parenteral, (iii) formulaciones bien descritas y métodos de producción adaptados a varios tipos de fármacos, por ejemplo, moléculas hidrófilas o hidrófobas, moléculas pequeñas o macromoléculas, etc. (iv) protección del fármaco contra la degradación, (v) posibilidad de liberación sostenida, (vi) posibilidad de modificar las propiedades de la superficie para proporcionar una mejor interacción con las dianas biológicas y (vii) posibilidad de dirigir a las nanopartículas a órganos o células específicos ³. Se ha demostrado que las nanopartículas de PLGA son un excelente vector de biomoléculas como ARN, ADN, péptidos, vitaminas, proteínas y fármacos (hidrofílicos y lipofílicos), tanto *in vivo* como *in vitro*. Adicional a las propiedades mencionadas, PLGA es uno de los polímeros biodegradables más exitosamente utilizados porque cuando es sometido a hidrólisis acuosa, el esqueleto polimérico unido por enlaces éster, se hidroliza dando como resultado un grupo OH y un grupo COOH. La reducción en el peso molecular, debido a la escisión de cadenas de polímeros largos, da como resultado un carácter hidrofílico aumentado, produciendo dos monómeros metabólicos: ácido láctico y ácido glicólico (Figura 2). Debido a que estos dos monómeros son endógenos y el cuerpo los metaboliza fácilmente a través del ciclo de Krebs, a subproductos más simples como el CO₂ y H₂O, una toxicidad sistémica mínima se asocia con el uso de PLGA para la liberación de fármacos o aplicaciones de biomateriales. Los efectos de toxicidad de las nanopartículas de PLGA se han determinado en una amplia variedad de líneas celulares, incluidas las células Caco-2, Colo 205 y MDBK mostrando una mínima toxicidad o incluso ausencia de la misma *in vitro*, adicionalmente, también se han probado para determinar su toxicidad *in vivo* en órganos viscerales (hígado, cerebro, bazo, intestino y riñón) obteniendo resultados similares a los obtenidos *in vitro*¹.

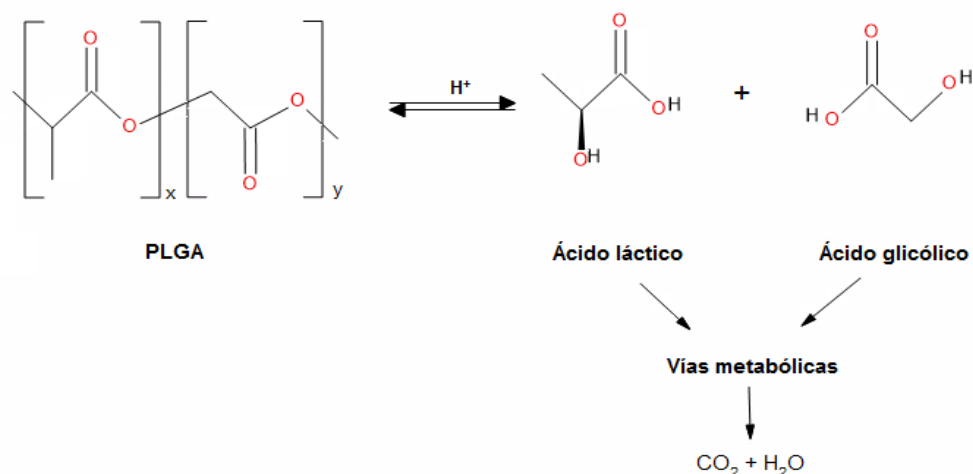


Figura 2. Hidrólisis de PLGA: el copolímero es hidrolizado en dos monómeros metabólicos, ácido láctico y ácido glicólico.

Imagen modificada de: Danhier, F. *et al.* PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **161**, 506 (2012)³.

2.1 Síntesis de PLGA

El PLGA es un copolímero sintético de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA) formado por los monómeros; ácido glicólico (GA) y ácido láctico (LA). La síntesis de copolímeros de PLGA puede implicar directamente ácido láctico y glicólico, o sus diésteres cíclicos, lactida y glicólido, respectivamente. En lo que concierne al LA, su disposición similar a bloques de construcción origina el PLA, que también es parte de la familia de polímeros de poliésteres alifáticos. El copolímero PLGA generalmente es preferible sobre PLA en aplicaciones biológicas debido principalmente, a que este último posee una tasa de degradación más lenta. El ácido láctico se puede obtener en los enantiómeros D- o L- ópticamente activos a través de la fermentación del maíz y otras fuentes agrícolas diferentes y, dependiendo de la proporción de estos enantiómeros, pueden derivarse PLA y PLGA con propiedades diversificadas. Debido a la existencia de estas dos formas estereoisoméricas ópticamente activas de LA, también se pueden formar tres estereoisómeros diferentes de lactida: D-lactida (D: Dextrógiro), L-lactida (L: Levógiro) y la meso-lactida ópticamente inactiva. L-lactida y la mezcla de L y D-lactida en una proporción 1:1, conocida como D, L-lactida o lactida racémica, son las dos formas principales que se aplican en la fabricación de polímeros¹³.

Con respecto al GA, su disposición semejante a bloques de construcción origina el PGA, que es el poliéster alifático lineal más simple. Las aplicaciones biomédicas del PGA son limitadas debido a su alta tasa de degradación, originando subproductos ácidos y baja solubilidad¹³.

La síntesis de PLGA se realiza actualmente a través de dos diferentes enfoques: (1) reacción de policondensación directa de los ácidos láctico y glicólico y (2) polimerización de apertura de anillo (ROP) o poliadición de lactidas y glicólidos¹³. La síntesis de PLGA a través del enfoque de policondensación directa consiste en la polimerización directa de monómeros de ácido láctico y glicólico. La reacción entre los monómeros ocurre bajo condiciones de agitación y fusión, siendo opcional la presencia de un catalizador. Sin embargo, los copolímeros de PLGA obtenidos por policondensación directa generalmente se asocian con un bajo peso molecular. Esta limitación puede deberse a las altas condiciones de vacío y temperatura generalmente utilizadas para eliminar el agua producida en la reacción de condensación. Además, otros fenómenos indeseables son susceptibles de ocurrir durante el proceso. Esto incluye la ocurrencia simultánea de reacciones secundarias, como la transesterificación, que da como resultado la formación de estructuras basadas en anillos (p. ej., lactida o glicólido). A pesar del costo relativamente bajo asociado con la policondensación directa, este enfoque ha caído en desuso debido a que el PLGA resultante ha demostrado una aplicabilidad limitada ¹³.

En los últimos años, ROP ha sido foco de gran interés en la síntesis de PLGA, principalmente debido a que es la ruta más común para lograr copolímeros de alto peso molecular¹³. Por lo tanto, este enfoque será en el que se tratará a mayor detalle.

2.2 Polimerización de apertura de anillo (ROP).

Las lactonas, lactida y glicólido, son los reactivos clave en el enfoque ROP. Dado que solo unas pocas lactonas pueden polimerizar espontáneamente cuando están en contacto y a altas temperaturas, la presencia de un catalizador en este enfoque es casi obligatoria¹³.

La reacción de ROP (**Figura 3**) puede realizarse en condiciones sin disolvente o basadas en solución. En relación con el enfoque sin disolvente (o en masa), la variable de mayor interés es la temperatura a la que se produce la reacción. Ya que, la reacción de ROP puede consistir en una polimerización en estado sólido, en caso de que se realice a temperaturas más bajas que el punto de fusión del PLGA, o en una polimerización en estado fundido, si se realiza a temperaturas más altas que el punto de fusión del PLGA. En relación con el enfoque de solución, que implican la presencia de un disolvente específico en la reacción de ROP, las dificultades asociadas con su eliminación al final del proceso son la justificación del uso poco frecuente de este tipo de polimerización. Por lo tanto, la reacción de ROP realizada mediante el enfoque de fusión sin disolvente se considera la más reproducible, simple y comercialmente atractiva¹³.

La sal de estaño conocida como octoato de estaño o 2-etilhexanoato de estaño (II) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), es uno de los catalizadores más utilizados en la producción de materiales poliméricos para su aplicación en el campo de la medicina, desde que fue aprobada por la FDA para aplicaciones alimentarias y médicas. Este catalizador puede iniciar la reacción de polimerización, promoviendo el crecimiento de la cadena mediante un mecanismo de coordinación-inserción. El alcohol laurílico, o 1-dodecanol, generalmente se agrega a la reacción para desencadenar la acción del $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, que se convierte en alcóxido de estaño, siendo éste el verdadero iniciador del proceso. Además, también se sabe que el alcohol laurílico regula el peso molecular promedio del polímero final. La polimerización de coordinación-inserción de monómeros de lactida y glicólido, para formar PLGA, comienza con la coordinación del alcóxido metálico a las lactonas, en un proceso donde los grupos carbonilo de lactonas se vuelven más propensos a ser atacados nucleófilamente. La polimerización continúa con la ruptura acil-oxígeno de los monómeros (apertura del anillo), posteriormente insertándose en el enlace metal-oxígeno. Este proceso de alargamiento de cadena se repite continuamente, mientras que el iniciador de metal permanece unido a la estructura. Al final de la polimerización, una reacción de hidrólisis conduce a la formación de un grupo terminal hidroxilo. Se sabe que el glicólido se inserta preferiblemente primero en el enlace metal-oxígeno debido a su mayor reactividad en comparación con la lactida¹³.

Además de la efectividad del $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalizador en la reacción de ROP, las preocupaciones sobre su citotoxicidad han sido considerables. Por lo tanto, en el campo biomédico, se deben desarrollar alternativas menos tóxicas como sales o complejos de zinc, o incluso enzimas¹³.

La reacción de ROP de lactida y glicólido para producir PLGA por el enfoque de fusión sin disolvente debe comenzar con monómeros purificados. Típicamente, los monómeros y una solución del catalizador se agregan a un matraz de fondo redondo y la mezcla se deja agitando bajo calentamiento en un baño de aceite de silicio. El tiempo y la temperatura deberían ser suficientes para fundir los monómeros y mezclarlos completamente con el catalizador. Se ha reportado que la polimerización generalmente toma de 2 a 6 h bajo temperaturas alrededor de 175°C , cuando se usa $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ¹³.

Independientemente de la metodología de síntesis, el copolímero de PLGA resultante debe purificarse cuidadosamente. Esto se puede hacer eliminando los monómeros que no reaccionaron mediante la disolución del PLGA en disolventes orgánicos, como cloroformo o cloruro de metileno, y realizando una precipitación con metanol frío. Finalmente, y especialmente en el caso de aplicaciones médicas, todos los disolventes residuales en la solución del polímero deben eliminarse por completo, secando bajo presión reducida y calentando¹³.

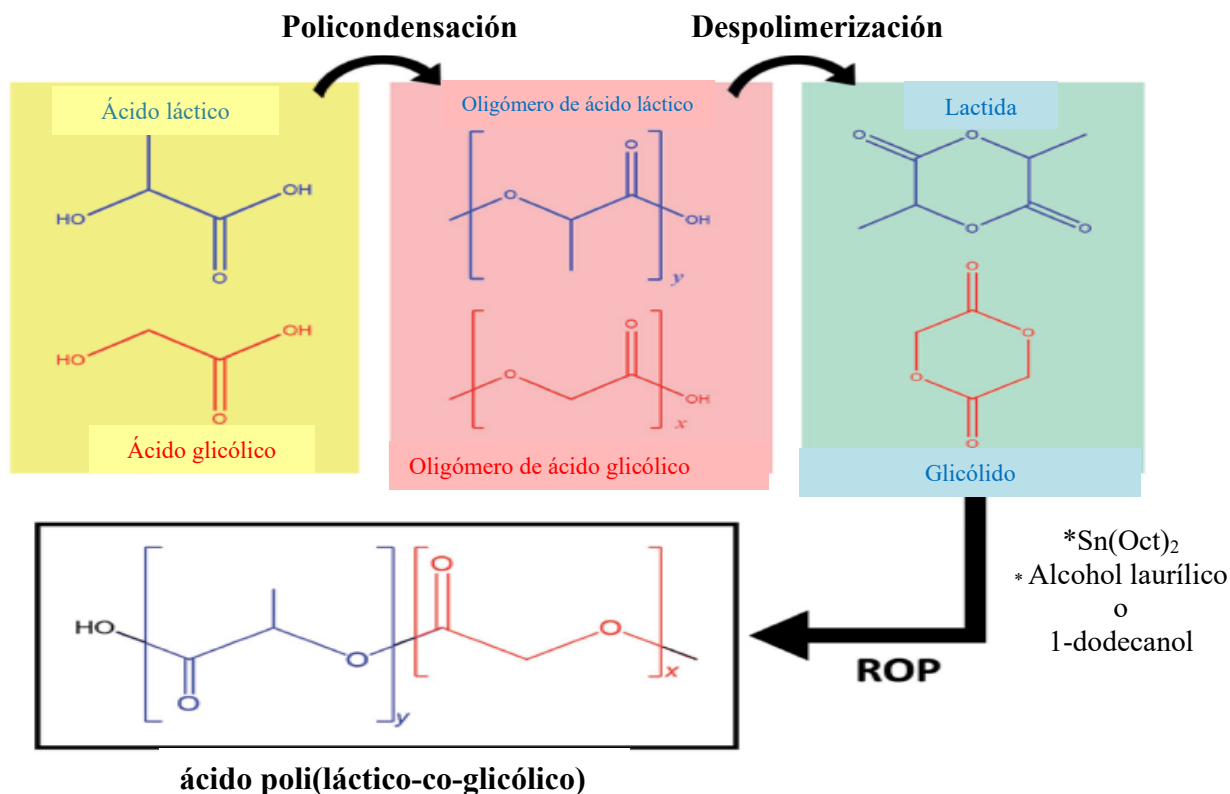


Figura 3. Producción del copolímero PLGA a través de la reacción de ROP. Para obtener los elementos clave para la ROP, lactida y glicólido, LA y GA se policondensan en un oligómero, que luego se despolimeriza a través de una reacción de descompresión térmica. Imagen modificada de: Martins, C., Sousa, F., Araújo, F. & Sarmiento, B. Functionalizing PLGA and PLGA Derivatives for Drug Delivery and Tissue Regeneration Applications. 1701035, 1–24 (2017)¹³.

Se pueden obtener diferentes formas de PLGA variando la proporción de los ácidos glicólico y láctico durante la reacción de polimerización, por ejemplo, PLGA 50:50 (el tipo de PLGA más frecuentemente aplicado; se refiere a un copolímero compuesto de 50% ácido láctico y 50% ácido glicólico), PLGA 75:25, PLGA 80:20, etc. Los parámetros del proceso y las condiciones de reacción afectan en gran medida las propiedades fisicoquímicas del producto final. Es por eso por lo que, para obtener un polímero con las características deseadas, se han desarrollado diversos mecanismos de síntesis realizando pequeñas modificaciones en los parámetros del proceso de métodos ya existentes².

Diferentes mecanismos para la síntesis de PLGA junto con sus parámetros de proceso, ventajas y desventajas se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Rutas sintéticas para obtención del copolímero PLGA.

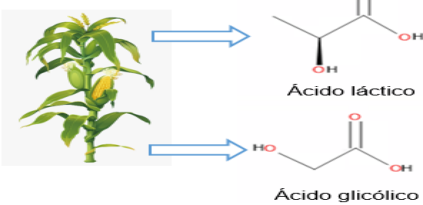
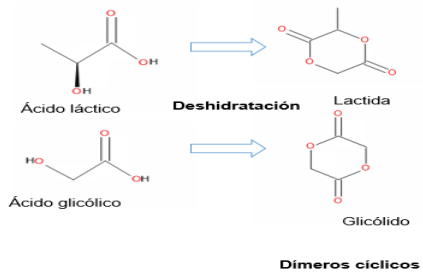
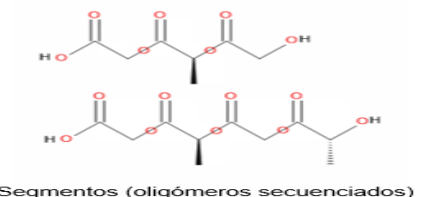
Ruta sintética	Materia prima	Subtipos	Parámetros del proceso	Ventajas y desventajas
Policondensación	 <p>Ácido láctico</p> <p>Ácido glicólico</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Policondensación de solución directa • Policondensación azeotrópica 	<p>> 120 °C, condición para remoción de agua</p> <p>Mayor punto de ebullición, difenil éter</p>	<p>Desventaja: masa molar <10 kDa</p> <p>Ventaja: masa molar elevada</p>
		<ul style="list-style-type: none"> • Policondensación de fusión 	<p>Sin solventes azeotrópicos</p>	<p>Ventaja: masa molar elevada, sin contaminación ambiental</p>
Polimerización de apertura de anillo	 <p>Ácido láctico</p> <p>Ácido glicólico</p> <p>Deshidratación</p> <p>Lactida</p> <p>Glicólido</p> <p>Dímeros cíclicos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Catalizadores metálicos • Apertura de anillo enzimática 	<p>130–220°C. Estaño (II) 2-etilhexanoato, alcóxidos de estaño (II) u octoato de estaño (SnOct2), aluminio isopropóxido</p> <p>Temperatura, pH y presión moderadas. Lipasa</p>	<p>Ventaja: masa molar elevada</p> <p>Desventaja: contaminación con residuos metálicos tóxicos, PLGA aleatorio/atáctico</p> <p>Ventaja: condiciones de reacción moderadas, favorable al medio ambiente</p> <p>Desventaja: largos tiempos de reacción, se requieren altas cantidades de enzima, polímero aleatorio / atáctico</p>
		<p>No aplica</p>	<p>1,3 diisopropilcarbodiimida (DIC), 4 (dimetilamino) piridinio p-toluenosulfonato (DPTS)</p>	<p>Ventaja: se obtiene un copolímero de PLGA de secuencia repetitiva con secuencia/ estereoquímica y cinética de degradación altamente ajustables.</p>
Polimerización por ensamble de segmentos	 <p>Segmentos (oligómeros secuenciados)</p>	<p>No aplica</p>	<p>1,3 diisopropilcarbodiimida (DIC), 4 (dimetilamino) piridinio p-toluenosulfonato (DPTS)</p>	<p>Ventaja: se obtiene un copolímero de PLGA de secuencia repetitiva con secuencia/ estereoquímica y cinética de degradación altamente ajustables.</p>

Tabla modificada de: Mir, M., Ahmed, N. & Rehman, A. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **159**, 219 (2017) ¹.

2.3 Propiedades fisicoquímicas del PLGA

Las propiedades fisicoquímicas de los polímeros son importantes para su caracterización y determinación de la relación estructura-propiedad. Siendo así otra de las ventajas de los polímeros PLGA, que están disponibles comercialmente con propiedades fisicoquímicas diferentes, y que el perfil de liberación del fármaco se puede modificar seleccionando un polímero PLGA con propiedades adecuadas; por ejemplo, peso molecular y relación lactida:glícólido. Las propiedades fisicoquímicas más importantes de los polímeros biodegradables incluyen hidrofobicidad, peso molecular, cristalinidad, biodegradabilidad, carga superficial, composición del copolímero y temperatura de transición vítrea (Tg). Se sabe que propiedades físicas como el peso molecular, la temperatura de transición vítrea y el grado de cristalinidad, afectan el comportamiento de hinchamiento, la tasa de biodegradación y la resistencia mecánica del polímero¹. El tipo y la relación molar de los componentes de monómero individuales (lactida y glícólido) en la cadena de polímero, influyen directamente en muchas propiedades del PLGA, como lo es en el grado de cristalinidad, la resistencia mecánica, el comportamiento de hinchamiento, la temperatura de transición vítrea y el grado de hidrólisis del polímero. La relación LA:GA es muy importante para conferir al PLGA propiedades específicas, por ejemplo, la temperatura de fusión. Se ha demostrado que la temperatura de fusión del PLGA disminuye al aumentar la fracción molar de GA en la composición del polímero. Siendo este cambio en el punto de fusión una gran ventaja ya que permite la producción de un amplio espectro de estructuras. Así mismo, dependiendo del peso molecular y la relación LA:GA utilizada, el tiempo de degradación del polímero puede variar de varios meses a incluso años. Los polímeros de bajo peso molecular con mayor contenido de GA son más hidrófilos y amorfos, y por tanto tienen un tiempo de degradación más corto. Ya que el GA es más hidrófilico que el LA (debido a la ausencia de grupos laterales metilo) y, por lo tanto, tiende a absorber una gran cantidad de agua. Por el contrario, los polímeros con mayor contenido de LA son más hidrófobos, absorben menos cantidad de agua y se degradan de manera más gradual. Este fenómeno ha demostrado ser útil para la liberación controlada y sostenida de fármacos, variando de semanas a meses¹³.

Adicionalmente, PLGA con un extremo de éster puede tener una mayor resistencia a la hidrólisis en comparación con un PLGA con extremo ácido¹⁴. Del mismo modo, la secuencia de monómeros en el PLGA influye en gran medida en la tasa de degradación, ya que un PLGA aleatorio muestra una degradación rápida en comparación con un PLGA secuenciado².

Los polímeros obtenidos de L-LA (dos moléculas de ácido L-láctico combinadas para formar el dímero) son propensos a ser semicristalinos, mientras que aquellos obtenidos de D, L-LA (una molécula de ácido L-láctico y una molécula de ácido D-láctico) originan estructuras amorfas. El GA está asociado con polímeros altamente cristalinos, sin embargo, esta propiedad se pierde rápidamente cuando se ensambla para formar el PLGA. Por lo tanto, se sabe que el PLGA es amorfo en lugar de cristalino. Los polímeros cristalinos exhiben una resistencia mecánica significativamente mayor que los amorfos. Sin embargo, las estructuras amorfas siguen siendo preferidas para aplicaciones biomédicas, especialmente para fines de administración de fármacos, ya que están relacionadas con una distribución más homogénea del compuesto activo contenido en la matriz polimérica¹³.

El copolímero PLGA es soluble en una gran variedad de solventes como acetato de etilo, diclorometano, tetrahidrofurano, hexafluoroisopropanol, cloroformo, alcohol bencílico y acetona, sin embargo, esta solubilidad se puede ver disminuida con el aumento en el contenido de GA en el copolímero².

Un ejemplo de aplicación de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de PLGA es su internalización en las células. Este proceso ocurre a través de endocitosis mediada por clatrina. Las nanopartículas de PLGA escapan de los endolisosomas y entran al citoplasma dentro de los 10 minutos posteriores a la incubación. Facilitando la interacción de las nanopartículas con las membranas vesiculares, lo que conduce a una desestabilización transitoria y localizada de la membrana, resultando en la entrada de las nanopartículas al citosol (**Figura 4**)³.

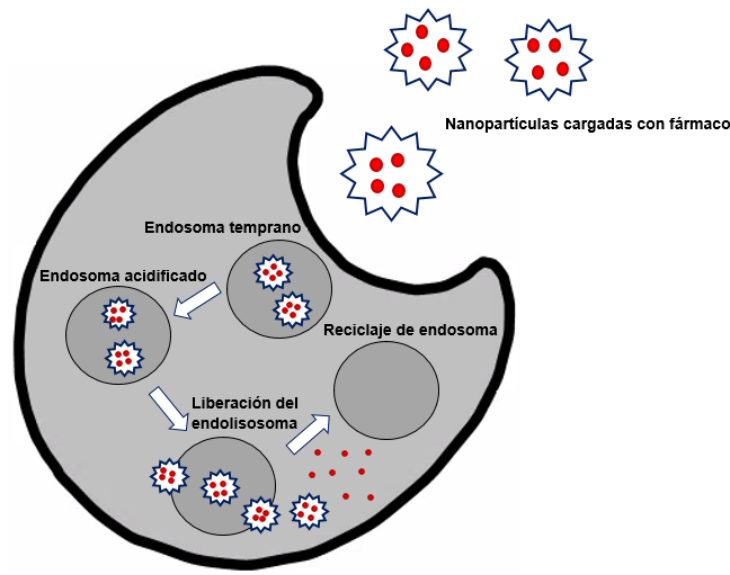


Figura 4. Representación del proceso de internalización de nanopartículas de PLGA en las células.

Imagen modificada de: Danhier, F. *et al.* PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **161**, 506 (2012)³.

Con el fin de mejorar propiedades de formulación de las nanopartículas de PLGA, tales como estabilidad del fármaco, degradación, perfiles de liberación y la acción sitio dirigida del fármaco, también se pueden realizar modificaciones estructurales. Por ejemplo, el copolímero PLGA se ha modificado con diferentes restos hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG) o el poli óxido de etileno (PEO) para mejorar la solubilidad acuosa.

Una aplicación importante de las modificaciones superficiales de nanopartículas es la focalización en tumores u órganos para aumentar la unión celular selectiva y la internalización a través de endocitosis mediada por receptor. Los ligandos dirigidos deben estar óptimamente conjugados en las nanopartículas para mantener su afinidad por la unión a receptores. El copolímero PLGA también tiene la capacidad de unir diferentes grupos de direccionamiento, un ejemplo de esto es, la unión de un péptido de unión a integrina como agente de contraste para el diagnóstico de cáncer³. Las cargas superficiales de las nanopartículas también tienen una influencia importante en su interacción con las células y en su internalización¹.

Las nanopartículas cargadas positivamente permiten un mayor grado de internalización, como resultado de las interacciones iónicas establecidas entre la carga positiva de las partículas y la negativa de las membranas celulares; así, el copolímero PLGA se puede unir con grupos que contienen cargas positivas para mejorar la adhesión celular y la captación. Además, las nanopartículas con carga positiva son capaces de escapar de los lisosomas después de ser internalizadas y exhiben localización perinuclear, mientras que las nanopartículas con carga negativa y neutral tienden a colocarse en los lisosomas. Las nanopartículas de PLGA con cargas negativas pueden cambiarse a cargas neutras o positivas por modificaciones superficiales, por ejemplo, por PEGilación del polímero de PLGA o revestimiento de quitosano, respectivamente ¹.

Debido al carácter hidrófobo de las nanopartículas, son reconocidas por el cuerpo como extrañas; siendo el sistema reticuloendotelial (RES), quien las elimina del torrente sanguíneo y las recoge en el hígado o el bazo. Este proceso es una de las barreras biológicas más importantes para la liberación controlada de fármacos a partir de nanopartículas. La unión de las proteínas opsoninas presentes en el suero sanguíneo a las nanopartículas inyectadas conduce a su internalización por fagocitosis. Siendo así, el destino final de tales nanopartículas, su eliminación del cuerpo a través del sistema renal. Para abordar estas limitaciones, se han desarrollado varios métodos de modificaciones superficiales para producir nanopartículas que no sean reconocidas por RES; un ejemplo de esto es que las nanopartículas pueden recubrirse con moléculas que oculten la hidrofobicidad como el PEG, al proporcionar una capa hidrofílica en la superficie ³.

Así, una de las varias ventajas de la modificación superficial de las nanopartículas, es que podrían escapar del sistema fagocítico mononuclear (MPS), evitando así la fagocitosis. Por ejemplo, CD47 es una proteína asociada a integrina, conocida como una molécula universal "marcadora de sí misma", implicada en la inhibición de la fagocitosis, procesos antiinflamatorios, apoptosis, proliferación, adhesión y migración. Esta proteína transmembrana se une a la proteína alfa reguladora de la señal expresada por los macrófagos y las células mieloides, activando un signo conocido como "no me comas" y suprimiendo así, los procesos fagocíticos ³.

Por tanto, la modificación superficial de las nanopartículas de PLGA con el marcador CD47, se considera una "estructura artificial invisible o inerte", que representa una de las estrategias más prometedoras para escapar de la absorción de fagocitos y, en consecuencia, de una eliminación temprana de las nanopartículas de PLGA. Un ejemplo de esto es un estudio en el que se desarrollaron dos tipos de nanopartículas de PLGA, unas recubiertas con membranas lipídicas y proteicas, aisladas de glóbulos rojos (RBC) como un sistema de liberación biomimético camuflado y otras recubiertas con PEG. El tiempo medio de eliminación para ambos tipos de nanopartículas, se calculó con base en un modelo de dos compartimientos después de su administración *in vivo*. De acuerdo con los resultados obtenidos, la vida media de eliminación de las NP-RBC (39.6 h) fue considerablemente mayor que la de las nanopartículas recubiertas con PEG (15.8 h), lo que sugiere un nuevo método para superar el tiempo de vida bajo en circulación de las nanopartículas de PLGA debido a la ausencia de aclaramiento fagocítico por la presencia de CD47 en los glóbulos rojos ¹³.

3. Métodos de obtención de nanopartículas de PLGA.

Diversos métodos de obtención de nanopartículas de PLGA han sido desarrollados en los últimos años. Cada técnica tiene sus pros y contras, sin embargo, la regla fundamental para seleccionar el método de fabricación depende de las propiedades fisicoquímicas deseadas y las posibles interacciones entre los fármacos con el polímero, los solventes orgánicos y los surfactantes, además, del uso final del sistema nano establecido. Dependiendo del proceso de preparación, la organización estructural de la nanopartícula puede variar ¹.

De modo que, para preparar nanopartículas con propiedades controladas, como el tamaño o la velocidad de degradación, es importante elegir no solo el método correcto, sino también los materiales y parámetros de síntesis correctos. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede verse afectado por la cantidad de tensoactivo, la concentración del polímero, el tipo de compuesto encapsulado y la energía aplicada para su formación (p. ej. sonicación, homogeneización o agitación por cizallamiento). En la **Figura 5**, se muestra un esquema de los aspectos que se deben tomar en cuenta para la elección del método de preparación ¹⁵.

Las nanopartículas biodegradables de PLGA en general son preparadas dispersando el polímero, su formación se lleva a cabo en el paso inicial en donde se prepara un sistema de emulsión, siendo este paso común para todas las técnicas. A continuación, se describen a detalle los métodos de obtención de nanopartículas de PLGA ¹.

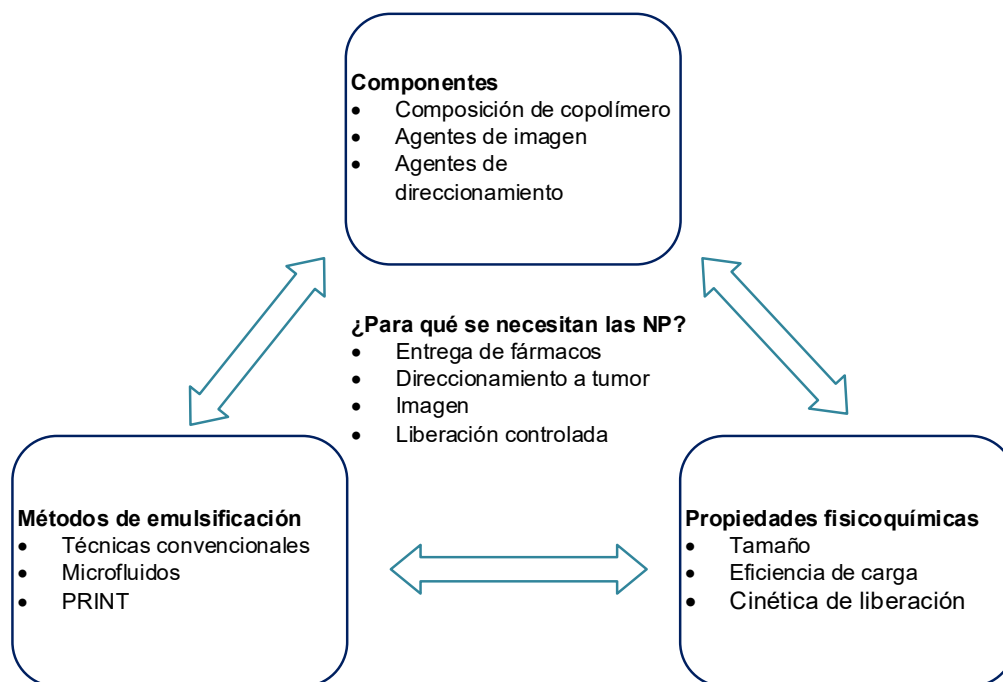


Figura 5. Aspectos por considerar para el diseño de NP.

La fabricación de NP debe planificarse teniendo en cuenta la aplicación final que se les desea dar. Se pueden seleccionar y optimizar varias técnicas, con muchos parámetros variables, para un producto final apropiado.

Imagen modificada de: Swider, E. *et al.* Acta Biomaterialia Customizing poly (lactic- co - glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomater.* **73**, 38–51 (2018)¹⁵.

3.1 Formación de nanopartículas en un solo paso: nanoprecipitación (desplazamiento de solvente).

La nanoprecipitación es uno de los métodos de fabricación de nanopartículas más utilizado, es un proceso de un solo paso, generalmente empleado para fármacos hidrofóbicos, más del 50% de las nanopartículas reportadas han sido obtenidas por este método⁴. La fase orgánica se forma disolviendo el polímero y el fármaco en un disolvente polar (p. ej. acetona, etanol, metanol o acetonitrilo); posteriormente es agregada gota a gota mediante un auto-inyector y con agitación constante, a una solución acuosa que contiene un emulsionante o un surfactante². Las nanopartículas se forman instantáneamente a medida que el polímero se difunde en la fase acuosa (**Figura 6E**). La miscibilidad del solvente con agua es el parámetro más crítico que rige el resultado del proceso. La velocidad de adición del polímero y la velocidad de agitación también influyen en el tamaño y el nivel de carga del fármaco⁴.

El tamaño de partícula obtenido por este método es por debajo de 100 nm, generalmente más pequeño que el producido por otros métodos y se ve afectado por la concentración de polímero, donde una concentración más baja de polímero produce partículas más pequeñas. Esta forma de obtención se puede aplicar a una amplia gama de polímeros, péptidos y ciclodextrinas anfifílicas, sin embargo, su escalamiento podría ser ineficiente debido a la adición gota a gota de la solución orgánica ⁴.

3.2 Métodos convencionales basados en emulsificación.

3.2.1 Método emulsificación- evaporación de solvente: emulsión única.

Este es el método más utilizado para preparar nanopartículas de PLGA. Se utiliza generalmente una emulsión O/W (*Oil in Water*) cuando el fármaco es hidrofóbico o poco soluble en agua. Para preparar la fase orgánica, una cantidad apropiada del polímero es inicialmente disuelta en un solvente orgánico volátil no polar como podrían ser diclorometano, cloroformo o acetato de etilo. Posteriormente, el fármaco se agrega a esta solución mediante sonicación u homogenización, lo que resulta en una dispersión. La dispersión que contiene el polímero y el fármaco se agregan a una solución acuosa con surfactantes como alcohol polivinílico, polisorbato 80, poloxamero 188 o vitamina E TPGS (succinato de d- α -tocoferol polietilenglicol), aplicando agitación constante para generar una emulsión estable.² El uso de un tensoactivo minimiza el efecto de coalescencia de los glóbulos de la emulsión y genera nanopartículas más pequeñas (**Figura 6A**). La formación de nanopartículas se logra mediante la evaporación del solvente a presión reducida. Sin embargo, este es un proceso lento en comparación con la nanoprecipitación que ocurre en milisegundos. Por ejemplo, se requieren 80 minutos para evaporar 10 mL de acetato de etilo de una emulsión de 50 mL. Durante los primeros 40 minutos, el 90% del disolvente es eliminado, pero se requieren otros 40 minutos para eliminarlo completamente. El tamaño de las nanopartículas cae al mínimo durante los primeros 40 minutos, y aumenta en la segunda mitad debido a la fusión de las gotas de la emulsión. Por tanto, la fusión determina el tamaño final de las nanopartículas, mismo que depende en gran medida de las condiciones de evaporación; resaltando así, la importancia de optimizar las condiciones de procesamiento⁴.

Ajustar condiciones de evaporación del solvente, como la temperatura y la presión, ayudaría a mejorar la calidad del sistema de liberación de fármaco⁴.

Debido a que el método emulsión- evaporación de solvente se utiliza ampliamente para fármacos lipofílicos. El nivel de carga de fármacos hidrofílicos, como las proteínas y los péptidos es generalmente bajo, debido a la difusión del fármaco hidrofílico a la fase acuosa antes de que el polímero pueda solidificarse para atraparlo. Para superar este problema, una doble emulsión W/O/W (*Water/Oil/Water*) se puede utilizar para reducir la pérdida y también para preservar la bioactividad de fármacos delicados como las proteínas en la fase acuosa⁴.

3.2.2 Método emulsificación- evaporación de solvente: emulsión doble.

También conocido como método W/O/W (*Water/Oil/Water*), es una técnica empleada para el encapsulamiento de fármacos hidrofílicos. La eficiencia de encapsulación y el tamaño de partícula se ven afectados principalmente por el tipo de solvente y la velocidad de agitación. La emulsión primaria se forma por el tratamiento con ultrasonido de la mezcla de una fase acuosa (preparada en agua desionizada) que contiene una cantidad apropiada del fármaco y una fase orgánica que contiene el polímero disuelto en solventes orgánicos volátiles, como acetato de etilo, cloroformo o diclorometano, y un tensioactivo orgánico que sirve como estabilizador de la emulsión W/O (*Water/Oil*) formada.² La segunda emulsión se forma sonicando una mezcla de la fase orgánica, que contiene la emulsión primaria W/O dispersa, y una fase acuosa que contiene un estabilizador hidrófilo, y posteriormente permitiendo que se evapore el solvente orgánico para lograr la formación de las nanopartículas (**Figura 6B**). La duración de la sonicación y la concentración de tensioactivo para el segundo paso son más críticas para determinar el tamaño de partícula final, en comparación con las del primer paso. Un tiempo de sonicación largo reduce significativamente el tamaño de las partículas y produce una polidispersidad menor, sin embargo, esto tiene que equilibrarse con el riesgo de dañar el fármaco⁴.

3.2.3 Método de emulsificación-difusión de solvente.

Se trata de otro método que permite la encapsulación de fármacos hidrofóbicos ampliamente utilizado para preparar nanopartículas. En este método, el polímero se disuelve en un solvente parcialmente miscible en agua (como alcohol bencílico o carbonato de propileno) previamente saturado con agua a temperatura ambiente, alcanzando un equilibrio termodinámico inicial⁴. Posteriormente, se utiliza un método de emulsificación convencional para producir una emulsión O/W (*Oil/Water*) formada por una fase orgánica que contiene el polímero y el fármaco, y por una solución acuosa con un surfactante (p. ej. polisorbato-80, poloxamero-188). Para lograr una reacción de transformación de fase y difusión hacia afuera del solvente desde la fase interna, se agrega agua que contiene el estabilizador mientras se agita regularmente (**Figura 6D**). Las nanopartículas coloidales se forman como resultado de la nanoprecipitación. La difusión del solvente orgánico fuera de los glóbulos conduce a la condensación de los materiales dentro del glóbulo y a la formación de nanopartículas². La evaporación del solvente se facilita mediante evaporación o destilación al vacío. El proceso de extracción de solvente se lleva a cabo en milisegundos, causando una caída en el tamaño de partícula. En general, el diámetro de las partículas preparadas por este método es de alrededor de 150 nm. Debido a la rápida cinética de extracción del solvente y la interacción bien definida entre solvente y agua, las propiedades físicas de las nanopartículas preparadas con este método son altamente reproducibles y la polidispersidad es significativamente menor que las nanopartículas preparadas por otros métodos convencionales⁴. Este método ofrece varias ventajas, entre ellas, una mayor eficiencia de encapsulación, alta reproducibilidad lote a lote, facilidad de escalamiento, distribución de tamaño estrecho y simplicidad².

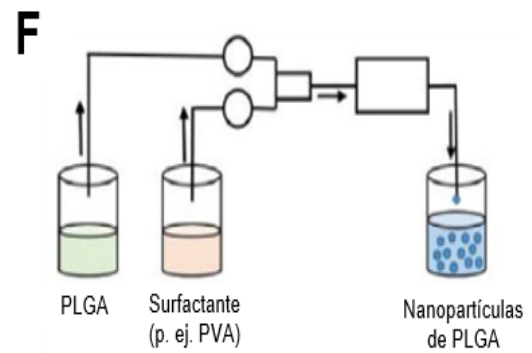
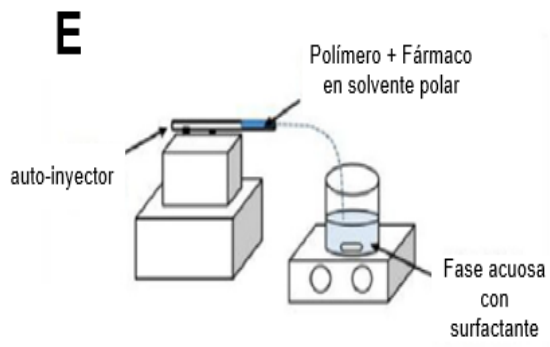
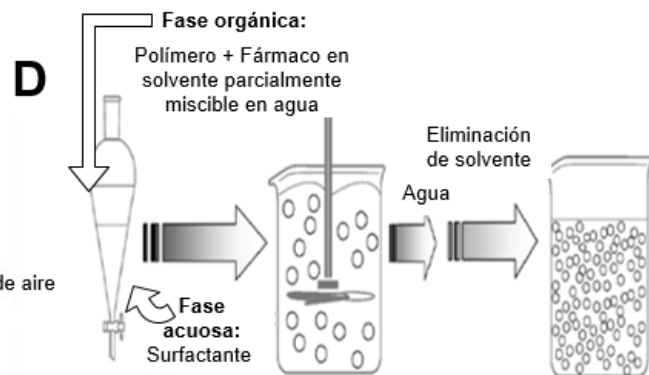
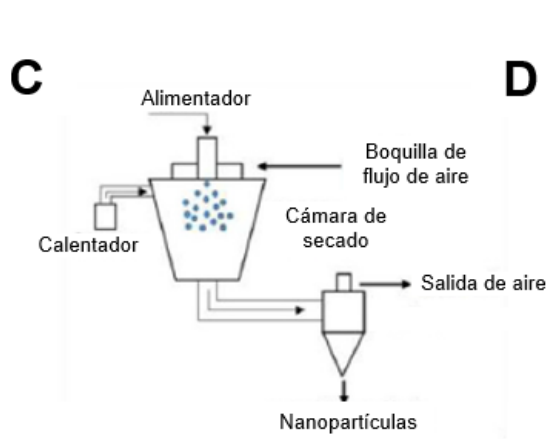
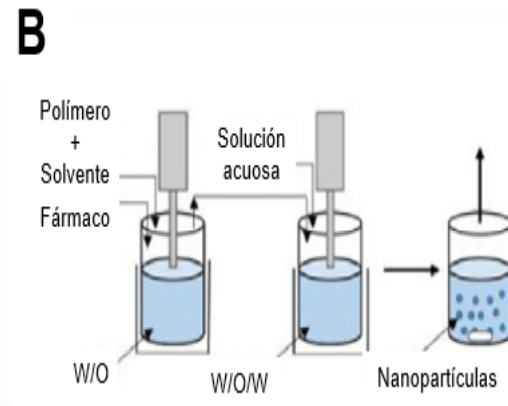
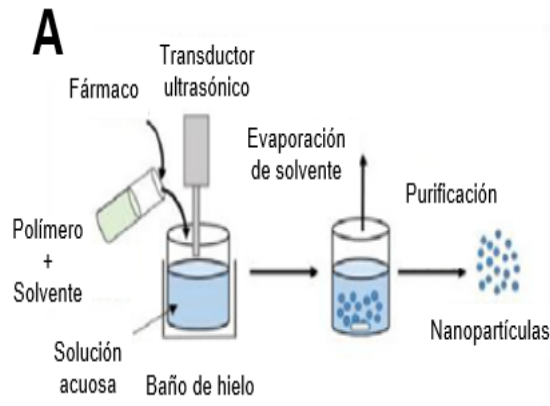
3.2.4 Método *salting-out*: emulsificación inversa.

Se trata de un derivado del método de emulsificación-difusión de solvente. Se utiliza un solvente orgánico totalmente miscible en agua, como la acetona. El solvente que contiene el polímero y el fármaco se emulsiona en una fase acuosa que contiene una alta concentración de sal (cloruro de magnesio, cloruro de calcio) o sacarosa y un estabilizador coloidal (p. ej. polivinilpirrolidona) con agitación por fuerza magnética (**Figura 6G**)⁴.

La solución acuosa saturada evita que la acetona se mezcle con el agua. La dilución de los glóbulos de la emulsión en una gran cantidad de agua resulta en una caída abrupta de la concentración de sal de la fase continua, lo que conduce a la extracción del solvente orgánico y a la precipitación de las nanopartículas. El solvente residual y los agentes de precipitación (*salting-out*) se eliminan por filtración. Este método es utilizado para fármacos lipofílicos y ofrece la ventaja de encapsular agentes sensibles al calor como proteínas, ADN y ARN². La elección del agente de precipitación impacta en gran medida el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación del fármaco, mientras que la agitación y la concentración del estabilizador tienen un efecto menos significativo⁴.

3.3 Secado por aspersión.

Se trata de una alternativa a los métodos de preparación convencionales de nanopartículas poliméricas. Esta técnica ofrece ventajas como rapidez e implementación de menos parámetros de procesamiento, pudiendo encapsular en las NP fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, péptidos y proteínas. Para la obtención de las NP, se asperja una dispersión de sólido en aceite (S/O) o una emulsión W/O (*Water in Oil*) en una corriente de aire caliente (**Figura 6C**) La selección entre el método S/O ó W/O depende de las propiedades de los agentes encapsulados, particularmente su hidrofilia o hidrofobicidad.² Sin embargo, el principal inconveniente de este método, es una pérdida significativa de producto causada por la aglomeración de partículas o su adhesión a las paredes del aparato de secado por aspersión¹⁵.



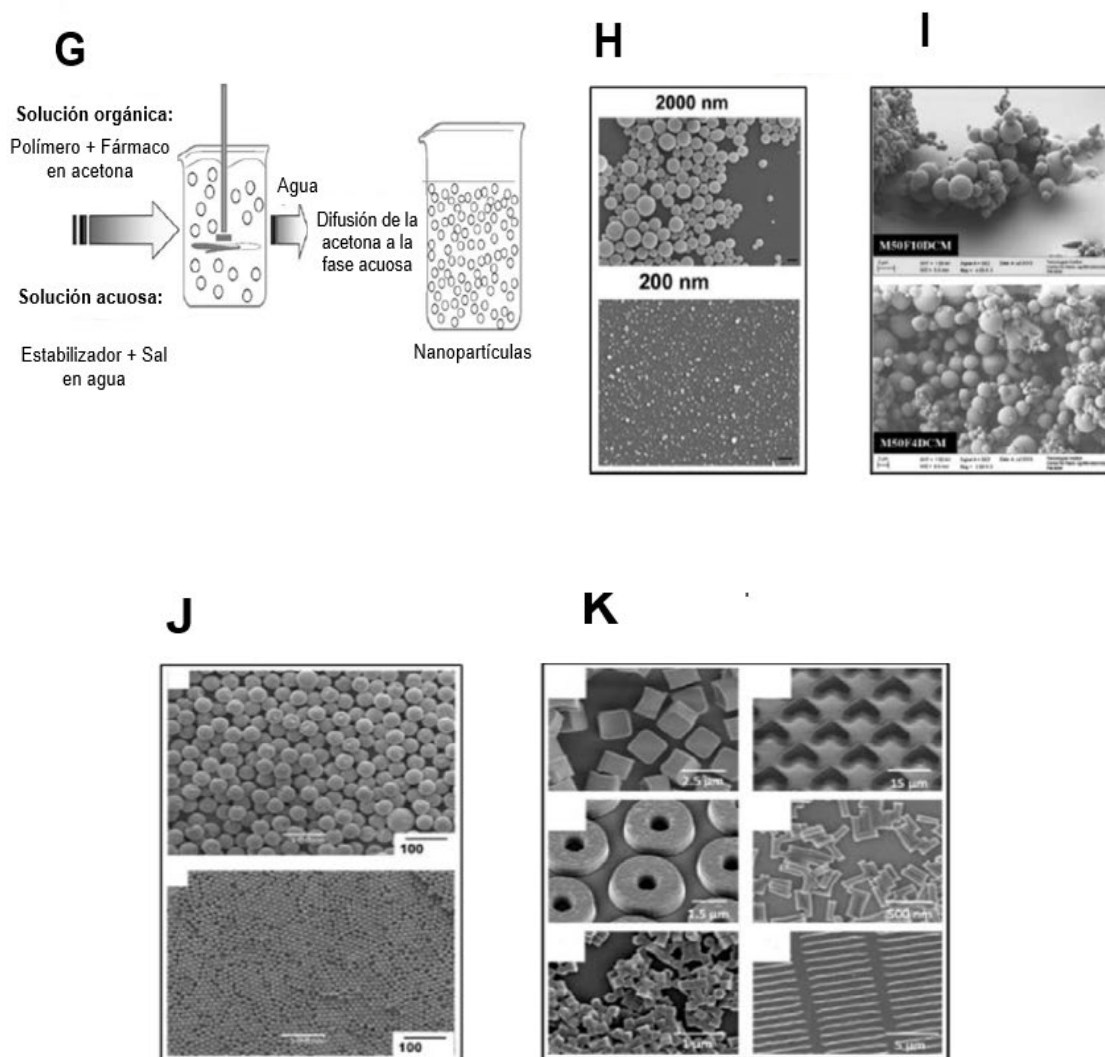


Figura 6. Representación gráfica de diferentes técnicas de preparación de NP de PLGA. Las NP de PLGA se pueden formular utilizando varios métodos: (A) Método emulsificación-evaporación de solvente: emulsión única, (B) Método emulsificación-evaporación de solvente: emulsión doble, (C) Secado por aspersión, (D) Método de emulsificación-difusión de solvente, (E) Nanoprecipitación, (F) Microfluídica, (G) Método salting-out: emulsificación inversa. Donde: w - agua, w / o - agua en aceite, w / o / w - agua en aceite en agua, alcohol polivinílico PVA. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido representan partículas preparadas usando: (H) Emulsificación-evaporación de solvente escala 1 μm, (I) Secado por aspersión, (J) Microfluídica y (K) Técnica PRINT: partículas de diferentes formas.

Imagen modificada de: Swider, E. *et al.* Acta Biomaterialia Customizing poly (lactic- co - glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomater.* **73**, 38–51 (2018) ¹⁵.

3.4 Nuevos métodos de diseño para NP de PLGA.

Los métodos convencionales de síntesis de NP con frecuencia dan como resultado partículas con una distribución de tamaño amplia, lo que genera problemas con el control sobre la reproducibilidad, biodistribución, carga de fármacos y eficiencia de encapsulación. Otros problemas que enfrentan las técnicas de fabricación actuales de NP de PLGA, incluyen una capacidad deficiente para adaptar la cinética de liberación y para administrar conjuntamente medicamentos duales con diferentes propiedades de solubilidad. Los desarrollos recientes en los métodos de formulación que abordan estos temas se describen en las siguientes secciones¹⁵.

3.4.1 Técnica PRINT.

Replicación de partículas en plantillas no humectadas (PRINT), se trata de una técnica para la síntesis de NP utilizando un molde hecho de un fluoropolímero. El uso de diferentes plantillas para la producción de estos moldes da como resultado cavidades con diferentes formas, por ejemplo, partículas cúbicas. Estas cavidades se llenan con solución de PLGA. Después de la solidificación, las NP se pueden retirar con una película de recolección. Esta técnica permite la producción de partículas en un intervalo de tamaño de 10 nm a 200 μ m. PRINT permite la síntesis de partículas con un tamaño y forma específicos (**Figura 6K**), ya que se ha demostrado que la forma puede tener un efecto importante en las respuestas biológicas a las NP. Además, estas NP pueden cargarse con fluoróforos, agentes de contraste para imagen por resonancia magnética y fármacos tanto hidrófilos como hidrófobos. Junto con las plataformas microfluídicas, PRINT tiene una ventaja importante sobre otros métodos, ya que las partículas resultantes son homogéneas con un índice de polidispersidad bajo. Lo que es altamente beneficioso para aplicaciones como la liberación de fármacos, ya que las partículas monodispersas proporcionan una distribución más equitativa y predecible de los fármacos¹⁵.

3.4.2 Plataformas microfluídicas.

Las técnicas de fabricación de nanopartículas convencionales son propensas a polidispersidad y variaciones lote a lote. Por ejemplo, el tamaño final de las nanopartículas generadas por las técnicas basadas en emulsión está directamente determinado por el tamaño de los glóbulos de la emulsión, siendo muy heterogéneo en la mezcla a granel. Si bien la heterogeneidad sigue siendo un obstáculo importante en la preparación a granel de sistemas de liberación de fármacos, los microfluidos (manipulación de fluidos en escala micro y nano), presentan oportunidades interesantes para mejorar la fabricación de los sistemas de liberación de fármacos. Los beneficios generales de llevar a cabo las reacciones en microfluidos incluyen entre otros, la mezcla rápida de reactivos, un entorno de reacción homogéneo, flexibilidad para el diseño de reacciones en varios pasos, precisión y eficiencia de procesamiento mejoradas, mejor transferencia de calor debido a la alta relación superficie-volumen, miniaturización y menor costo por el consumo reducido de reactivos. En particular, las características de una mezcla rápida, flexibilidad para reacciones de varios pasos y el procesamiento eficiente, contribuyen al mejoramiento de la fabricación de sistemas de liberación de fármacos en tres aspectos: primero, la microfluídica es una plataforma versátil que puede usarse para sintetizar varios tipos de portadores de fármacos; en segundo lugar, la síntesis por microfluídica exhibe una mejor capacidad de control sobre las propiedades físicas de las nanopartículas. Tercero, los procesos microfluídicos son susceptibles a escalamiento y control de calidad en línea, factores importantes para su comercialización ⁴.

Un dispositivo microfluídico clásico incluye una red de microcanales que se moldean en un material que forma un chip microfluídico, entradas para inyectar fluidos, microbombas y microválvulas para manipular fluidos dentro del chip, salidas para eliminar fluidos y un sistema de detección para análisis ¹⁵.

Los chips microfluídicos pueden construirse utilizando materiales, como vidrio, silicona o polímeros (p. ej. polidimetilsiloxano (PDMS)), y moldearse en diferentes geometrías para controlar la formación de gotas. También se tienen reportados dispositivos microfluídicos de silicio, perfluoropoliéter, metacrilato de polimetilo (PMMA), poliuretano, policarbonato y acero inoxidable ¹⁵.

La microfluídica tiene diferentes aplicaciones, una de ellas es el desarrollo de emulsiones a través de sistemas microfluídicos basados en gotas, los cuales proporcionan una nueva ruta para producir emulsiones de gotas monodispersas y uniformes de forma controlada, con el uso de diversos materiales y reactivos (**Figura 6F, L**). Por ejemplo, los dispositivos capilares de vidrio consisten en un conjunto de capilares de vidrio que son químicamente resistentes y su geometría permite la síntesis controlada de múltiples emulsiones. Una desventaja importante de este tipo de dispositivos es la producción de mayor escala, ya que es difícil construir de forma reproducible más de un dispositivo a la vez y tener muchos dispositivos idénticos. Una solución a este problema podría ser el uso del dispositivo microfluídico PDMS. Aquí, se construye un chip de PDMS unido a un portaobjetos de vidrio delgado, que también puede permitir la visualización de la muestra y el monitoreo de la concentración de un fármaco al mismo tiempo. Estos dispositivos se pueden replicar y producir en grandes cantidades, lo que los hace adecuados para la síntesis a gran escala. Sin embargo, el PDMS es considerablemente reactivo, puede incendiarse con algunos solventes y puede absorber moléculas pequeñas, como biomoléculas o fármacos ¹⁵.

La formulación de gotas puede controlarse mediante técnicas pasivas o activas. En ambas técnicas, el diámetro de la gota se puede controlar mediante el caudal de las fases continua y dispersa, la relación entre estas fases líquidas y las geometrías del sistema. En la técnica pasiva, la mezcla de las fases orgánica y acuosa se ve afectada solo por el caudal y la geometría del chip microfluídico y, por lo tanto, no hay una entrada adicional de energía "activa". En la producción activa de gotas, el diámetro de las gotas puede ajustarse aún más mediante la entrada de energía adicional en la parte de mezclado del dispositivo, por ejemplo, moviendo estructuras de pared, integrando microcalentadores y microválvulas accionadas magnética o neumáticamente ¹⁵.

Las geometrías más comunes utilizadas para la formación de gotas son la unión en forma de T, un sistema de enfoque de flujo (FF) y corrientes que fluyen conjuntamente (**Figura 7**). La geometría de unión en T es la más simple para producir y manipular gotas. Este tipo de geometría combina un canal horizontal y uno perpendicular, que se asemejan a las dos ramas de una "T"¹⁵.

Durante la generación de gotas en una unión en T, la fase continua fluye a través del canal horizontal, mientras que la fase dispersa llega a través de un canal perpendicular a ella. En la geometría FF, la fase dispersa fluye dentro del capilar cuadrado y la fase continua fluye desde los dos canales laterales. La fase dispersa es enfocada por la fase continua a través de la abertura estrecha del capilar redondo cónico, lo que lleva a la formación de emulsiones en el capilar de recolección. A pesar de la diversidad de las estructuras en la configuración FF, los mecanismos de formación de gotas son similares a la configuración de la unión T. La configuración de la geometría FF utiliza una fuerza de corte simétrica por la fase continua, lo que resulta en una formación de gotas más estable y controlable. Por lo tanto, el sistema FF se puede utilizar para la producción de gotas más pequeñas, incluso si la apertura del canal tiene un tamaño mayor. En el sistema de flujo conjunto, la fase dispersa fluye dentro del capilar redondo, mientras que la fase continua fluye entre los capilares cuadrados y redondos. Aquí, ambas fases fluyen en la misma dirección. Estos sistemas se utilizan para formar emulsiones individuales. Para producir emulsiones dobles, se puede utilizar una combinación de geometrías FF y flujo conjunto ¹⁵.

3.4.2.1 Microfluídica, un control preciso sobre la síntesis de nanopartículas.

Además de su naturaleza versátil, las plataformas de microfluidos ofrecen otra ventaja sobre los métodos de procesamiento existentes, al exhibir un alto grado de control en la preparación de los sistemas de liberación de fármacos en cinco aspectos: tamaño de partícula, forma, espesor de la cubierta, eficiencia de carga del fármaco y velocidad de liberación ⁴.

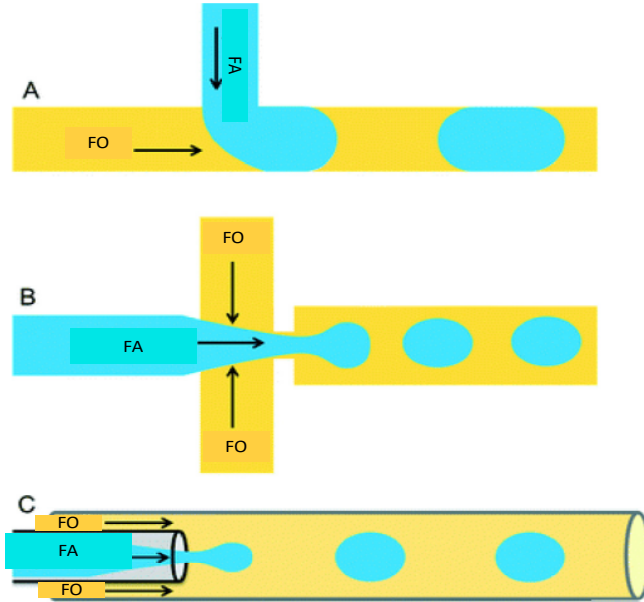


Figura 7. Vista esquemática de geometrías microfluídicas basadas en gotas.

(A) Geometría de unión en T, el flujo de la fase acuosa es interrumpido por el aceite generando las gotas. (B) Sistema de enfoque de flujo (FF), las gotas se producen cortando la corriente acuosa desde dos direcciones. (C) Geometría de flujo conjunto, aquí la fase acuosa se hace pasar a través de un capilar, que se coloca coaxialmente dentro de un capilar más grande, a través del cual se bombea un aceite inmiscible. FA: Fase Acuosa y FO: Fase Orgánica.

Imagen modificada de: Swider, E. *et al.* Acta Biomaterialia Customizing poly (lactic- co - glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomater.* **73**, 38–51 (2018) ¹⁵.

3.4.2.2 Control del tamaño de partícula.

El beneficio más importante de utilizar microfluídica para fabricar sistemas de liberación de fármacos particulados, es la capacidad de controlar con precisión el tamaño de partícula. Las nanopartículas generadas a partir de plataformas microfluídicas, suelen tener una distribución de tamaño más estrecha que las generadas por métodos convencionales. Una plataforma de microfluidos puede facilitar la fabricación de partículas monodispersas, usando una unión en T o un dispositivo FF, la ruptura de la fase dispersa por la fase continua es periódica y predecible, por lo que se tiene una formación de gotas discreta y de tamaño consistente en la unión. El tamaño de las gotas se puede controlar convenientemente modificando la velocidad de flujo de las fases continua y dispersa. Estas gotas posteriormente se solidifican para dar como resultado las nanopartículas ⁴.

Por otro lado, la eficiencia del mezclado por difusión depende de la longitud. En reactores con una escala de longitud característica superior a 1 mm, la mezcla por difusión es ineficiente, mientras que el tiempo de mezcla decrece significativamente a medida que la distancia de difusión disminuye por debajo de 100 μm . Los canales de microfluidos, diseñados con un ancho de 100 μm o menos, representan un reactor eficiente y de fácil acceso para la mezcla de fluidos, dando como resultado nanopartículas con polidispersidad muy reducida ⁴.

3.4.2.3 Control de la forma de las partículas.

Además del tamaño de partícula, el efecto de la forma de las partículas recientemente ha llamado la atención, debido a su influencia en la biodistribución tisular y la captación endocítica. La nanolitografía* se puede utilizar para fabricar partículas no esféricas, sin embargo, el rendimiento está limitado por el tamaño del molde. Utilizando un enfoque combinado de nanolitografía de proyección microscópica y microfluídica, el proceso de fabricación de objetos no esféricos puede llevarse a cabo de manera eficiente. En este enfoque, se inserta una fotomáscara con las características deseadas en el microscopio, para generar una proyección de luz UV en el flujo del monómero que fluye sobre un dispositivo microfluídico de PDMS. Las partículas con la forma deseada se polimerizan y se advectan** a lo largo de la corriente de monómero no polimerizado, dando lugar a la posterior polimerización; de esta manera se pueden generar en grandes cantidades y de manera eficiente partículas con diversas formas para optimizar su rendimiento biológico ⁴.

-Litografía: transferencia de una imagen de una plantilla a un sustrato.⁵⁸

*Nanolitografía: técnica que permite el desarrollo de estructuras o patrones de tamaño nanométrico en una superficie o sustrato específico.⁵⁹

**Advectar: acción y efecto de llevar o arrastrar algo.⁶⁰

3.4.2.4 Control del espesor de la cubierta de las nanopartículas.

La cubierta representa una barrera de difusión para controlar la liberación sostenida del fármaco. El perfil de liberación del fármaco, asociado con nanopartículas de diferente grosor de cubierta, no sería homogéneo, aspecto que sería indeseable si no se controla. El grosor de la cubierta se puede controlar fácilmente modificando la velocidad de flujo utilizada en el proceso de encapsulación. El control preciso del grosor de la cubierta de las nanopartículas que ofrece la microfluídica, permite ajustar el perfil de liberación del fármaco para diferentes aplicaciones de liberación controlada ⁴.

3.4.2.5 Control de la eficiencia de carga de fármaco en las nanopartículas.

La microfluídica puede generar nanopartículas con una eficiencia de encapsulación de fármaco mayor, en comparación con los métodos de obtención convencionales. Esto podría explicarse por el efecto de diferentes velocidades de mezcla; cuando la velocidad de mezcla es lenta, el tiempo de ensamblaje de nanopartículas es menor que el tiempo de difusión del solvente. Por lo tanto, en la mezcla a gran escala, las nanopartículas comienzan a ensamblarse cuando la concentración de solvente aún es alta, dando como resultado, que el fármaco escape del proceso de encapsulación. Por otro lado, haciendo uso de la microfluídica, los tiempos de los dos procesos son comparables y, por tanto, se puede encapsular más fármaco dentro del portador. Esta ventaja sería de particular importancia cuando se trata de fármacos de costo elevado ⁴.

3.4.2.6 Control de la tasa de liberación del fármaco.

Se tienen reportados en la literatura, casos de nanopartículas autoensambladas con ayuda de microfluidos, con una explosión inicial de liberación de fármaco más lenta y pequeña, en comparación con nanopartículas fabricadas por métodos convencionales. Este efecto es atribuido a una distribución más uniforme del fármaco dentro de las partículas producidas por microfluidos, debido a la rápida mezcla que se tiene. De esta manera, la liberación del fármaco es más constante por la degradación uniforme de las partículas; justificando así, la ventaja del uso de la microfluídica sobre los métodos convencionales en el control de la tasa de liberación de los fármacos ⁴.

Algunos ejemplos de nanoestructuras de PLGA con sus métodos de obtención se resumen en la Tabla 2.2

Tabla 2. Ejemplos de nanopartículas de PLGA y sus métodos de obtención.

Método	Rango de diámetro	Método de mezcla	Solvente	Tensoactivo	Ventajas	Desventajas
Emulsificación- evaporación de solvente: emulsión doble	100-10000 nm	Sonicación	DCM Cloroformo Acetato de etilo	PVA Pluronic® F-68 Colato de sodio	Adecuado para compuestos hidrofílicos Solventes no tóxicos	Esfuerzo cortante Tamaño afectado por carga de fármaco
Emulsificación- evaporación de solvente: emulsión única	50-700 nm	Sonicación Homogeneización	DCM Cloroformo Acetato de etilo	PVA Tween-80 Pluronic® F-68	Adecuado para compuestos lipofílicos	Tamaño afectado por carga de fármaco Tamaño afectado por concentración de polímero
Nanoprecipitación	80-700 nm	N/A	Acetonitrilo Acetona Etanol	PVA Poloxámero Poloxaminas	Bajo consumo de energía Sin altas fuerzas de corte	Tamaño afectado por concentración de polímero
Secado por aspersión	< 10000 nm	N/A	Acetona Cloroformo Metanol Acetato de etilo	Tween-80 Pluronic® F-68 Pluronic® F-127 Poloxámero	Alta eficiencia de atrapamiento Proceso rápido	Adhesión de las nanopartículas a las paredes del aparato de secado
<i>Salting-out</i> : emulsificación inversa	100-500 nm	Homogeneización	Acetona THF DMSO	PVA Polivinilpirrolidona	Minimiza el estrés de carga proteica Adecuado para sustancias sensibles al calor	Baja eficiencia de encapsulación Bajo rendimiento Alta polidispersidad
Microfluídica	200-1000 nm	N/A	DMC DMSO DCM	PVA Tween-20/80	Nanopartículas monodispersas	Mezcla de difusión lenta
Emulsión por extrusión de membrana	200 nm - 60 µm	Sonicación Homogeneización	DCM Acetato de etilo	PVA Tween-20/80 Poloxámero Pluronic® F-68	Tamaño de gotas controlado Distribución de tamaño estrecho Menos energía utilizada	Bajo flujo de fase dispersa
Técnica PRINT	10 nm - 200 µm	N/A	Etanol	Tween-20 PVA	Control sobre forma, tamaño y superficie Encapsulación de varias cargas Alta carga de fármaco	Múltiples pasos

Tabla modificada de: Swider, E. *et al.* Acta Biomaterialia Customizing poly (lactic- co -glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomater.* **73**, 38–51 (2018) ¹⁵.

4. Caracterización de nanopartículas de PLGA.

La caracterización de NP es un procedimiento analítico necesario para una comprensión profunda de sus propiedades, antes de desarrollarlas aún más para su aplicación farmacéutica. Por tal motivo, la nanotecnología ha impulsado la investigación en la innovación y el desarrollo de técnicas sofisticadas de caracterización de NP, para permitir un mejor control de sus propiedades fisicoquímicas ¹⁶.

El tamaño de las nanopartículas es significativo, no solo para determinar el perfil de liberación, sino también para determinar la eficacia del agente terapéutico en términos de penetración en el tejido y captación celular. Así, el tamaño de partícula, distribución de tamaño y morfología, pueden ser determinados mediante espectroscopia de correlación de fotones, microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión ⁵.

El peso molecular del polímero influye en el tamaño de las NP, la eficiencia de encapsulación y la velocidad de degradación del polímero. El peso molecular es indicativo de la longitud de la cadena del polímero, cuanto mayor es el peso molecular, mayor es la longitud de la cadena. Adicionalmente, la longitud de la cadena refleja la hidrofilia o lipofilia del polímero. Un aumento en la longitud de la cadena aumenta la lipofilia y reduce la velocidad de degradación del polímero. En consecuencia, variando el peso molecular, se puede controlar la velocidad de degradación del polímero y la cinética de liberación del fármaco. El peso molecular puede ser determinado mediante cromatografía de exclusión por tamaño ⁵.

El potencial zeta (determinado por un Zetasizer, medidor de tamaño de partículas) influye en la mucoadhesión, así como en el tráfico intracelular de partículas en función del pH. Los valores de potencial zeta pueden ser positivos o negativos, dependiendo de la naturaleza del polímero o del material utilizado para la modificación superficial, su determinación es un método ampliamente utilizado para identificar las cargas superficiales de las NP ⁵.

La hidrofobicidad determina la distribución de las NP en el cuerpo después de la administración, de modo que las partículas hidrofílicas tienden a permanecer en la sangre por más tiempo. Pudiendo determinar la hidrofobicidad e hidrofílicidad a través de mediciones del ángulo de contacto con el agua y por cromatografía de interacción hidrofóbica, respectivamente ⁵.

Existen diversos métodos sensibles para la caracterización de NP, dependiendo del factor que se esté investigando, en la **Tabla 3** se muestra algunos parámetros de caracterización, así como sus métodos.

Tabla 3. Parámetros y métodos de caracterización de NP de PLGA.

Parámetro	Método
Distribución del tamaño de partícula, forma y agregación de partículas	Microscopía electrónica de barrido Microscopía de efecto túnel Microscopía electrónica de transmisión Espectroscopia de correlación de fotones Difractometría láser
Propiedades de superficie, estabilidad de dispersión de nanopartículas	Microscopía de fuerza atómica
Grupos funcionales	Espectroscopia infrarroja
Interacción de polímero/NP-fármaco	Calorimetría diferencial de barrido Dispersión dinámica de luz
Determinación de carga superficial	Potencial Zeta
Hidrofobicidad superficial	Unión a rosa de Bengala (tinte) Medición del ángulo de contacto con el agua Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X
Peso molecular	Espectrometría de masas Cromatografía de exclusión por tamaño
Heteroestructura interna	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X
Estabilidad del fármaco	Bioensayo Análisis químico del fármaco
Perfil de liberación	Características de liberación <i>in vitro</i> en fluidos corporales simulados

Tabla modificada de: Prajapati, S. K. *et al.* Biodegradable polymers and constructs : A novel approach in drug delivery. *Eur. Polym. J.* **120**, 109191 (2019) ¹⁶.

5. Modificaciones superficiales de nanopartículas de PLGA.

Para servir como vehículo de liberación sitio-dirigida, las nanopartículas deben ser capaces de persistir en la circulación sistemática humana. Un tiempo de circulación prolongado ayudará a las nanopartículas a llegar a su órgano blanco. Como se mencionaba anteriormente, las nanopartículas son reconocidas y eliminadas del torrente por el RES; siendo este fenómeno uno de los principales desafíos en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos basado en nanopartículas. Por lo tanto, a pesar de su biocompatibilidad y biodegradabilidad favorables, las nanopartículas de PLGA son susceptibles a ser eliminadas de la circulación, por macrófagos inmediatamente después de su administración intravenosa. Para superar estas limitaciones, las nanopartículas pueden ser sometidas a modificaciones superficiales (**Figura 8**)⁵. Pudiendo utilizar dos métodos para preparar NP de PLGA por ingeniería de superficie; 1) Después de sintetizar derivados de PLGA (vinculados a grupos funcionales), se pueden usar para fabricar NP. 2) Después de fabricar NP de PLGA, los grupos funcionales expuestos (es decir, grupos de ácido carboxílico e hidroxilo) del PLGA se unen químicamente a restos de direccionamiento, o bien, la superficie exterior de las NP de PLGA se recubre con materiales funcionales¹⁴.

Las nanopartículas hidrofílicas con un tamaño aproximadamente ≤ 100 nm tienen la mayor tasa de supervivencia para escapar del sistema fagocítico. El tiempo de permanencia en la circulación para las nanopartículas hidrófilas es comparativamente mayor que el de las nanopartículas hidrofóbicas. Esto debido a que las nanopartículas hidrofóbicas son absorbidas preferiblemente por el RES y por lo tanto eliminadas del cuerpo². Se han utilizado diferentes estrategias para crear una nube hidrofílica alrededor de las nanopartículas y reducir su absorción por el RES. Estas estrategias comprenden el recubrimiento de las nanopartículas con polisorbato 80, PEG (polietilenglicol), PEO (óxido de polietileno), poloxámeros y poloxaminas, TPGS y polisacáridos como el dextrano⁵. A continuación, se abordarán algunos ejemplos:

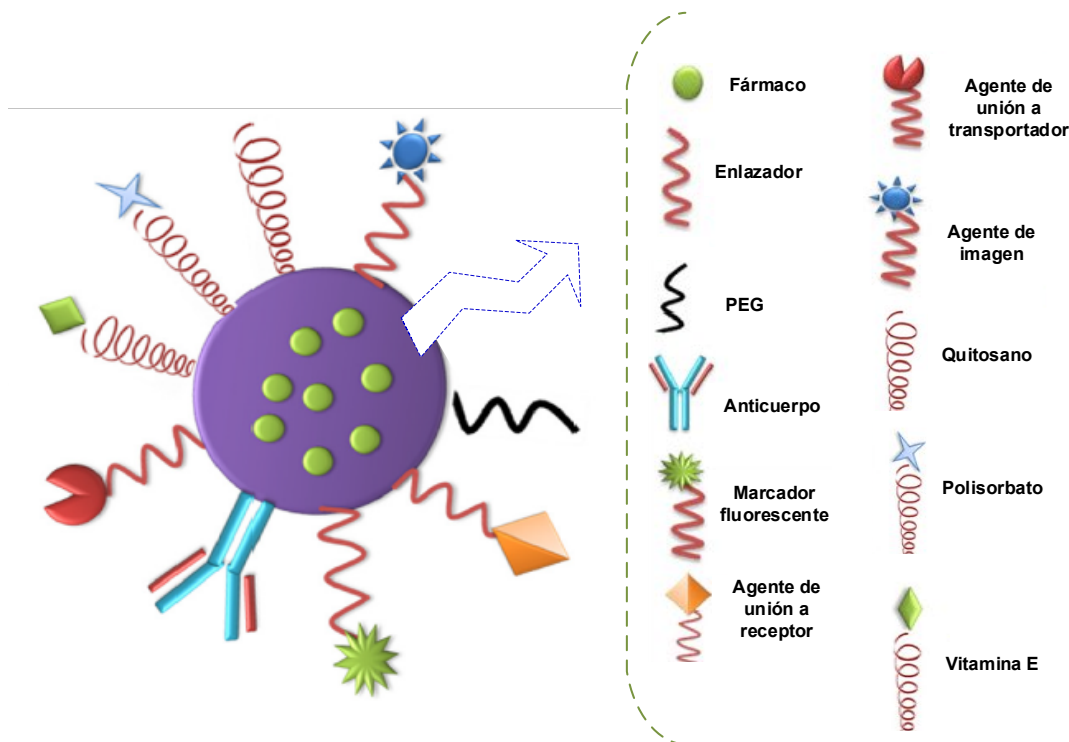


Figura 8. Posibilidades de modificación superficial en NP de PLGA para aumentar su tiempo en circulación y favorecer el direccionamiento a su objetivo. Imagen modificada de: Mir, M., Ahmed, N. & Rehman, A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **159**, 217–231 (2017) ¹.

5.1 Polietilenglicol (PEG).

El PEG es un polímero hidrófilo, no iónico con buena biocompatibilidad. El recubrimiento de la superficie de nanopartículas con PEG (PEGilación) es la técnica más utilizada para la modificación superficial de nanopartículas. El proceso permite a las nanopartículas evadir a los macrófagos, aumentando así su vida media plasmática. Se asume que la repulsión estérica, así como las fuerzas de van der Waals creadas por las barreras hidratadas en la superficie de las nanopartículas, evitan que las nanopartículas sean opsonizadas. La alta flexibilidad de la cadena de polímero permite la libre rotación de las unidades de polímero, creando una corona de protección altamente hidrofílica alrededor de las nanopartículas. Impidiendo la interacción de éstas con macromoléculas presentes en el cuerpo. La longitud, forma y densidad de las cadenas de PEG en la superficie de las NP, afectan principalmente la hidrofiliidad y la fagocitosis de los nanosistemas.⁵

Se ha observado que las moléculas de PEG con alto peso molecular, alta densidad superficial y de cadena larga se absorben a una velocidad comparativamente menor, aumentando el tiempo de residencia de las nanopartículas en circulación. Además, también se ha demostrado que la PEGilación de nanopartículas de PLGA aumenta la carga útil del fármaco, la solubilidad y la estabilidad cinética, mejorando el índice terapéutico y la accesibilidad de las nanopartículas al sitio blanco, reduciendo la acumulación de NP en órganos diferentes al blanco, como hígado y bazo. Con la ayuda de la PEGilación, se puede mejorar la solubilidad acuosa y la estabilidad, y reducir la agregación intermolecular y la inmunogenicidad. Como ejemplo a lo anterior, se ha demostrado que el paclitaxel dentro de una nanopartícula de PLGA PEGilada, alteró su farmacocinética y biodistribución, de tal manera que la acción sitio-dirigida del fármaco al tumor, se incrementó significativamente, lo que condujo a una mayor eficacia de inhibición del crecimiento tumoral, en comparación con el fármaco libre. En otro estudio, se demostró que las nanopartículas de PLGA PEGiladas, presentan un aumento en el tiempo de circulación y una disminución de la absorción por el hígado². Adicionalmente, se ha demostrado en las nanopartículas PEGiladas una absorción moderadamente más alta del fármaco en el bazo y el cerebro en comparación con nanopartículas no PEGiladas. En consecuencia, la presencia de PEG, imparte funcionalidades adicionales a las nanopartículas de PLGA ⁵.

5.1.1 Estrategias de PEGilación.

5.1.1.1 Conjugación directa.

Variar las condiciones de reacción puede ayudar a controlar la eficacia de la conjugación, por ejemplo, una incorporación no significativa de PEG, se puede generar cuando la molécula de PEG se conjuga directamente con los grupos carboxílicos presentes en la superficie de las nanopartículas de PLGA, esto, debido a la inaccesibilidad de estos grupos. Sin embargo, una eficiencia mayor, puede observarse cuando las nanopartículas se exponen a un ambiente acuoso durante el proceso de conjugación².

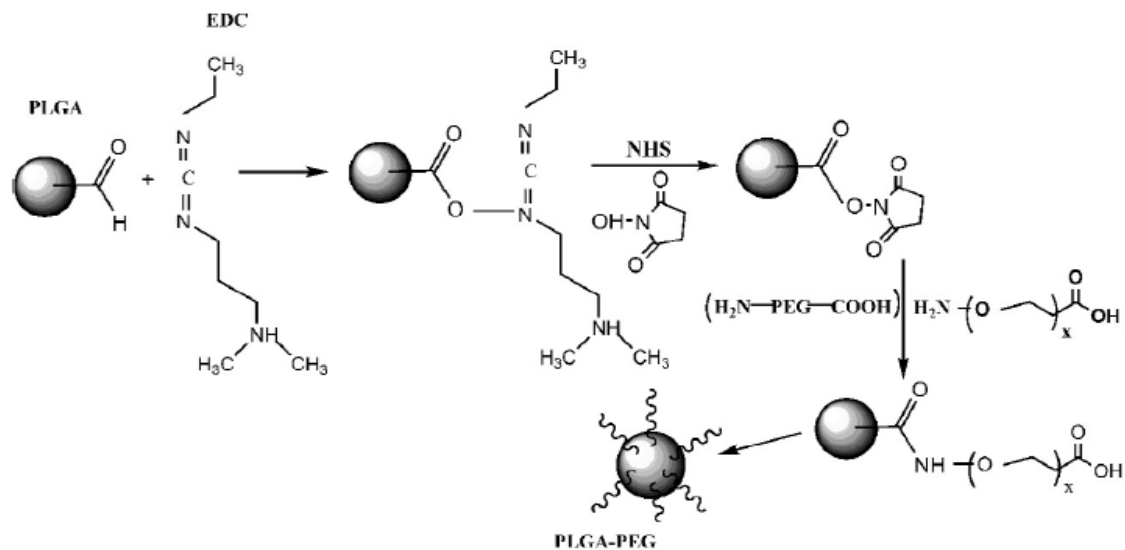
La conjugación directa de nanopartículas de PLGA con PEG, facilita la encapsulación del agente deseado en la nanopartícula, ocurriendo la PEGilación después de la encapsulación dentro del núcleo de la matriz polimérica sólida (**Figura 9a**). Sin embargo, esta técnica tiene ciertas limitaciones, como lo es el bajo rendimiento debido a la purificación ².

5.1.1.2 Conjugación activada.

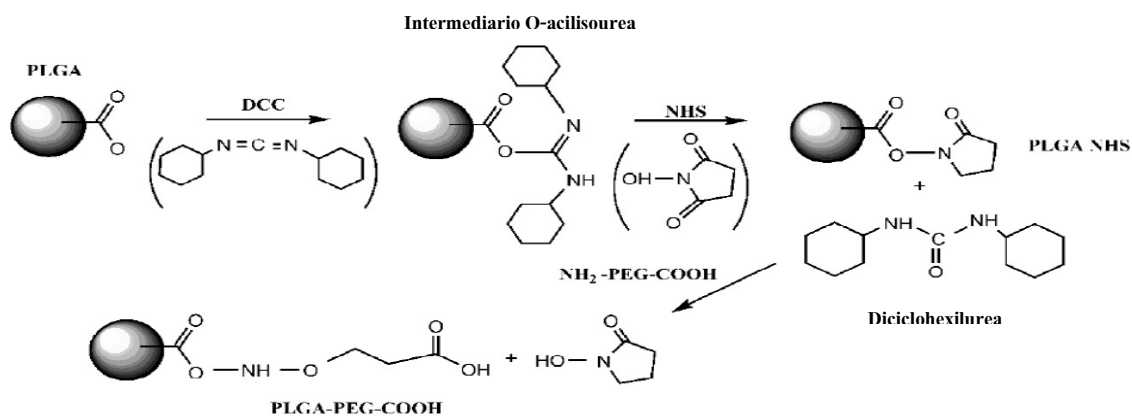
Es un proceso de dos pasos donde la activación se logra mediante la conjugación. Se produce una hidrólisis mínima del activo intermedio, y se evita la formación indeseable de conjugados de PEG-PEG. La **Figura 9b** muestra la ruta sintética utilizada para la conjugación de PEG heterofuncional a nanopartículas de PLGA ².

5.1.1.3 Polimerización de apertura de anillo.

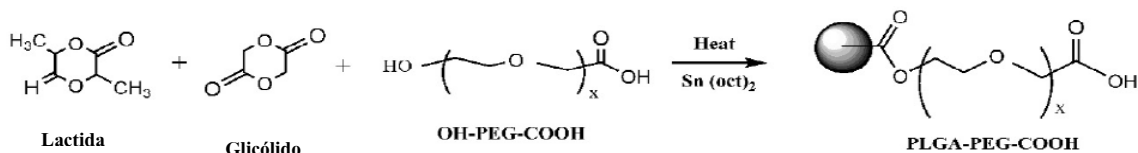
Entre todas las estrategias utilizadas, para la obtención de nanopartículas de PLGA PEGiladas, la polimerización de apertura de anillo es la técnica más comúnmente utilizada. La reacción es iniciada por agentes próticos como el grupo hidroxilo del OH – PEG – COOH, llevando a la formación de PLGA con grupos terminales hidroxilo, mientras que los grupos carboxilo terminales del PEG permanecen libres. Esta estrategia de PEGilación al PLGA, se utiliza antes de la formación de las nanopartículas de PLGA por cualquiera de los métodos de obtención de nanopartículas descritos en el capítulo 3. La **Figura 9c** muestra la polimerización de apertura de anillo de PEG a nanopartículas de PLGA ².



(a)



(b)



(c)

Figura 9. Estrategias de PEGilación.

(a) Conjugación directa de PEG a la superficie de NP de PLGA prefabricadas. (b) Conjugación activada de PLGA a PEG heterofuncional. (c) Polimerización de apertura de anillo de lactida y glicólido.

Imagen modificada de: Sharma, S., Parmar, A., Kori, S. & Sandhir, R. Trends in Analytical Chemistry PLGA-based nanoparticles : A new paradigm in biomedical applications. *Trends Anal. Chem.* **80**, 30–40 (2016) ².

5.2 Quitosano.

El quitosano es un biopolímero hidrofílico que forma películas, hidrogeles, fibras, esponjas y micro y nano partículas bajo condiciones moderadas. Químicamente, es un aminopolisacárido obtenido por N-desacetilación de quitina proveniente de varias especies de crustáceos. En formulaciones farmacéuticas convencionales, se usa como aglutinante, desintegrante y material de recubrimiento. En NP para administración oral, el quitosano ha sido ampliamente estudiado como un potenciador de la absorción oral, debido a sus propiedades mucoadhesivas y su capacidad para abrir uniones estrechas entre las células epiteliales, lo que facilita el transporte de fármacos macromoleculares a través de epitelios bien organizados ¹².

Aunque, las NP de quitosano también son consideradas como un posible sistema de liberación oral, presentaron limitaciones de estabilidad física en fluidos mucosos. Este polímero, por lo tanto, puede ser empleado como material de recubrimiento para NP de PLGA. En este caso, se tiene como objetivo principal, modificar la carga de la superficie de las NP y mejorar las propiedades de penetración de las NPs a las células. El recubrimiento con quitosano se puede realizar por interacción electrostática entre PLGA cargado negativamente y el quitosano con carga positiva o, mediante modificación química de cadenas de PLGA con quitosano, utilizando la estrategia de carbodiimida ¹².

5.2.1 Modificación superficial de NP de PLGA con quitosano vía interacción electrostática.

La modificación superficial de NP de PLGA con quitosano vía interacción electrostática, puede realizarse durante o después del proceso de síntesis de las NP ¹².

Para la modificación superficial durante el proceso de síntesis de las NP de PLGA, por cualquiera de los métodos mencionados en el capítulo 3, se emplea una mezcla de quitosano y una solución tensioactiva (PVA al 1%) **Figura 10A**. Como resultado de esto, se obtiene NP de PLGA catiónicas. Un ejemplo de esto, reportado en la literatura, es la preparación de NP de PLGA por el método de nanoprecipitación ¹².

En él se compararon NP recubiertas con quitosano vía interacción electrostática vs NP de PLGA simples, ambas cargadas con un factor nuclear kappa B (NF- κ B) para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. En ambos casos, encontraron que las NP recubiertas con quitosano aumentaron su tamaño hasta un 50-70% debido al alto peso molecular del quitosano, y modificaron su potencial zeta de valores ligeramente negativos (-31.1 mV) a valores positivos (+11.2 mV). Las NP fueron evaluadas en cultivos celulares y en modelos animales después de su administración, encontrando que las NP recubiertas presentaban citotoxicidad razonablemente baja y una estabilidad ¹².

Para el recubrimiento con quitosano de NP de PLGA posterior al proceso de síntesis; una vez obtenidas las NP (**Figura 10B**), se suspenden en una solución amortiguadora de quitosano bajo agitación constante ¹².

En un estudio realizado, se analizaron ambas vías de recubrimiento, preparando NP de PLGA cargadas de calcitonina de salmón para administración oral. Se encontraron diferencias importantes en el tamaño de partícula entre los métodos, debido a que cuando se agrega quitosano durante la síntesis de las NP, el aumento de la viscosidad dificulta la formación de gotas. Mientras tanto, cuando el quitosano es agregado en la etapa final, una capa adicional no aumentaría significativamente el tamaño final de la NP. También se encontraron diferencias en la eficiencia de atrapamiento. Cuando las partículas de PLGA cargadas con calcitonina se sumergieron en la solución de quitosano, la calcitonina se difundió en la solución con un pH ácido, presentando una baja eficiencia de encapsulación. En estas condiciones, la calcitonina actúa como una base débil (punto isoeléctrico 10.4) ¹².

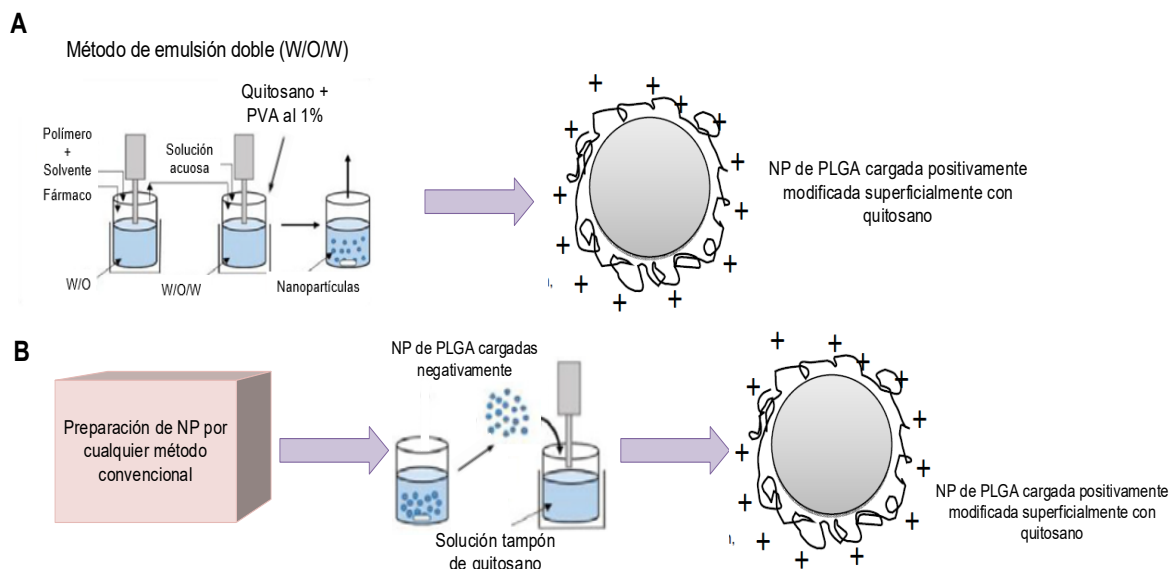


Figura 10. Modificación superficial con quitosano en NP de PLGA.

A. Proceso de recubrimiento con quitosano durante la síntesis de las NP.

B. Modificación superficial con quitosano después del proceso de síntesis.

Imagen modificada de: Holgado, M. A. Functional PLGA NPs for Oral Drug Delivery : Recent Strategies and. 58–69 (2013) ¹².

5.2.2 Modificación superficial química de NP de PLGA con quitosano.

La reacción química entre PLGA y quitosano ocurre mediante la estrategia de carbodiimida, donde tiene lugar la formación del grupo amida. La reacción que ocurre en la superficie de las NP es catalizada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) (EDC), mientras que la N-hidroxisuccinimida (NHS) es utilizada como un aditivo para aumentar el rendimiento y disminuir las reacciones secundarias. Un ejemplo que citar, de este tipo de modificación superficial, es un estudio en el que se utilizó quitosano tiolado para prolongar el tiempo de permanencia en la mucosa. La superficie de las NP de PLGA fue modificada químicamente con quitosano, usando el método de carbodiimida descrito anteriormente. Los grupos amino libres del quitosano se tiolaron posteriormente con 2-iminotiolano. Dando lugar a la estructura catiónica amidina, aumentando el carácter positivo de las NP, mismo que fue confirmado por mediciones de potencial zeta. El tamaño medio de partícula aumentó notablemente (hasta 3 veces), mientras que la eficiencia de atrapamiento fue notablemente más baja en las NP de PLGA recubiertas (28% frente a 56%) ¹².

5.3 Polisorbato.

Polisorbato 20, 40, 60 y 80 son los surfactantes no iónicos y emulsificantes más utilizados en productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos². Las nanopartículas recubiertas de polisorbato pueden atravesar barrera hematoencefálica (BBB) de manera más eficiente. Se han reportado NP de PLGA recubiertas con polisorbato 80, capaces de atravesar BBB, imitando a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), permitiéndoles interactuar con el receptor de LDL, resultando en la absorción de las NP por las células endoteliales del cerebro⁴⁹.

5.4 Vitamina E TPGS.

La vitamina E TPGS es un derivado de la vitamina E, que consiste en una cabeza polar hidrofílica (succinato de tocoferol) y una cola de alquilo lipofílica (polietilenglicol), presentando propiedades anfifílicas¹⁷.

La vitamina E TPGS es incorporada a la fase acuosa en cualquiera de las técnicas de obtención de NP, reemplazando tensioactivos de uso común como el alcohol polivinílico (PVA). Este nuevo tensioactivo, mostró una mejor eficiencia emulsionante que el PVA, y una liberación mejorada cuando se mezcló con otros polímeros biodegradables. La superficie de las NP de PLGA-TPGS, pareciera estar dominada por las moléculas de TPGS, demostrando así, el papel emulsionante de ésta, y sugirieron la posibilidad de que la vitamina E-TPGS, podría mejorar tanto la adhesión de NP a las células, como sus propiedades hemodinámicas en el torrente sanguíneo. La modificación superficial de las NP con TPGS, fue investigada más tarde en experimentos *in vitro* e *in vivo* como una estrategia potencial para extender la vida media de TPGS en plasma y aumentar su captación celular. El potencial de las NP de PLGA modificadas con TPGS, como posibles portadores para el suministro de fármacos al cerebro fue estudiado, encontrando, que la vitamina E-TPGS "enmascara" a las NP, permitiéndoles cruzar BBB, facilitando la liberación del fármaco. Los beneficios potenciales para la salud de la vitamina E en la curación de síntomas neurológicos asociados con la deficiencia de vitamina E, y las características prometedoras de las NP como un sistema de direccionamiento de fármacos al cerebro, se combinan en las NP TPGS-PGLA¹².

La citotoxicidad *in vitro* de estas NP se estudió utilizando la línea celular PC12 como modelo de células neurales mediante el ensayo MTT (ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, MTT). No se observó citotoxicidad obvia, y el aumento de la relación de TPGS en la formulación de las NP, condujo a un mayor efecto terapéutico *in vitro*. De modo que la degradación de las NP pudo liberar una mayor cantidad de TPGS, teniendo así, una actividad sinérgica que mejora la eficiencia de las NP. Adicionalmente, estas NP TPGS-PLGA mostraron una cantidad de fármaco relativamente mayor en el cerebro en comparación con el Taxol® administrado sin este sistema de liberación. Del mismo modo, fue señalado el efecto de inhibición de TPGS sobre la actividad de la glicoproteína P (P-gp), una proteína de membrana que actúa como bomba de eflujo de fármacos dependiente de ATP con mayor expresión en tumores humanos. Esta proteína elimina una gran cantidad de medicamentos químicamente no relacionados y, por tanto, está asociada con el fracaso de la quimioterapia debido a la resistencia de medicamentos. La vitamina E TPGS funciona como un inhibidor de la P-gp, y se ha encontrado que mejora la citotoxicidad y la permeabilidad en la solubilización de micelas de varios fármacos antineoplásicos y el amprenavir (inhibidor de proteasa con actividad contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1)¹⁸. Este efecto de inhibición de la bomba de eflujo y el recubrimiento superficial con TPGS puede ser responsable del acceso de fármacos al cerebro. Además, estas NP aumentaron significativamente el tiempo de circulación sanguínea del medicamento a 224.5 h en comparación con las 22.9 h que presentó el Taxol® posterior a su administración vía intravenosa de la misma dosis. Esto se atribuyó al recubrimiento superficial de las NP con TPGS, reduciendo en gran medida el reconocimiento y la eliminación de las NP por parte de los macrófagos ¹².

5.5 Metacrilatos (EUDRAGIT®).

Los polímeros Eudragit® son copolímeros derivados de ésteres de los ácidos acrílico y metacrílico, cuyas propiedades fisicoquímicas están determinadas por grupos funcionales. Están disponibles en una amplia variedad química y en numerosas formas que permiten perfiles de liberación modificados de fármacos, ofreciendo propiedades entéricas, protectoras o de liberación sostenida¹².

En consecuencia, han sido utilizados como material de recubrimiento para micro y nano partículas. Los Eudragits se pueden incorporar como parte de la matriz polimérica, ya sea como una mezcla con PLGA o por separado en la fase acuosa del procedimiento de síntesis¹².

Como ejemplo a lo anteriormente mencionado, se han desarrollado NP de PLGA recubiertas con polímeros Eudragit® o mezclas de PLGA-Eudragit®, con la finalidad de controlar los perfiles de liberación, tanto de moléculas terapéuticas pequeñas, como el clorhidrato de metformina; como para proteínas grandes como la calcitonina de salmón (sCT). Estas mezclas han demostrado poder aumentar la biodisponibilidad del fármaco¹².

5.6 Lecitinas.

Con funciones esenciales para humanos, animales y plantas, la lecitina es un componente natural de todas las células vivas. El término "lecitina" describe la mezcla compleja de fosfolípidos y otros componentes concomitantes, como triglicéridos, ácidos grasos, esteroides y glicolípidos. Los fosfolípidos son los componentes que aportan valor en la lecitina y son los componentes principales de la membrana celular y la estructura liposomal. Forman parte de los lípidos estructurales y su característica principal es su carácter anfifílico o anfipático, es decir, que una parte de la molécula tiene una afinidad hidrofílica y otra parte es lipofílica. Un fosfolípido está formado por una molécula de glicerol, un grupo fosfato y dos cadenas de ácidos grasos (lípidos). El grupo fosfato tiene otro grupo acoplado, a veces con una carga eléctrica (colina, serina y etanolamina, entre otros). Los fosfolípidos se clasifican de acuerdo con sus cabezas polares hidrofílicas. Los más importantes son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol¹².

En la síntesis de NP de PLGA, las lecitinas son usadas como tensioactivos debido a sus propiedades como estabilizantes. No solo disminuyen la adsorción del fármaco en la superficie del polímero, sino que también sirven para aumentar la eficacia de encapsulación en los sistemas de liberación de fármacos. Pueden ser agregadas al polímero en la misma fase (la lecitina estará en la superficie y dentro de la NP, además de actuar como un tensioactivo). De manera similar, podría usarse en una fase separada en la que el polímero se agrega gota a gota. En este caso, se espera que la lecitina esté en la superficie de las partículas¹².

Las lecitinas también se pueden usar para el reconocimiento de la superficie de las células, para administrar medicamentos a su sitio de acción. Esto debido a que las lecitinas tienen la misma estructura que la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares, siendo estos los componentes más importantes. Por lo tanto, las lecitinas mejoran el reconocimiento y el atrapamiento del fármaco en la célula. Además, las lecitinas se usan para disminuir la hidrofobicidad de algunos de los polímeros que se emplean en la formulación de NP, como PLGA, mejorando su afinidad a las membranas celulares, asegurando un mejor perfil de liberación¹².

El efecto principal en la conjugación de lecitinas con nanosistemas, particularmente en NP de PLGA, se observa en estudios *in vitro* e *in vivo*. Donde la monocapa lipídica actúa como una cerca molecular, y contribuye a mantener las moléculas del fármaco en el núcleo hidrofóbico, así como a mantener el agua fuera del núcleo (**Figura 11**). Esto es importante porque el agua hidrolizaría el polímero PLGA, aumentando la erosión y por lo tanto la liberación del fármaco. Adicionalmente, estas NP han sido bien toleradas por los modelos de líneas celulares humanas, HeLa y HepG2, utilizadas para evaluar la citotoxicidad de los nanosistemas. Se ha demostrado en pruebas de cultivo celular que la adhesión y proliferación de los cultivos celulares depende del contenido de lecitina, mejorando significativamente cuando el contenido de lecitina aumenta (3-7% en peso)¹².

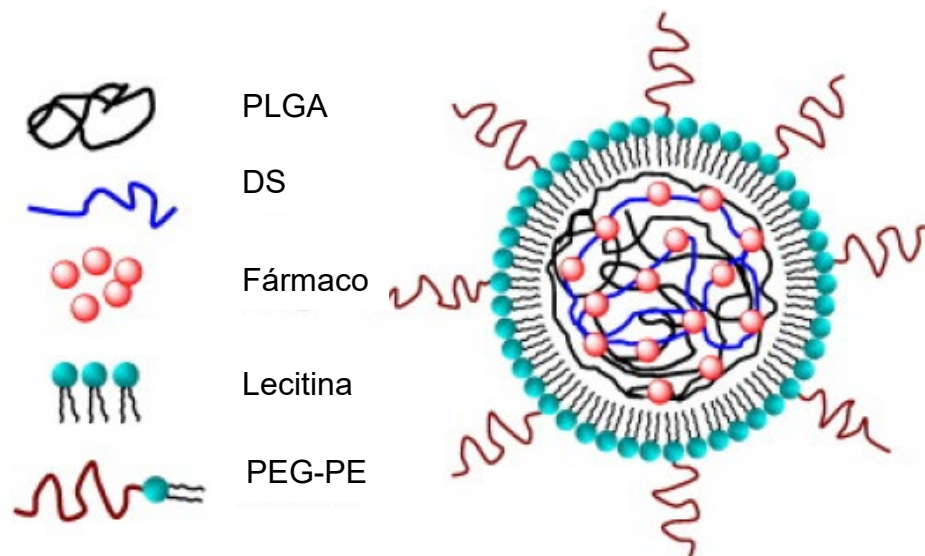


Figura 11. Ilustración esquemática de NP de PLGA modificada con Lecitina. Esta NP comprende un núcleo híbrido de dextrano-PLGA, una cubierta de PEG hidrófila y una monocapa de lípidos anfifílicos en la superficie del núcleo. DS (Dextrano), PE (Fosfatidiletanolamina). Imagen modificada de: Holgado, M. A. Functional PLGA NPs for Oral Drug Delivery: Recent Strategies and. 58–69 (2013) ¹².

5.7 Modificación superficial del copolímero PLGA mediante hidrólisis y aminólisis.

Debido al carácter hidrofóbico del PLGA, las NP de este material no pueden interactuar fácilmente con las células, además, que no poseen ningún grupo funcional para su unión a moléculas biológicamente activas. La modificación superficial de las NP de PLGA, proporciona características útiles de superficie al polímero (ej. hidrofiliidad), sin cambiar las propiedades del nanoportador. A continuación, se describirán dos métodos químicos: hidrólisis básica y aminólisis; para introducir el grupo funcional ácido carboxílico y aminas primarias y secundarias, respectivamente, en la superficie de nanopartículas de PLGA ⁶.

5.7.1 Hidrólisis.

La hidrólisis de poliésteres como PLGA se puede realizar bajo condiciones ácidas o básicas. A pesar de que se han propuesto varios mecanismos para la hidrólisis de ésteres catalizada por ácido, en general, la reacción es impulsada por un ataque electrofílico de iones hidrógeno

en el oxígeno de carbonilo. De manera, que varios factores hacen que este esquema de reacción sea desfavorable para la modificación superficial específica. La reacción es impulsada por protones pequeños y altamente móviles, que pueden difundirse con relativa facilidad entre las cadenas del polímero sin carga, y siendo regenerados por la reacción. Por lo tanto, se requiere una rapidez de reacción muy alta para restringir la hidrólisis a la superficie. Dado que los enlaces éster están débilmente disponibles para la hidrólisis electrofílica, se requiere condiciones altamente ácidas. La hidrólisis ácida de PLGA con fines de modificación superficial, ha sido reportada con anterioridad utilizando soluciones extremadamente potentes de ácido perclórico/clorato; conduciendo a niveles significativos de degradación macroscópica, del orden de decenas de micrómetros ⁶.

En condiciones básicas, la hidrólisis es impulsada mediante ataques nucleofílicos por iones hidroxilo en la región de menor densidad de electrones, el carbono carbonílico. Estos iones hidroxilo se consumen durante la reacción de hidrólisis, generando en el proceso grupos de ácido carboxílico cargados negativamente en la superficie del polímero. La repulsión electrostática entre estos grupos terminales cargados negativamente y los iones hidroxilo solvatados, combinado con el hecho de que el ion hidroxilo es de mayor tamaño que el protón y no se regenera; hace que disminuya la velocidad de difusión de los iones hidroxilo al polímero, orientándose a la superficie del polímero, favoreciendo así, bajo estas condiciones la hidrólisis ⁶.

5.7.2 Aminólisis.

La reacción se desarrolla mediante un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico, para formar un intermediario tetraédrico cargado positivamente. En condiciones ácidas o neutras, el grupo saliente amina ($R-NH_2$), es preferido sobre el grupo saliente alcohol ($RC-O^-$) y, por tanto, la reacción no se lleva a cabo. Sin embargo, en condiciones básicas, el intermediario tetraédrico es desprotonado, lo que lleva a un grupo saliente desfavorable, el grupo amida $R-NH^-$ ($pK_a > 30$). Por tanto, la reacción procede a la formación de una amida y un alcohol ⁶. De esta manera, la aminólisis generalmente se lleva a cabo en solución acuosa básica ($pH > pK_a$ de la amina), o en un disolvente polar aprótico con un alto grado de basicidad π , como un alcohol ⁶.

En contraste con la hidrólisis básica, la energía de activación para la reacción de aminólisis es muy baja y, en los disolventes orgánicos, a menudo es negativa, lo que lleva a una dependencia baja o inversa de la rapidez de reacción con la temperatura ⁶.

La ruta general para la modificación superficial del PLGA mediante hidrólisis y aminólisis se muestra esquemáticamente en la **Figura 12**.

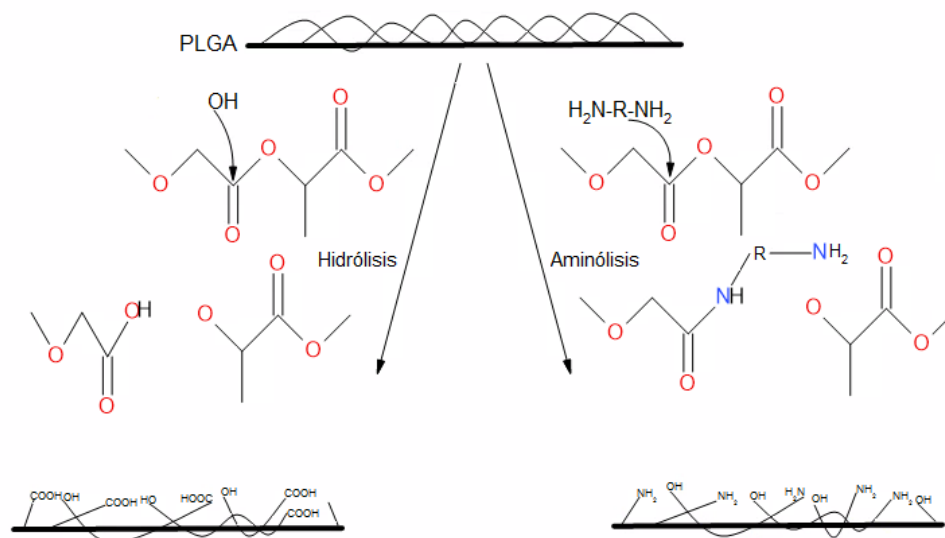


Figura 12. Modificación del polímero PLGA mediante hidrólisis y aminólisis. Ambas reacciones impulsadas por ataques nucleofílicos en el carbono carbonílico. Favoreciendo así, la hidrofiliicidad de las NP.

Imagen modificada de: Croll, T. I., Connor, A. J. O., Stevens, G. W. & Cooper-white, J. J. Controllable Surface Modification of Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I: Physical, Chemical, and Theoretical Aspects. 463–473 (2004). doi:10.1021/bm0343040 ⁶.

5.8 Modificaciones superficiales de Nanopartículas y el cáncer.

Una de las principales causas de muerte a nivel mundial, es el cáncer, siendo el cáncer de cerebro y otros tipos de cáncer del sistema nervioso, la décima causa principal de muerte para hombres y mujeres. Los tumores cerebrales representan del 85% al 90% de todos los tumores primarios del SNC. De manera general, se puede clasificar a los tumores cerebrales como primarios y secundarios: un tumor primario de cerebro o médula espinal es un tumor que se origina en el cerebro o médula espinal ⁸.

De acuerdo con el Central Brain Tumor Registry de los Estados Unidos, en el 2019 un estimado de 23,820 adultos (13,410 hombres y 10,410 mujeres) en los Estados Unidos fueron diagnosticados con tumores cancerosos primarios del cerebro y la médula espinal. Mientras que 3,720 niños menores de 15 años fueron diagnosticados con un tumor cerebral o del SNC en el 2020. El segundo tipo de tumores cerebrales son los secundarios o metástasis cerebrales. Esto es cuando el tumor se originó en otro lugar del cuerpo y se extendió al cerebro. Los tipos de cáncer más comunes que se propagan al cerebro son el de vejiga, seno, riñón y pulmón, leucemia, linfoma y melanoma ⁸.

Con base en la National Brain Tumor Society, 700,000 estadounidenses viven con un tumor cerebral, de los cuales, el 69.1% de los tumores no son malignos y el 30.9% sí los son. La tasa de supervivencia promedio para todos los pacientes con tumores cerebrales malignos es solo del 35%. Cerca de 16.830 personas murieron a casusa de tumores cerebrales malignos en el 2019 ⁷.

Existen más de 130 tipos diferentes de tumores cerebrales, sin embargo, hasta la fecha, los pocos medicamentos aprobados para los tumores cerebrales solo han proporcionado mejoras incrementales en la supervivencia del paciente, sin embargo, las tasas de mortalidad siguen siendo poco cambiantes. Para muchos tipos de tumores, la cirugía y la radiación siguen siendo el estándar de atención. Entre 1998 y 2014, hubo 78 medicamentos en investigación para tumores cerebrales que ingresaron al proceso de evaluación de ensayos clínicos, de los cuales, 75 fallaron. Lo que lleva a la apertura de un gran campo de investigación en lo que concierne a los medicamentos anticancerígenos, específicamente para tumores cerebrales ⁸.

Una de las principales razones del fracaso de estos medicamentos, es la gran limitante que existe con respecto a ellos: la mayoría de los agentes anticancerígenos no diferencian significativamente entre células normales y cancerosas, lo que conduce a toxicidad sistémica y efectos adversos. Por lo tanto, las aplicaciones sistémicas de estos medicamentos a menudo causan efectos secundarios rigurosos en otros tejidos (como la supresión de la médula ósea, cardiomiopatía y neurotoxicidad), limitando en gran medida la dosis máxima permitida del fármaco ⁵.

Además, la eliminación rápida y la distribución generalizada en órganos y tejidos, diferentes al blanco, requieren la administración de un fármaco en grandes cantidades, situación, que no es rentable y que a menudo resulta complicada debido a la toxicidad inespecífica. La nanotecnología sugiere un enfoque más específico que podría proporcionar importantes beneficios a los pacientes con cáncer. De hecho, el uso de nanopartículas para liberación y focalización de fármacos es probablemente una de las aplicaciones de la nanotecnología clínicamente más significativas para el cáncer. Los sistemas de nanopartículas ofrecen mejoras importantes en la terapéutica a través de la mejora de la especificidad al sitio, la capacidad de evadir la resistencia a múltiples fármacos y la propia liberación de los agentes anticancerígenos. Los mecanismos de liberación dirigida del fármaco pueden ser pasivos (aprovechando las distintas características fisiopatológicas del tejido tumoral) o activos (mediante modificaciones superficiales del portador del fármaco utilizando ligandos específicos de unión al blanco) ⁵.

5.8.1 Liberación dirigida pasiva.

Los cambios estructurales en la fisiopatología vascular podrían proporcionar oportunidades para el uso de sistemas transportadores de partículas de larga circulación. Particularmente hablando, los vasos sanguíneos tumorales generalmente se caracterizan por anomalías tales como una alta proporción de células endoteliales proliferantes, deficiencia de pericitos y formación anormal de la membrana basal que conducen a una permeabilidad vascular mejorada ⁵.

De modo que partículas, como los nanoportadores (en el intervalo de tamaño de 20-200 nm), pueden extravasarse y acumularse dentro del espacio intersticial (**Figura 13A**) ⁵.

Los poros endoteliales tienen tamaños que varían de 10 a 1000 nm ⁵. Además, los vasos linfáticos están ausentes o no son funcionales en el tumor, lo que contribuye a que las NP que ingresaron al tumor no se eliminan de manera eficiente y, por lo tanto, se conservan en el tumor ¹⁴.

Este fenómeno pasivo, que no suele ocurrir en tejidos normales, ha sido llamado "efecto de retención y permeabilidad mejorada" (EPR por la expresión en inglés), siendo descubierto por Matsumura y Maeda para poder usarse como una estrategia pasiva de focalización tumoral ¹⁴. Para aumentar el tiempo de circulación y la capacidad de liberación sitio-dirigida, el tamaño óptimo del nanotransportador, debe ser inferior a 100 nm de diámetro y su superficie debe ser hidrófila para evadir la eliminación por macrófagos. Para esto, se prefiere la modificación superficial de las NP con alguno de los elementos anteriormente mencionados, por ejemplo, con PEG ⁵. O bien, existen varios factores que modulan el efecto EPR (p. Ej., Bradiquinina, derivados de óxido nítrico, prostaglandinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y el factor de crecimiento endotelial vascular [VEGF])¹⁴.

5.8.2 Liberación dirigida activa.

En este mecanismo, ligandos de direccionamiento son unidos a la superficie de la nanopartícula para unirse a los receptores adecuados expresados en el sitio de acción (**Figura 13B**). El ligando se elige con base en la capacidad para unirse a un receptor sobreexpresado en las células tumorales o en la vasculatura tumoral y no expresado en células normales. Además, dichos receptores deben expresarse de manera homogénea en todas las células blanco. Los ligandos dirigidos generalmente son anticuerpos monoclonales (mAbs) y fragmentos de anticuerpos o bien, ligandos diferentes a anticuerpos (peptídicos o no). En la estrategia de liberación dirigida activa, se pueden diferenciar dos blancos: i) células cancerosas y ii) endotelio tumoral ⁵.

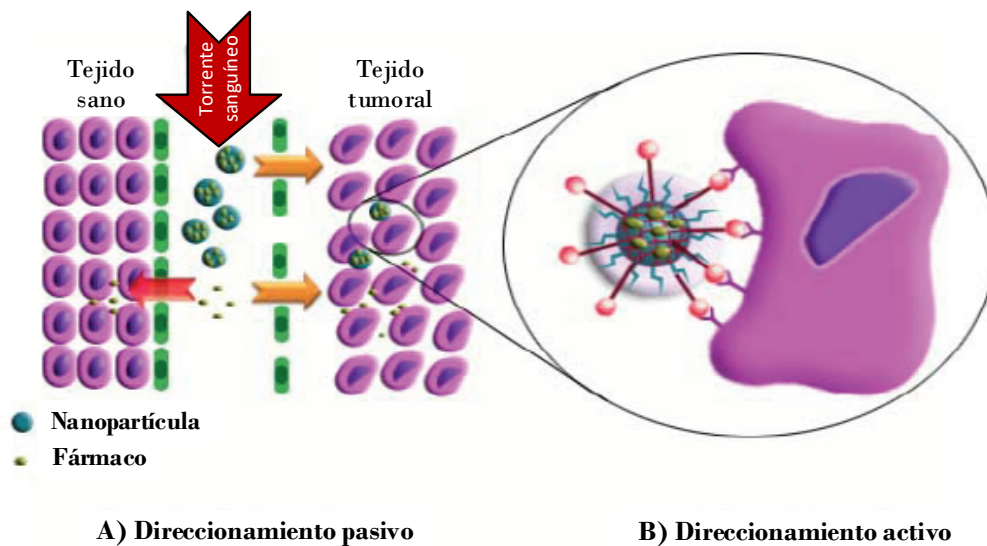


Figura 13. Descripción gráfica de direccionamiento pasivo y activo.

A) Direccionamiento pasivo: a través del efecto EPR. B) Direccionamiento activo: mediante focalización al ligando.

Imagen modificada de: Sadat, F. *et al.* PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. **15**, 517–535 (2014) ⁵.

5.8.3 Células cancerosas como blanco.

El objetivo de la orientación activa hacia los receptores de la superficie celular propensos a la internalización, sobreexpresados por las células cancerosas, es mejorar la captación celular de los nanoportadores. Por lo tanto, la orientación activa es principalmente atractiva para la administración intracelular de fármacos macromoleculares, como ADN, siRNA y proteínas. La aptitud del nanoportador para ser internalizado después de unirse a la célula objetivo es, por lo tanto, un criterio significativo en la selección de ligandos de direccionamiento adecuados. En esta estrategia, se tendrá como resultado la muerte celular directa, incluida la citotoxicidad contra las células que se encuentran en la periferia del tumor y que son independientes de la vasculatura tumoral ⁵.

Uno de los receptores considerado como propenso a la internalización, es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés). El EGFR es un componente de la familia ErbB; una familia de receptores tirosina cinasa. Su activación estimula procesos clave involucrados en crecimiento y progresión tumoral ⁵.

EGFR es comúnmente sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, particularmente en cáncer de mama; un ejemplo de esto es el receptor epidérmico 2 (HER-2), el cual se encuentra expresado en 14-91% de pacientes con este tipo de cáncer. También se ha encontrado que el EGFR juega un papel importante en la progresión de varios tumores malignos humanos, expresándose o sobreexpresándose en una diversidad de tumores sólidos, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, así como cáncer de ovario, riñón, páncreas y próstata ⁵.

5.8.3.1 Endotelio tumoral como blanco.

La demolición del endotelio en tumores sólidos puede provocar la muerte de las células tumorales inducida por la falta de oxígeno y nutrientes. En 1971, Judah Folkman sugirió que el crecimiento del tumor podría inhibirse evitando que los tumores recluten nuevos vasos sanguíneos. Así, esta observación fue la base del diseño de nanopartículas dirigidas activamente a las células endoteliales del tumor. Al atacar el crecimiento del suministro de sangre, se puede controlar el tamaño y las capacidades metastásicas de los tumores. En consecuencia, en esta estrategia, los nanoportadores modificados con ligandos, se unen a sus receptores y destruyen los vasos sanguíneos angiogénicos, e indirectamente, las células tumorales que estos vasos sostienen, principalmente en el tumor núcleo. Las ventajas de la focalización del endotelio tumoral son; a) no hay necesidad de extravasación de nanoportadores para alcanzar su sitio de acción, b) la unión de las nanopartículas a sus receptores se realiza de manera directa después de una inyección intravenosa y c) el posible riesgo de resistencia emergente se reduce debido a la estabilidad genética de las células endoteliales en comparación a las células tumorales ⁵.

5.9 Conjugación de ligandos para mejorar el direccionamiento de fármacos al cerebro.

La liberación de fármacos a través del cerebro siempre ha sido un tema problemático debido a la barrera hematoencefálica (BBB). De tal modo, para poder desarrollar medicamentos que puedan atravesar esta barrera, es de suma importancia entender primero las causas que impide que el fármaco llegue al cerebro en una concentración óptima ⁹.

A continuación, se hablará sobre las barreras fisiológicas asociadas con la liberación cerebral de fármacos, y de una estrategia mediada por ligando que podría emplearse para prevenir este problema.

5.9.1 Barreras fisiológicas.

5.9.1.1 Barrera hematoencefálica (BBB).

BBB es una interfaz dinámica, presente en los capilares cerebrales, de estructura endotelial, y con el objetivo principal de proteger el cerebro de fluctuaciones fisiológicas en las concentraciones plasmáticas de varios solutos y sustancias que pueden dificultar el proceso de neurotransmisión. Así, debido a la naturaleza de ésta, se dificulta el suministro de fármacos en el tratamiento de enfermedades neurológicas ⁹.

Los transportadores presentes en BBB permite la entrada de iones y nutrientes de la sangre para cubrir la demanda del cerebro. Sin embargo, al carecer de aberturas, con uniones intracelulares rígidas, se dificulta la difusión paracelular de fármacos y presenta una actividad pinocítica mínima. Moléculas de gran tamaño y de estructura altamente ramificada, no pueden atravesar BBB. Por lo tanto, BBB funciona como una capa obstructiva primaria del cerebro para el paso de fármacos. Sin embargo, existen ciertas estrategias que se utilizan para superar este impedimento, lo que resulta crucial para mejorar la efectividad terapéutica del medicamento:

- a) Transcitosis mediada por adsorción: durante este mecanismo de transcitosis, como su nombre lo indica, se lleva a cabo un proceso de adsorción en el que los iones catiónicos de las nanopartículas interactúan con la carga negativa en la superficie del epitelio cerebral ⁹.
- b) Transcitosis mediada por transportadores: consiste en imitar en las nanopartículas, características de sustancias endógenas para lograr que penetren a las células cerebrales con ayuda de sus transportadores. Un ejemplo de sustancia endógena, que se podría imitar, es la glucosa, para así conseguir atravesar BBB mediante su transportador GLUT 1 localizado en la misma ⁹.

- c) Transcitosis mediada por receptores: se trata de la estrategia más apropiada que se utiliza para el direccionamiento cerebral de fármacos, debido a su especificidad y selectividad. Existen varios receptores en las células endoteliales del cerebro que podrían ser utilizados para atravesar BBB, entre ellos se encuentran los receptores de transferrina, insulina y LDL. Sin embargo, este mecanismo, presenta dos principales inconvenientes: entre el receptor y el ligando que estará unido a la superficie de las nanopartículas, se produce un enlace excepcionalmente fuerte, lo que a su vez da como resultado una baja tasa de exocitosis. Y como segundo inconveniente, que se pueda dar una posible saturación de los receptores debido a la unión del ligando endógeno, lo que dificultaría la entrada de la nanopartícula mediada por el receptor ⁹.

Más adelante se describirá de forma más detallada y con ejemplos, estos tres mecanismos para poder atravesar BBB.

5.9.1.2 Barrera sangre- líquido cefalorraquídeo (BCB).

Está presente en el plexo coroideo que separa la sangre del líquido cefalorraquídeo, recubre el espacio subaracnoideo alrededor del cerebro y se compone de epitelio cuboidal modificado que secreta líquido cefalorraquídeo. El área superficial de esta barrera es considerablemente inferior en comparación con BBB, por lo tanto, no contribuye significativamente a la penetración del fármaco. El plexo coroideo posee enzimas metabolizadoras de fármacos que proporcionan funciones neuroprotectoras contra moléculas administradas de manera exógena⁹.

5.9.1.3 Barrera tumoral sanguínea.

En comparación con la vasculatura estructurada normal de tejidos sanos, cuando hay tumores, los vasos sanguíneos son típicamente anormales con afecciones como capilares dilatados, con paredes que presentan fugas y flujo lento, que en última instancia conducen a una liberación impredecible del fármaco ⁹.

Además, una fuga de la vasculatura tumoral, a menudo termina en la acumulación de líquido intersticial que, en consecuencia, aumenta la presión intersticial intratumoral, restringiendo la difusión del fármaco en los tumores cerebrales ⁹.

En lo que respecta a los tumores cerebrales, la permeabilidad es de gran interés, las variables involucradas en la permeabilidad son las poblaciones de microvasos tumorales, es decir, BTB (barrera tumoral cerebral) y la distribución espacial de los capilares blanco. BTB está compuesta por capilares de tumores cerebrales que se diferencian de manera variable de BBB. Estos capilares también pueden sobre-expresar ciertos receptores que intervienen en los sistemas de liberación de fármacos dependientes de ligandos ⁹.

5.9.2 Enfoque de ligando dirigido.

Es una estrategia de direccionamiento que involucra un enlace directo entre el sistema portador, en este caso, NP de PLGA y un ligando o bien a través de un conector. Un ligando ideal debe tener alta especificidad hacia su receptor junto con un grupo funcional preciso para la conjugación con el nanoportador. El método por el cual el ligando se conjuga con el sistema portador es de primordial importancia al determinar la eficiencia de la liberación del fármaco. La adsorción directa del ligando en la superficie del portador no se considera una opción adecuada, ya que existe la posibilidad de que se produzca desorción al ingresar al sistema biológico. Por lo tanto, el método utilizado principalmente, es el acoplamiento químico, el cual se basa en la unión del ligando deseado a la superficie de las NP de PLGA, a través de los grupos poliméricos del extremo carboxilo, cuando se usa PLGA con terminación ácido. Estas reacciones de unión pueden realizarse por interacciones no covalentes, hidrofóbicas o iónicas, o por conjugaciones covalentes. Las conjugaciones no covalentes, son particularmente interesantes debido a su simplicidad y espontaneidad, sin degradación del ligando, y evitando reactivos o catalizadores. Sin embargo, esta conjugación es menos estable que la covalente. Las interacciones electrostáticas, la coordinación de afinidad de metales y las interacciones biotina-avidina (bioconjugación) son ejemplos de conjugaciones no covalentes. La interacción biotina-avidina es la más estable entre estas tres, donde los grupos terminales de carboxilo de PLGA pueden conjugarse con biotina-NH₂ ¹³.

Como la biotina tiene una alta afinidad con la avidina o los análogos (p. ej. Estreptavidina), se puede realizar el acoplamiento no covalente entre partículas de PLGA biotiniladas y conjugados de avidina-ligando ¹³.

El éxito de NP de quitosano-PLGA biotiniladas, como un nuevo sistema de liberación de fármacos basado en PLGA para la terapia contra el cáncer, ha sido estudiado, demostrando una mejora del efecto terapéutico de la epirubicina y de la internalización de las NP ¹³.

Las conjugaciones covalentes, a su vez, son más estables y originan materiales con diferentes perfiles de seguridad / toxicidad. En este tipo de conjugación, la reacción más utilizada es la carbodiimida, que origina un grupo amida mediante la conjugación de los grupos terminales carboxílicos del PLGA y los grupos terminales amina de los ligandos. Además de permitir la conjugación covalente de proteínas / anticuerpos como ligandos, la reacción de acoplamiento de carbodiimida se usa particularmente para funcionalizar NP de PLGA-PEG. Si se necesitan otros grupos funcionales distintos a los carboxílicos para unir los ligandos a las NP, se pueden usar enlazadores que generen esos grupos funcionales ¹³.

Por lo tanto, se puede decir que la técnica de conjugación química es favorable para la penetración del fármaco al cerebro, sin embargo, debe tenerse en cuenta la naturaleza del enlace químico ¹³.

La absorción por las células blanco de NP de PLGA modificadas superficialmente, se puede describir a través de varios mecanismos de endocitosis, como son: endocitosis mediada por receptores, transportadores y adsorción (**Figura 14**). El aumento de la captación celular de NP puede observarse utilizando estos mecanismos de endocitosis y, por lo tanto, considerarse como estrategias de liberación dirigida de fármacos. El tamaño, la forma, la carga superficial, la hidrofiliidad / hidrofobicidad y la elasticidad de las partículas, así como el tipo de célula a la que van dirigidas, pueden afectar y determinar la vía y la eficiencia de la endocitosis. Se ha reportado, que se requieren partículas con un tamaño de 10–100 nm para poder ingresar a las vesículas endocíticas y que partículas más pequeñas se ven beneficiadas para su rápida entrada celular ¹⁴.

Para poder determinar si la NP-ligando está cruzando BBB, existen varios métodos, entre ellos: parámetros farmacocinéticos, autorradiografía cuantitativa, resolución espacial de tomografía computarizada de un solo fotón, resonancia magnética, tomografía por emisión de positrones y microdiálisis cerebral⁹.

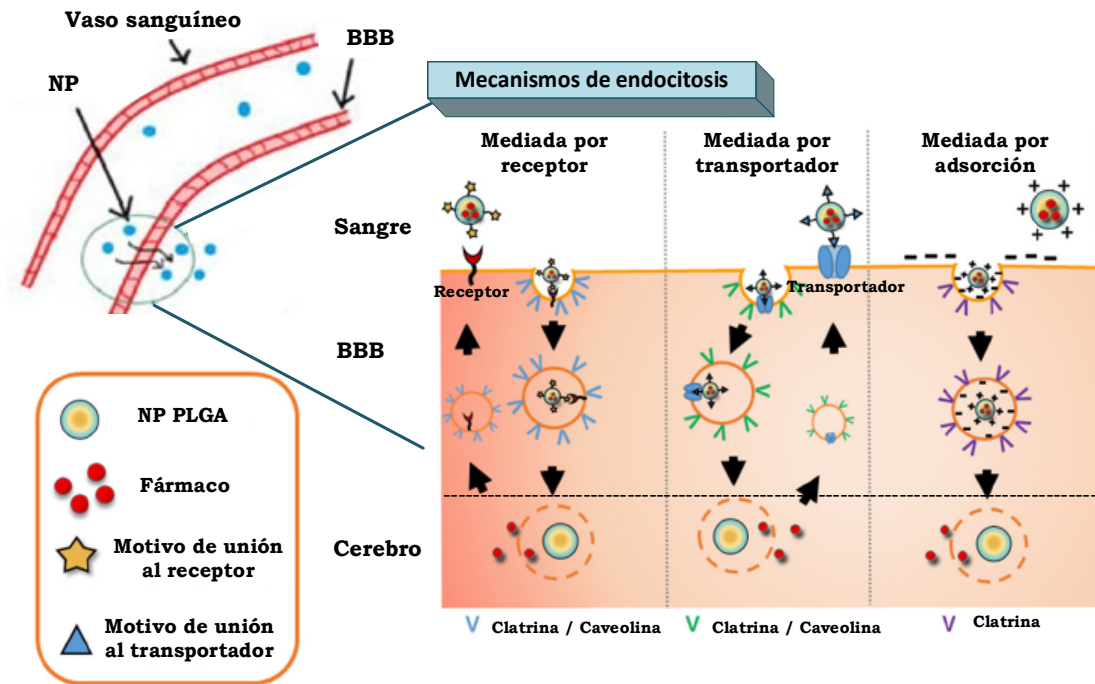


Figura 14. Mecanismos de endocitosis de NP de PLGA modificadas superficialmente. Imagen modificada de: Kim, K., Lee, J., Kim, D. & Yoon, I. Recent Progress in the Development of Poly (lactic- co -glycolic acid) -Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy¹⁴.

5.9.2.1 Endocitosis mediada por receptor.

La mayoría de las NP que transportan agentes antitumorales, incluidos las NP de PLGA, pueden internalizarse por endocitosis en las células tumorales. En la endocitosis mediada por receptor, las NP pueden internalizarse de manera eficiente en las células, mediante la unión específica de restos de direccionamiento anclados en las NP de PLGA, y los receptores correspondientes expresados en la membrana de las células tumorales o en las vasculaturas tumorales (**Figura 14**)¹⁴.

La clatrina y la caveolina son moléculas endógenas presentes en el citosol, que participan en la endocitosis mediada por receptores. Cuando las NP conjugadas con restos de direccionamiento interactúan con el receptor, cada molécula de clatrina o caveolina migra del citosol a la membrana celular, abarcando los complejos ligando-receptor y contribuyendo a la producción de vesículas recubiertas de clatrina, o caveosomas que contienen los complejos. La endocitosis dependiente de clatrina es una ruta representativa de entrada en las células de mamíferos, en donde la clatrina de recubrimiento se puede despegar antes de la fusión con endosomas tempranos y así, las NP pueden alcanzar los lisosomas a través de la ruta endo-lisosómica. Por el contrario, en la endocitosis dependiente de caveolina, las NP pueden internalizarse en forma de caveosoma, lo que puede evitar la fusión con los lisosomas y prevenir la degradación lisosómica ¹⁴.

A continuación, se hablará sobre algunos ligandos que se ha demostrado poseen un buen potencial para el direccionamiento cerebral de nanoportadores.

5.9.2.1.1 Transferrina (Tf).

La absorción celular de hierro de la Tf se inicia mediante la unión de la holotransferrina al receptor de Tf, seguido de endocitosis. Con base en esto, el ligando de Tf facilita la transcitosis de las NP a través de BBB, ya que estos receptores están altamente expresados en la superficie del cerebro. Sin embargo, debido a la alta disponibilidad de Tf en la circulación general, el uso de Tf administrada de manera exógena se ve obstaculizado. Estudios reportados en la literatura han evaluado el uso de NP de PLGA conjugadas con el ligando Tf, encontrando una localización cerebral significativa del fármaco después de la administración intravenosa, lo que indica que Tf es un ligando eficiente para atravesar BBB⁹.

Otro miembro importante de la familia Tf es OX26, un anticuerpo monoclonal anti-receptor de Tf de rata, que se une a un epítipo del receptor de Tf, por lo tanto, no compite por el sitio de unión con la Tf. Es uno de los miembros de la familia Tf más explotado debido a su tasa de éxito en el direccionamiento cerebral ⁹.

Por otro lado, la lactoferrina (Lf) es otra glucoproteína catiónica de unión al hierro que pertenece a la familia Tf, y presenta una actividad superior a la Tf y a OX26. En un estudio para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, desarrollaron NP conjugadas con Lf de urocortina. Los resultados establecieron que estas NP-Lf tenían una acumulación cerebral superior, junto con protección contra la pérdida de neurotransmisores. Demostrando que las NP unidas a Lf, tienen una eficiencia de transporte superior a través de BBB en comparación con las NP no conjugadas. De este modo, se puede afirmar que la transcitosis mediada por receptor de NP conjugadas con Lf, a través de las células endoteliales cerebrales se puede utilizar para administrar medicamentos al cerebro ⁹.

En otro estudio se desarrollaron NP de PLGA cargadas con Tramadol, un analgésico opioide sintético de acción central empleado para aliviar el dolor moderado a severo¹⁰. Utilizando los ligandos Tf y Lf con la finalidad de comparar la capacidad de direccionamiento cerebral de ambas, obteniendo como resultado, un incremento de dicha capacidad de 2.38 veces con Tf y 3.85 con Lf ⁹.

5.9.2.1.2 Apolipoproteína E (Apo E).

La apolipoproteína E (Apo E) es una proteína plasmática constituyente de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de alta densidad (HDL). Los tres alelos más comunes del gen de Apo E son $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, los cuales producen tres isoformas de la proteína, llamadas E2, E3 y E4. Esta proteína tiene como función mantener la estructura y regular el metabolismo de las lipoproteínas, así como ayudar en el transporte de colesterol y otros lípidos a través de BBB. El complejo NP-lipoproteína, es de gran utilidad debido a la selectividad de Apo E en receptores específicos presentes en BBB. La Apo E interactúa con los receptores de lipoproteínas (LRP- Proteína Relacionada con el Receptor) o receptores ApoE y los receptores de lipoproteínas de baja densidad (receptores LDL) ¹¹. Cuando las lipoproteínas se unen al receptor, comienza la captación y degradación de lípidos por parte de la célula, lo que permite la utilización del colesterol contenido en las lipoproteínas, produciéndose una autorregulación intracelular ⁹.

Se llevaron a cabo estudios utilizando NP de polibutilcianoacrilato recubiertas con polisorbato 80 y conjugadas con Apo E, mostrando un transporte mejorado a través de BBB *in vivo* en modelos animales ⁹.

5.9.2.1.3 CRM197.

CRM197 es un vector potente para el direccionamiento cerebral, se trata de una forma mutada de la toxina diftérica que no tiene capacidad proteolítica, pero puede unirse al factor de crecimiento epidemídico de unión a heparina. Estudios demostraron un aumento en la expresión de la proteína caveolina 1 en el cerebro, debido a CRM197 aumentando así mismo, su permeabilidad en BBB. Los receptores CRM197 se expresan abundantemente en BBB, neuronas y células gliales que están sobre-reguladas en ciertos trastornos neurológicos. Por lo tanto, son funcionales para mejorar la permeabilidad en BBB de ciertos agentes terapéuticos ⁹.

5.9.2.2 Endocitosis mediada por transportadores.

Los nutrientes óptimos requeridos por el cerebro son suministrados por la sangre, sin embargo, existen una serie de mecanismos de transporte que podrían estar dirigidos a una mayor absorción cerebral de nutrientes de elección ⁹. Algunas moléculas hidrofílicas, como los aminoácidos, péptidos, monoaminas y la glucosa, pueden utilizarse como componentes básicos y fuentes de energía para las células. Éstos, generalmente son reconocidos selectivamente y se transportan activamente a través de la interacción con proteínas transportadoras, expresadas en la membrana celular. Las células tumorales requieren altos niveles de energía y componentes básicos para su crecimiento rápido anormal y, por lo tanto, sobreexpresan esas proteínas transportadoras, incluidos los transportadores de hexosa y aminoácidos ¹⁴.

5.9.2.2.1 Transportadores de glucosa (GLUT).

Las NP de PLGA modificadas superficialmente con glucosa, se pueden unir específicamente al transportador de glucosa GLUT1, presente principalmente en la superficie luminal de los capilares cerebrales junto con el plexo coroideo, seguido de la internalización celular a través del mecanismo de endocitosis mediada por transportador ¹⁴.

Un ejemplo de aplicación de este transportador es el desarrollo de NP de PLGA recubiertas de glucosa, para ingresar selectivamente a astrocitos, y así cruzar el endotelio cerebral. Empleado un nuevo sistema de cocultivo tridimensional, que consta de astrocitos humanos primarios y una línea celular endotelial cerebral hCMEC / D3; se estableció que las NP recubiertas de glucosa navegaban por el endotelio, se movían a través de la matriz extracelular y se localizaban en los astrocitos ⁹.

5.9.2.2 Transportadores de glutatión (GSH).

Son de naturaleza antioxidante, altamente expresados en BBB. NP de PLGA se conjugaron con glutatión y fueron cargadas con paclitaxel mostrando resultados notables al inhibir el desarrollo de un modelo celular de glioma de rata *in vitro*, y adicionalmente traslocar BBB en modelos *in vivo*, dificultando el crecimiento de las células de glioma ⁹.

5.9.2.3 Endocitosis mediada por adsorción.

Debido a que la superficie de las membranas celulares a pH fisiológico tiene carga negativa, este mecanismo de transporte se basa en la interacción que ocurren entre la carga negativa de la BBB y las NP cargadas positivamente, para promover la adsorción de éstas en las células blanco.⁹ Las NP de PLGA no funcionalizadas tienen una carga superficial negativa debido a la estructura del polímero PLGA, lo que resulta en una menor penetración en las células blanco, debido a la repulsión electrostática existente. Por lo tanto, las NP funcionalizadas con un polímero catiónico como el quitosano y péptidos penetrantes de células (CPP) (p. ej. la penetratina, el péptido TAT del Virus de la Inmunodeficiencia Humana, etc.) pueden penetrar fácilmente las células blanco mediante endocitosis mediada por adsorción ¹⁴.

5.9.2.3.1 Lectinas.

Siendo que las lectinas son proteínas de unión a azúcares altamente específicas, debido a que poseen restos glicosilados, la razón detrás de su uso, radica en el hecho de que las proteínas de la superficie celular están glicosiladas. Adicionalmente, desempeñan un papel importante en fenómenos de reconocimiento biológico que involucran células y proteínas ¹².

Los diferentes tipos de células expresan diferentes glicanos, especialmente en situaciones de enfermedad, variando en comparación con la condición normal. Por lo tanto, las lectinas con base a su especificidad podrían usarse como ligandos dirigidos ¹². Las lectinas son útiles en el tratamiento para tumores cerebrales primarios malignos, es decir, glioblastomas multiformes, un ejemplo de este tratamiento es la odorranalectina, que al ser conjugada con NP de PLGA PEGiladas, proporciona un transporte cerebral eficiente a través de la ruta intranasal ⁹.

Otros ejemplos de lectinas con aplicación farmacéutica son: la aglutinina de germen de trigo (WGA), la lectina de tomate, la lectina de tojo y la concanavalina A. WGA es la más utilizada debido a sus bajas propiedades inmunogénicas ¹².

La aglutinina de *Triticum vulgare* también llamada aglutinina del germen de trigo, es una lectina utilizada para el direccionamiento a BBB. WGA se puede conjugar a la superficie de NP de PLGA mediante la estrategia de carbodiimida (conjugación de grupos amino de la proteína con los grupos carboxilo de PLGA) ¹². WGA se considera candidata ideal para portadores de fármacos dirigidos a BBB, debido a su alta afinidad por el endotelio capilar cerebral y baja citotoxicidad. En un estudio se prepararon nanopartículas de PLGA cargadas con paclitaxel, cuya superficie se conjugó con WGA. El resultado mostró una captación cerebral mejorada, baja toxicidad, y la posibilidad de potenciar el alcance y la selectividad de la actividad anticancerígena. La especificidad de WGA hacia N-acetil-D-glucosamina y el ácido siálico presentes en cavidad nasal, la convirtieron en la lectina ideal para el direccionamiento cerebral por vía nasal, mostrando una toxicidad ciliar mínima ⁹.

5.9.2.3.2 Péptidos penetrantes de células (CPP).

Los CPP son transportadores por excelencia, y un punto de tendencia en el ámbito médico, ya que han sido ampliamente estudiados para establecer su eficiencia en el direccionamiento cerebral. Como ejemplo de aplicación, se encuentra un estudio en el que se utilizó penetratina, un péptido derivado de la proteína Antennapedia proveniente de *Drosophila*, incorporándola a las NP de PLGA. Dicha formulación, fue marcada fluorescentemente con cumarina-6 ⁹.

Observando un aumento en la fluorescencia en el cerebro del roedor administrado con NP conjugadas con penetratina. Del mismo modo, la penetratina, un CPP, ha sido utilizada para administrar insulina por vía intranasal, presentando una permeabilidad a través de las células epiteliales nasales mejorada ⁹.

Otro CPP utilizado en sistemas de liberación, es el péptido TAT del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Dicho CPP fue conjugado con NP de ritonavir, mostrando un nivel de fármaco aproximadamente 800 veces mayor en el cerebro en comparación con la administración del fármaco libre. Demostrando así, que las NP poliméricas conjugadas con TAT, se movilizan primero en las vasculaturas cerebrales, desde donde se transportan al parénquima cerebral donde ejercen su efecto ⁹.

A continuación, se presenta ejemplos de algunos ligandos utilizados en NP de PLGA para favorecer el direccionamiento cerebral, así como sus pros y contras.

Tabla 4. Pros, contras y aplicabilidad de ligandos de direccionamiento cerebral más utilizados.

Ligando	Pros	Contras	Aplicabilidad
Transferrina	Abundancia relativa en las células endoteliales de BBB	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración alta de transferrina endógena • Posibilidad de sobredosis con hierro 	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación de moléculas pequeñas y proteínas terapéuticas
Melanotransferrina	<ul style="list-style-type: none"> • Unión de baja afinidad al receptor • Alta capacidad de transporte • Baja concentración plasmática endógena de melanotransferrina 	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño voluminoso de la proteína • Grandes cantidades para obtener el resultado deseado 	<ul style="list-style-type: none"> • Agentes quimioterapéuticos
Insulina	<ul style="list-style-type: none"> • Efectos positivos en aprendizaje y memoria • Se requiere desregulación de la insulina en desórdenes neurológicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Vida media corta en suero • Insulina administrada de manera exógena puede causar hipoglucemia 	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación de moléculas pequeñas y proteínas terapéuticas
CPP	<ul style="list-style-type: none"> • Independiente del tipo de célula • Capacidad de cruzar varias barreras biológicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Carece de especificidad para el transporte a través de BCB 	<ul style="list-style-type: none"> • Agentes quimioterapéuticos • Suministro de proteínas

Barrera sangre- líquido cefalorraquídeo (BCB).

Tabla modificada de: Nabi, B., Rehman, S., Khan, S., Baboota, S. & Ali, J. Ligand conjugation: An emerging platform for enhanced brain drug delivery. Brain Res. Bull. 142, 384–393 (2018) ⁹.

Para cerrar esta sección, a continuación, se presenta una tabla de modificadores superficiales de NP de PLGA y su mecanismo de endocitosis asociado.

Tabla 5. Tipo de endocitosis de ejemplos de funcionalizadores de NP de PLGA.

Funcionalizadores	Diámetro medio (nm)	Tipo de endocitosis
Aptámero AS1411	128	Endocitosis mediada por receptor (nucleolina)
Anticuerpos CD44	140	Endocitosis mediada por receptor (CD44)
L-carnitina	189	Endocitosis mediada por transportadores (OCTN2)
Estearato de glutamato-polioxietileno	152-181	Endocitosis mediada por transportadores (LAT1)
Quitosano	140-173	Endocitosis mediada por adsorción
PEG-VIH-TAT	97-176	Endocitosis mediada por adsorción
Péptido rico en arginina	156	Endocitosis mediada por adsorción

Transportador de catión/carnitina orgánica 2 (OCTN2); transportador de aminoácidos largos 1 (LAT1); polietilenglicol (PEG); virus de inmunodeficiencia humana (VIH); transactivador de transcripción (TAT).

Tabla modificada de: Kim, K., Lee, J., Kim, D. & Yoon, I. Recent Progress in the Development of Poly (lactic- co -glycolic acid) -Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy ¹⁴.

5.10 Visualización del direccionamiento de NP de PLGA mediante imágenes *in vivo*.

Para monitorear la capacidad de direccionamiento de las NP de PLGA *in vivo*, se puede introducir un agente de imagen adecuado en las NP (**Figura 15**). De este modo, es posible monitorear en tiempo real el patrón de biodistribución de las NP en el cuerpo sin necesidad de sacrificar animales experimentales ¹⁴.

Los agentes de imagen pueden unirse al esqueleto del PLGA (antes de la fabricación de las NP) o a la superficie externa de las mismas (después de la fabricación). Debido a que los productos comerciales de PLGA poseen un ácido carboxílico o un grupo terminal éster, pueden usarse para generar enlaces covalentes con los grupos funcionales del agente de formación de imágenes. Por ejemplo, los grupos amina o hidroxilo en el agente de formación de imágenes, pueden formar directamente un enlace amida o éster con el grupo terminal de ácido carboxílico del PLGA ¹⁴.

El generador de imagen también se puede unir a los grupos funcionales (p. ej. grupo amina) de los derivados de PLGA o bien, se pueden utilizar enlazadores apropiados (p. ej. enlazador de PEG bifuncional) para conectar el agente de imagen y el PLGA. Además, los grupos funcionales expuestos de la superficie externa de las NP de PLGA, pueden participar en la reacción con el generador de imagen; después de fabricar las NP, la superficie exterior de éstas puede recubrirse con el agente de formación de imágenes mediante adsorción. La unión covalente entre PLGA (o NP de PLGA) y un agente de imagen, puede reducir la pérdida del agente de imagen antes de la localización del sitio blanco por la NP, posterior a la inyección. Por otro lado, los agentes de imagen también pueden introducirse físicamente en las NP de PLGA. Sin embargo, esto puede propiciar, una liberación inicial del agente de imagen después de la inyección en el torrente sanguíneo y reducir la eficacia de la visualización de los sitios objetivo. Junto con la solubilización del PLGA en la fase orgánica, se pueden agregar varios agentes de imagen a los solventes orgánicos (p. ej. acetona, cloroformo, diclorometano, DMSO y etanol) durante la fabricación de NP. Para encapsular un agente de imagen en NP de PLGA, la eficiencia de encapsulación de fármacos y la tasa de liberación deben evaluarse antes de la aplicación para la obtención de imágenes *in vivo* ¹⁴.

En cuanto a las técnicas de visualización, para resonancia magnética (MR), se han cargado en NP de PLGA en general, derivados de gadolinio (Gd) o NP de óxido de hierro (Fe₃O₄) para mejorar el contraste. El yoduro de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'tetrametilindotricarbocianina (DiR) se ha utilizado ampliamente para la obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo*. Recientemente, se han realizado varios estudios utilizando imágenes de fluorescencia de infrarrojo cercano (NIRF), durante el desarrollo de nanoformulaciones, debido a su penetración más profunda en los tejidos y a una menor propiedad de dispersión en tejidos que las imágenes de fluorescencia. En NIRF, se pueden introducir varios tipos de moléculas de fluorescencia (p. ej. Cy5.5, Cy7, protoporfirina IX [PpIX] y verde de indocianina [ICG]) en NP de PLGA. Para el diagnóstico por ultrasonido (US), se pueden incorporar agentes generadores de burbujas (p. ej. perfluorohexano [PFH]) en las NP de PLGA. En tomografía computarizada (CT), varios agentes de contraste (p. ej. derivados de yodo y nanoestructuras de oro) pueden encapsularse en las NP de PLGA o recubrir con ellos la superficie externa de las NP ¹⁴.

Aspectos importantes que se deben tomar en cuenta al añadir un agente de imagen a las NP son los siguiente: antes aplicar el agente de imagen para la visualización *in vivo*, se debe determinar la dosis apropiada para visualizar el sitio blanco. Además, la modificación química o la carga física de los agentes de imagen no deberán afectar las biofunciones intrínsecas de las NP de PLGA, incluida la liberación de fármacos, la unión celular y la actividad terapéutica de los fármacos *in vitro* / *in vivo* ¹⁴.

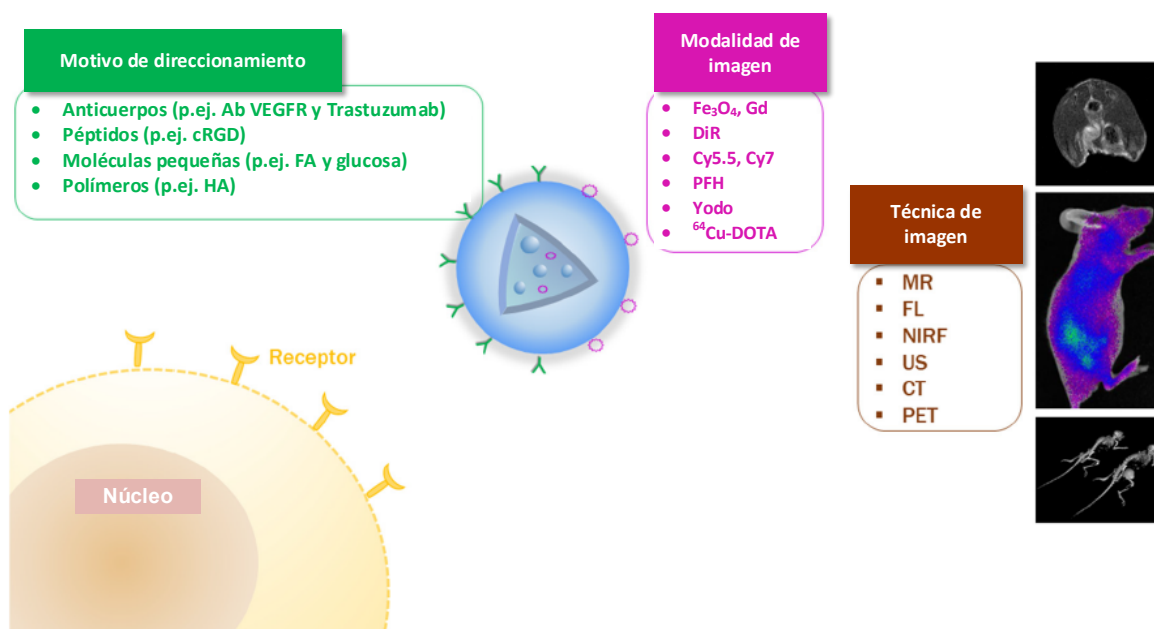


Figura 15. Evaluación de la eficacia del direccionamiento de NP de PLGA mediante técnicas de imagen *in vivo*.

Anticuerpo (Ab); tomografía computarizada (CT); Arg-Gly-Asp cíclico (cRGD); fluorescencia (FL); ácido fólico (FA); gadolinio (Gd); ácido hialurónico (HA); resonancia magnética (MR); fluorescencia de infrarrojo cercano (NIRF); perfluorohexano (PFH); tomografía por emisión de positrones (PET); 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-ácido tetraacético (DOTA); ultrasonido (US); receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR); yoduro de 1,1'-dioctadecil-3,3,3', 3'-tetrametilindotricarbocianina (DiR).

Imagen modificada de: Kim, K., Lee, J., Kim, D. & Yoon, I. Recent Progress in the Development of Poly (lactic- co -glycolic acid) -Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy ¹⁴.

Un ejemplo de aplicación, de estas técnicas de visualización *in vivo*, es un estudio en dónde se fabricaron NP de PLGA dirigidas a HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, sobreexpresado en cáncer de mama), en ellas se incluyó PFH, paclitaxel (PTX) y óxido de hierro superparamagnético (SPIO). Herceptin (Trastuzumab, anticuerpo monoclonal humanizado que se une selectivamente con alta afinidad al dominio extracelular de HER2) se conjugó con la superficie externa de las NP de PLGA para direccionarlas al receptor HER2. SPIO y PFH se incluyeron en las NP para la obtención de imágenes mediante (fotoacústica) PA y US, respectivamente. SPIO puede convertir la luz externa del infrarrojo cercano (NIR) en energía térmica y, por lo tanto, puede utilizarse para la ablación fototérmica de tumores. Posteriormente se puede combinar con los efectos quimioterapéuticos del PTX para el tratamiento de cáncer de seno. La eficacia del direccionamiento de las NP modificadas con Herceptin al tumor, se evaluó mediante la técnica de imagen bimodal PA / US en un modelo de ratón con tumor de xenoinjerto SKBR-3 ¹⁹. Bajo irradiación con láser de NIR, las NP modificadas con Herceptin que contenían PHF, PTX y SPIO, mostraron una inhibición superior del crecimiento tumoral basada en la sinergia de la fototermia y la eficacia quimioterapéutica ¹⁴.

6. Ejemplos de aplicaciones de NP de PLGA para el direccionamiento cerebral.

6.1 Nanopartículas de PLGA-Quitosano cargadas con análogos de hormona liberadora de tirotropina (antiepilépticas).

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más comunes, que afecta a aproximadamente 50 millones de personas en todo el mundo. Existen varios fármacos antiepilépticos (FAE) exitosos disponibles en el mercado, pero el problema surge cuando la epilepsia se vuelve intratable en muchos pacientes, lo que significa que los FAE convencionales no logran disminuir o eliminar las convulsiones. Esta situación de epilepsia intratable es común en 20-30% de los pacientes. Además, la tolerabilidad, las propiedades farmacocinéticas y la toxicidad de los fármacos existentes también limitan su eficacia. Esto ha creado la necesidad, además del descubrimiento de nuevos FAE, el mejoramiento de los métodos de administración para una mejor absorción de estos agentes antiepilépticos logrando así una mayor eficacia y reducción de los regímenes de dosificación ²⁰.

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un tripéptido amida simple que controla la homeostasis tiroidea y el funcionamiento de la prolactina. Tiene como fórmula molecular L-pGlu-L-His-L-Pro-NH₂ (**Figura 16**) y es sintetizada en el hipotálamo. Se han informado investigaciones farmacológicas donde se muestra que TRH y sus análogos pueden desempeñar un papel importante en la epilepsia, ya que modelos animales de epilepsia y sujetos clínicos han demostrado un aumento de los niveles de mRNA prepro-TRH y péptidos, lo que sugiere el potencial terapéutico de los análogos de TRH y TRH en el tratamiento de la epilepsia. La TRH funciona principalmente a través de sus dos receptores, TRH-R1 y TRH-R2, que están ampliamente distribuidos en el cerebro. TRH-R1 se considera responsable de la actividad hormonal de TRH (es decir, mediante la liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), mientras que TRH-R2 se considera responsable de sus funciones selectivas del sistema nervioso central (SNC). La selectividad de TRH-R2 se considera una característica deseable para los análogos de TRH antiepilépticos, ya que promete reducir los efectos secundarios hormonales ²⁰.

Recientemente, se han notificado análogos de TRH, en los que el residuo de histidina central está sustituido en la posición C-2 o N-1 del anillo de imidazol con grupos alquilo de tamaño variable, con selectividad efectiva al SNC. Entre estos, un análogo de TRH [L-pGlu- (1-bencilo) –L-His – L-ProNH₂, (NP-355), (**Figura 16**)], en el que la posición N-1 de histidina se sustituye con el grupo bencilo, ha sido investigado por su potencial antiepiléptico con resultados notables hacia varios modelos animales de convulsiones y por su capacidad de unión a TRH-2, ya que es cuatro veces más selectivo hacia éste que hacia TRH-R1. Se ha demostrado que NP-355 retrasa y reduce significativamente la aparición y frecuencia de convulsiones inducidas por pentilinetetrazol (PTZ). También se ha encontrado que protege contra las convulsiones inducidas por picrotoxina y ácido kaínico sin alterar la presión arterial media o cualquier efecto indeseable. Otro análogo de TRH, L-pGlu- (2-propil) –L-His – L-ProNH₂ (NP-647) (**Figura 16**), ha mostrado resultados muy prometedores en términos de actividad antiepiléptica y también se ha encontrado que tiene buen comportamiento/perfil de seguridad en intervenciones farmacológicas. También se ha demostrado que el pretratamiento intravenoso con NP-647 retrasa significativamente la aparición de convulsiones y reduce su frecuencia en el modelo de PTZ ²⁰.

A pesar de las ventajas anteriormente mencionadas, la TRH y sus análogos presentan como principales limitaciones una vida media corta y poca capacidad de penetración en BBB, lo que genera baja biodisponibilidad. Como se mencionó en capítulos anteriores, BBB es prácticamente impermeable a la difusión pasiva de sustancias ²⁰.

En este estudio se sintetizaron NP-355 y NP-647 encapsulándolos en NP de PLGA (75:25), con recubrimiento superficial de quitosano vía interacción electrostática, proponiendo el desarrollo de un sistema de liberación sostenida para estos neuropéptidos, que puede ser administrado directamente desde la nariz al cerebro utilizando canales nerviosos olfativos, empleando NP de PLGA cargadas con marcadores fluorescentes (puntos cuánticos) para probar el éxito del transporte intranasal ²⁰.

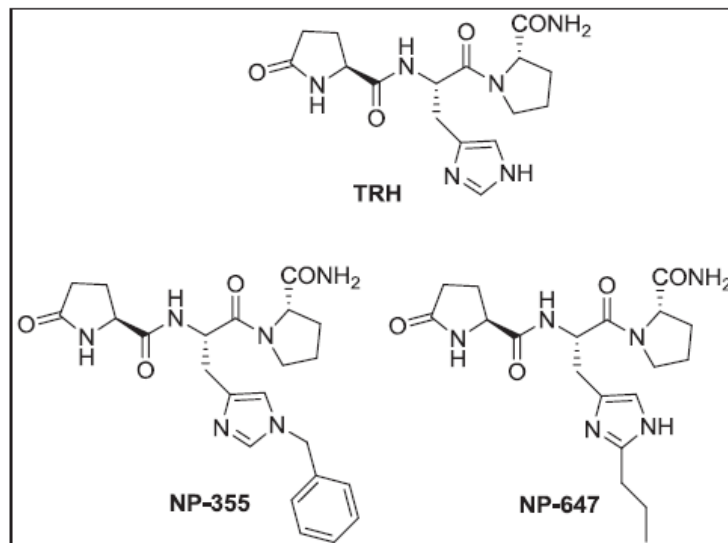


Figura 16. Estructuras químicas de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y análogos NP-355 y NP-647.

Imagen modificada de: Kaur, S., Manhas, P., Swami, A., Bhandari, R. & Sharma, K. K. Bioengineered PLGA-chitosan nanoparticles for brain targeted intranasal delivery of antiepileptic TRH analogues. *Chem. Eng. J.* **346**, 630–639 (2018) ²⁰.

Los análogos de TRH NP-355 y NP-647 se sintetizaron mediante la metodología de síntesis de péptidos en disolución (**Figura 17**), la cual involucra la adición de reactivos a las disoluciones de cadenas de péptido en crecimiento y la purificación de los productos conforme se necesite ^{20,21}.

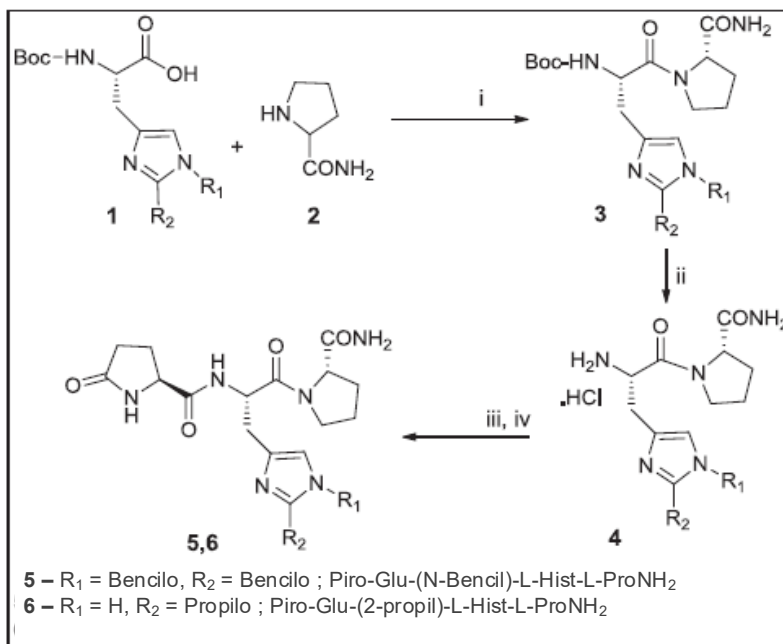


Figura 17. Reactivos y condiciones de reacción para la síntesis de los análogos de TRH NP-355 y NP-647: **i)** N,N'-diisopropilcarbodiimida, n-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida, dimetilformamida, radiación MW (sistema de reacción de microondas Anton Paar SOLV Multiwave Pro), 50°C, 40 W, 28 min, **ii)** HCl metanólico 6 N, **iii)** N,N-diisopropiletilamina, **iv)** p-glu-OH, 1-[bis (dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b] piridinio 3-óxido hexafluorofosfato, 1-hidroxi-7-azabenzotriazol, N,N-diisopropiletilamina, dimetilformamida, radiación MW, 50°C, 40 W, 28 min.

Imagen modificada de: Kaur, S., Manhas, P., Swami, A., Bhandari, R. & Sharma, K. K. Bioengineered PLGA-chitosan nanoparticles for brain targeted intranasal delivery of antiepileptic TRH analogues. *Chem. Eng. J.* **346**, 630–639 (2018) ²⁰.

Se sintetizaron tres tipos de NP de PLGA recubiertas con quitosano:

- a) NP cargadas con fármaco (NP-355 y NP-647)
- b) NP vacías (control)
- c) NP cargadas con puntos cuánticos

Las NP vacías fueron sintetizadas por el método emulsión única (O/W) evaporación de solvente, mientras que las NP cargadas con fármaco y puntos cuánticos se sintetizaron mediante el método de emulsión doble (W/O/W) evaporación de solvente ²⁰.

La NP sintetizadas se caracterizaron en los siguientes aspectos:

- **Tamaño de partícula y potencial Z.**

El análisis del diámetro hidrodinámico de las NP se realizó utilizando dispersión dinámica de luz (DLS) empleando un Zetasizer Malvern Nano, controlado por el software Zetasizer v6.01.

El potencial Z de las NP sintetizadas fue determinado por el instrumento Beckmann Coulter Delsa™ Nano²⁰.

- **Tamaño y morfología.**

El tamaño absoluto de las NP y la morfología fueron determinados por microscopía electrónica de transmisión (MET)²⁰.

- **Confirmación de la composición de NP.**

Se realizó la identificación de quitosano, PLGA, quitosano-PLGA-NP-355 NP y quitosano-PLGA-NP-647 NP mediante la técnica de Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR). Ya que proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, permitiendo realizar una identificación de los materiales²⁰.

- **Cuantificación de fármaco.**

La cuantificación del fármaco se realizó en fase acuosa mediante Cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa (RP-HPLC) usando elución en modo gradiente²⁰.

- **Eficiencia de encapsulación y carga de fármaco.**

El análisis de la eficiencia de encapsulación y la carga de fármaco de las NP se realizó utilizando el método de HPLC optimizado, donde en primera instancia las NP fueron centrifugadas para recoger el sobrenadante y el sedimento por separado. La concentración del fármaco no atrapado presente en el sobrenadante se analizó utilizando el método de HPLC²⁰.

- **Perfil de liberación del fármaco:**

La liberación del fármaco a partir de las NP se evaluó colocando una cantidad predeterminada de NP liofilizadas o fármaco libre en la membrana de un tubo de diálisis, empleando HPLC como herramienta de monitoreo. Se evaluará la liberación del fármaco en tampón fosfato salino (PBS) mantenido a un pH fisiológico de 7.4 y una temperatura de $37,0 \pm 1$ °C para simular la liberación del fármaco en el espacio extracelular o en el citoplasma ²⁰.

- **Estabilidad de las NP.**

Para determinar la vida útil de las NP sintetizadas, se almacenaron a 4 °C en forma liofilizada. Para evaluar la estabilidad se determinó la distribución del tamaño de las NP en intervalos regulares durante una semana usando DLS ²⁰.

- **Estudios de toxicidad *in vitro*.**

La citotoxicidad *in vitro* de las NP sintetizadas fue evaluado por el ensayo MTT en la línea celular HaCaT (queratinocito humano). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado azul (formazan), permitiendo determinar la viabilidad de las células tratadas. HaCaT es una línea celular de queratinocitos inmortales aneuploides transformados espontáneamente obtenida de piel humana adulta ²⁰.

- **Estudios *in vivo*.**

Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley (SD) de 250–300 g y ratones macho Balb/c con un peso de 25-35 g. Se mantuvieron en condiciones ambientales normales con suministro de una dieta estándar de pellets y agua *ad libitum* ²⁰.

- **Evaluación de cruce de BBB.**

Para comprobar la capacidad de las NP para atravesar membrana nasal y BBB, se utilizaron NP de PLGA cargadas con puntos cuánticos fluorescentes CdTe/CdS y puntos cuánticos libres. Las ratas SD con un peso de 200–250 g se dividieron en 4 secciones de 3 animales cada una ²⁰.

Todos los animales fueron administrados con 20 μL de solución de las NP a evaluar o de puntos cuánticos a través de la ruta nasal. La sección de ratas control solo recibió solución buffer salina a pH 7.2. Las NP también se dispersaron en una solución tampón de NaCl al 0.9%. Después de un intervalo fijo de tiempo, se sacrificaron 3 animales, tomando uno de cada sección empleando éter dietílico. La sangre se eliminó mediante perfusión cardíaca utilizando una jeringa estéril antes de extirpar el tejido cerebral. Los cerebros de los animales se aislaron mediante cirugía, se lavaron suavemente con PBS frío y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ²⁰.

- **Evaluación de fluorescencia.**

Los cerebros aislados intactos se dividieron en cerebelo, lóbulo izquierdo y lóbulo derecho. Se cortaron trozos de los tejidos cerebrales de espesor de 14 μm y fueron teñidos con DAPI (marcado fluorescente). Se visualizaron usando microscopía de fluorescencia a diferentes filtros de longitud de onda para imágenes de campo rojo, azul, verde y brillante ²⁰.

- **Evaluación antiepiléptica: convulsiones inducidas por Pentilenetrazol (PTZ).**

Los ratones macho Balb/c se dividieron en tres grupos con 5–6 ratones cada uno. Se empleó una administración intraperitoneal de PTZ (80 mg/kg) para inducir convulsiones clónicas. Los animales fueron tratados individualmente con formulaciones intranasales preparadas de nanopartículas NP-355/NP-647 (20 $\mu\text{mol/kg}$ en 20 μL) o solución salina estéril (20 μL) o NP-355/NP-647 sin encapsular (20 $\mu\text{mol/kg}$ en 20 μL). Las formulaciones de NP se administraron gota a gota en ambas fosas nasales, alternadamente, manteniendo al animal en posición dorsal. Después de 30 minutos, se administró solución de PTZ y se observaron a los ratones durante 30 minutos ²⁰.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que las NP cargadas con NP-355 y NP-647 modificadas superficialmente con quitosano para proporcionar propiedades mucoadhesivas, permitieron que el fármaco accediera directamente al cerebro a través de las vías neurales olfativa y trigémina ²⁰.

A partir de las imágenes microscópicas de fluorescencia, se observó que los puntos cuánticos libres no pudieron llegar al cerebro en un tiempo de 30 minutos a 2 horas (**Figura 18A**). Sin embargo, posterior a 4 horas, pequeños puntos fluorescentes se observaron en las muestras extirpadas ²⁰.

Lo que indica que incluso los puntos cuánticos solos pueden viajar a través de la ruta nasal y tomar aproximadamente 4 horas para llegar al cerebro. También se puede observar que los puntos cuánticos se distribuyeron de manera similar en los lóbulos izquierdo y derecho, y el cerebelo. Por otro lado, las NP de puntos cuánticos-PLGA-quitosano pudieron internalizarse en el cerebro posterior a 30 minutos de administración (**Figura 18B**). Observando un número creciente de NP fluorescentes después de 2 y 4 horas de internalización. Los resultados demuestran el efecto positivo de la cubierta polimérica y la modificación superficial con quitosano que proporciona propiedades mucoadhesivas a las NP llevando a una mayor retención y, por tanto, a una mejor internalización a través de la cavidad nasal ²⁰.

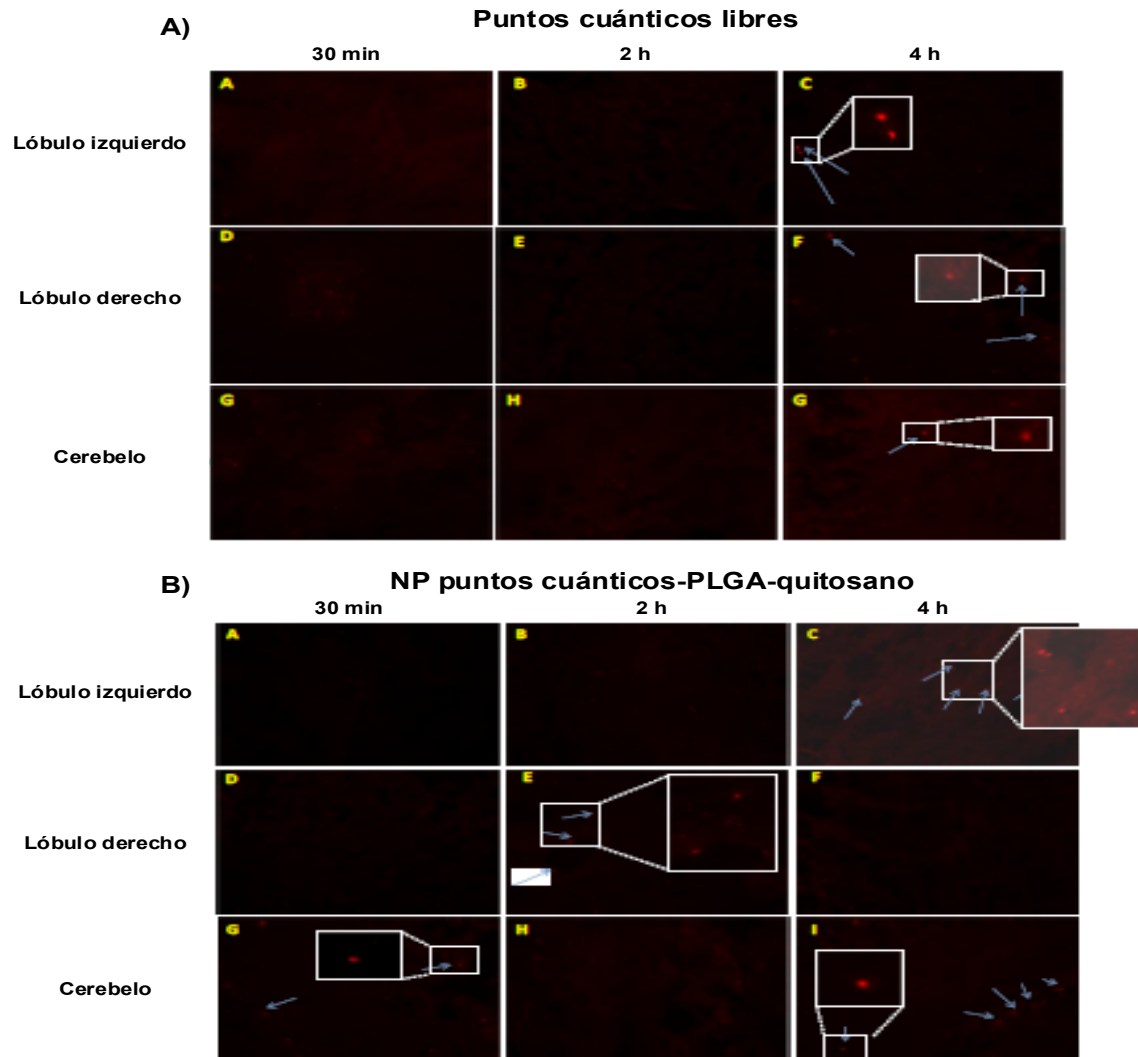


Figura 18. Evaluación del cruce de BBB mediante microscopía de fluorescencia de diferentes partes de cerebro de rata. (A) Partes cerebrales de rata administrada con puntos cuánticos libres y (B) Partes cerebrales de rata administrada con NP puntos cuánticos-PLGA-quitosano excitadas a 570 nm.

Imagen modificada de: Kaur, S., Manhas, P., Swami, A., Bhandari, R. & Sharma, K. K. Bioengineered PLGA-chitosan nanoparticles for brain targeted intranasal delivery of antiepileptic TRH analogues. *Chem. Eng. J.* **346**, 630–639 (2018) ²⁰.

En cuanto al efecto antiepiléptico estudiado en el modelo de convulsiones inducidas por PTZ, se observó que la encapsulación de NP-355 y NP-647 en las NP de PLGA recubiertas con quitosano, potenció su efecto antiepiléptico en comparación con el fármaco libre (**Tabla 6**), mostrando un comportamiento similar en la recuperación, con una mejora significativa posterior a la administración intranasal de las NP de NP-355 y NP-647 en comparación con NP-355 y NP-647 sin encapsular ²⁰.

Tanto las NP de NP-355 como de NP-647 produjeron efectos antiepilépticos similares (**Tabla 6**). Estos resultados comprueban que las NP evaluadas suministran eficientemente NP-355 y NP-647 desde la nariz al cerebro y son un enfoque terapéutico potencial para el tratamiento de la epilepsia. La administración intranasal de estas NP puede ser una ruta prometedora en pacientes epilépticos debido a su direccionamiento al cerebro y al inicio inmediato de la acción ²⁰.

Tabla 6. Efecto de los análogos de TRH NP-355 y NP-647 libres y de las NP de PLGA-quitosano cargadas con ellos en convulsiones inducidas por Pentilentetrazol.

Grupo	Inicio del espasmo (s)	Inicio de convulsiones clónicas (s)	Duración de convulsiones clónicas (s)	Inicio extensor (s)	Duración extensor (s)	% De recuperación (n/N)
PTZ+Solución salina	93.4 ± 13	160.2 ± 20	528 ± 136	91.5 ± 23.58	568.4 ± 36.5	20%(1/5)
NP libres	144.76 ± 55.0	67.2 ± 6.52	89.4 ± 39.53	323 ± 140	34 ± 2.88	20%(1/5)
PTZ+NP-355	87.3 ± 3.0*	123.2 ± 4.29*	460.1 ± 97.67*	286.8 ± 18.36*	86.29 ± 0.71*	20% (1/5)
PTZ+NP-647	76.26 ± 3.34*	111.2 ± 2.1*	488.76 ± 120.10*	325.01 ± 19.17*	91.72 ± 0.68*	40% (2/5)*
PTZ+NP-355 NPs	476.1 ± 24 ^{*,#}	240 ± 4.0 ^{*,#}	36.6 ± 8.25 ^{*,#}	525.33 ± 89.85 ^{*,#}	39.16 ± 9.5 ^{*,#}	33% (2/6) ^{*,#}
PTZ+NP-647 NPs	507.4 ± 6.5 ^{*,\$}	250 ± 2.41 ^{*,\$}	51.8 ± 13.03 ^{*,\$}	653.4 ± 49.67 ^{*,\$}	34.4 ± 3.14 ^{*,\$}	60% (3/5) ^{*,\$}

Ratones tratados con solución salina / NP PLGA-quitosano libres / NP PLGA-NP-355 / NP PLGA-NP-647 NP / NP-355 / NP-647, 30 min antes de la administración de PTZ (80 mg / Kg, intraperitoneal), observándolos durante 30 min. Los valores se expresan como media ± error estándar de la media (n = 5-6). (n / N) muestra el número de animales que mostraron protección completa / número de animales utilizados en el grupo. * p<0.05 en comparación con el grupo de solución salina; #p<0.05 en comparación con NP-355; \$p <0.05 en comparación con NP-647.

Tabla modificada de: Kaur, S., Manhas, P., Swami, A., Bhandari, R. & Sharma, K. K. Bioengineered PLGA-chitosan nanoparticles for brain targeted intranasal delivery of antiepileptic TRH analogues. *Chem. Eng. J.* **346**, 630–639 (2018) ²⁰.

6.2 Nanopartículas de PLGA-Colesterol en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

La Enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo de inicio adulto que se caracteriza por la pérdida celular, principalmente en el cuerpo estriado y la corteza, y es causada por una repetición anormal de tres bases de ADN (citosina, adenina y guanina) en el gen que codifica para la proteína huntingtina (htt). Entre otros, el htt mutante tiene efectos sobre las proteínas de unión al elemento regulador de esteroides, lo que resulta en niveles bajos de colesterol (Col) en las áreas afectadas del cerebro. El Col cerebral es completamente de origen endógeno (síntesis local) siendo el Col periférico incapaz de atravesar BBB. Por lo tanto, la reducción de la biosíntesis de Col en el cerebro en la EH es perjudicial para la función neuronal alterando estructura e integridad y la transmisión sináptica. El restablecimiento del nivel adecuado de Col en el cerebro aparece como un enfoque prometedor en el tratamiento de la EH donde actualmente no existen terapias efectivas ²².

Estudios recientes *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las NP de PLGA, modificadas superficialmente con el heptapéptido glicosilado g7 (H₂N-Gly-L-Phe-D-Thr-Gly-L-Phe-L-Leu-L-Ser(O-β-D-Glucosa)-CONH₂), pueden atravesar BBB de manera no invasiva. El g7-glucopéptido conjugado con la superficie de NP estimula las curvaturas de la membrana y sigue el proceso de endocitosis promoviendo el cruce de BBB. Además, cuando estas NP son cargadas con fármacos (g7-NP/Col) pueden suministrar Col al cerebro. En estudios anteriores se demostró que la administración sistémica repetida de g7-NP/Col rescató la comunicación sináptica, protegiendo del deterioro cognitivo y mejoró parcialmente la actividad global en ratones con EH. Así, estos resultados destacan el potencial de g7-NP/Col para restaurar la homeostasis de Col cerebral con efectos beneficiosos generales en la EH. Sin embargo, algunos inconvenientes deben ser superados, especialmente el bajo contenido de fármaco (menos del 1%), que obliga a una administración repetida y la acumulación sistémica de polímeros sintéticos. Para superar estas posibles limitaciones, en este estudio se investigó un enfoque diferente, diseñado específicamente para permitir la entrega de la dosis terapéutica de Col en el cerebro en un bajo número de administraciones para un mejor cumplimiento del paciente ²².

El cual consiste en desarrollar la formulación de NP híbridas (llamadas MIX NP) basadas en una combinación específica de polímero PLGA 50:50 y 0.38 dL/g de densidad inherente (g7-PLGA y PLGA) y Col ²².

Las NP compuestas por Col y PLGA (MIX-NP) se prepararon por dos métodos diferentes: nanoprecipitación (MIX-N) y emulsión única (MIX-EU) utilizando diferentes proporciones de Col: PLGA; 1:1 (MIX _a), 1:0.4 (MIX _b), 1: 0.25 (MIX _c) y 1: 0.1(MEZCLA _d). Del mismo modo se sintetizaron NP de PLGA por estos dos métodos (NP-N y NP-EU) ²².

Para la evaluación *in vitro* las MIX-NP fueron conjugadas con g7-glucopéptido empleando para ambos métodos la mezcla “a” (g7-MIX-N_a y g7-MIX-SE_a) utilizando una mezcla de Col (50%), PLGA (45%) y g7-PLGA (5%). Del mismo modo, para determinar la biodistribución de las MIX-NP, el colorante fluorescente Rodamina, ampliamente utilizado en estudios cerebrales fue añadido, empleando para ambos métodos de preparación de las NP la mezcla “a” (g7-(Rod)-MIX-N_a y g7- (Rod) -MIX-EU_a) utilizando una mezcla de Col (50%), PLGA (42.5%), g7-PLGA (5%) y Rod-PLGA (2.5%) ²².

La NP sintetizadas se caracterizaron en los siguientes aspectos:

- **Tamaño medio de partícula e índice de polidispersidad (IDP)**, se determinó usando un Zetasizer Nano ZS ²².
- **Potencial zeta**, se midió utilizando el equipo un Zetasizer Nano ZS con una combinación de velocimetría láser Doppler y análisis de fase de dispersión de luz ²².
- **Morfología** de las NP, se evaluó mediante microscopía de fuerza atómica ²².
- **Estructura/arquitectura interna** de las NP, fue analizada por microscopía electrónica de barrido ²².
- **Contenido de colesterol** en las MIX-NP, se cuantificó mediante RP-HPLC ²².

Con lo que respecta a los estudios *in vitro*, se prepararon cultivos celulares de hipocampo de ratas (día embrionario 18). En resumen, después de la obtención del hipocampo de embriones de rata, se sembraron neuronas hipocampales disociadas en placas de Petri recubiertas con poli-l-lisina a una densidad de 3×10^6 células/placa. Las células se cultivaron en medio Neurobasal™ y se mantuvieron a 37 °C en 5% CO₂. Once días después de la siembra, se reemplazó el medio de cultivo con medio fresco conteniendo MIX-NP. Después de 6 horas, el medio que contenía MIX-NP se eliminó y las células se analizaron o incubaron en medio fresco sin NP 24 horas. Los tratamientos se realizaron manteniendo una cantidad constante de Col (parte activa de las NP), utilizando 200 µg de éste para tratar 300,000 células. Seleccionando esta concentración de Col debido a que en estudios anteriores se demostró ser no tóxica²².

Para el análisis de los cultivos neuronales tratados, las células fueron lisadas y homogeneizadas con un tampón de lisis (NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) y posteriormente se centrifugaron. La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de proteínas Bradford y fueron separadas por SDS-PAGE²².

La muerte celular (apoptosis vs necrosis) se determinó sembraron neuronas del hipocampo de ratas en una placa de 24 pocillos, utilizando un kit de detección de células apoptóticas/necróticas/sanas²².

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que en las MIX-NP obtenidas por nanoprecipitación (MIX-N), el diámetro aumenta junto con la cantidad de Col utilizada en la formulación: MIX-N_a, preparada con una mezcla de Col: PLGA 1: 1, mostró un diámetro medio de aproximadamente 220 nm, en MIX-N_b; Chol: PLGA 1: 0.4 el diámetro medio aumentó a 320 nm y hasta 361 nm, en MIX-N_d, donde la cantidad de Col es mayor que en las mezclas anteriores (Col: PLGA 1: 0.1). La relación Col-PLGA utilizada también afecta el rendimiento final, lo que resulta en aproximadamente un 50% tanto en MIX-N_a como en MIX-N_b y disminuye progresivamente con la disminución de la cantidad de PLGA, alcanzando un valor de aproximadamente 40% en MIX-N_d²².

Por otro lado, en las MIX-NP obtenidas por emulsión única (MIX-EU), la mayoría de las características fisicoquímicas analizadas no se vieron afectadas por la proporción Col: PLGA utilizada; todas las muestras mostraron una población monomodal y monodispersa con un diámetro promedio de aproximadamente 290 nm ²².

El único parámetro afectado por la relación Col: PLGA en MIX-EU fue el rendimiento final donde para MIX-EU_a fue del 65%, alcanzando un 15% en MIX-EU_d ²².

En cuanto a la estabilidad de las MIX-NP, que fue evaluada en una suspensión de PBS almacenada a 4 °C y monitoreada durante 14 días mediante análisis de cambio de diámetro, monodispersión de las muestras, carga superficial y posible pérdida de Col, se encontró que para ambos tipos de MIX-NP, aquellas preparadas con una mezcla Col: PLGA 1: 1 (MIX-N_a y MIX_EU_a) mostraron mayor estabilidad en comparación con las otras mezclas después de 14 días de almacenamiento, ya que tanto los datos fisicoquímicos como los de composición no mostraron modificaciones significativas. Del mismo modo, la cantidad de Col fue principalmente constante en 6 horas; las pérdidas fueron mínimas y detectables (menos del 10% del Col total), lo que sugiere que el Col es estable encapsulado en la estructura de la matriz y que su liberación durante la circulación debe ocurrir en un grado muy bajo ²².

Debido a que MIX-N_a y MIX-EU_a mostraron dimensiones adecuadas para administración intraperitoneal y estabilidad adecuada, fueron seleccionadas para estudios *in vitro* ²².

En los estudios de toxicidad llevados a cabo mediante el kit de detección de células apoptóticas se cuantificaron los niveles de dos indicadores apoptóticos: caspasa-3 escindida y PARP (poli (ADP-ribosa) polimerasa) escindida. Encontrando que en las células neuronales tratadas durante 6-24 horas con g7-MIX-N_a y g7-MIX EU_a, los niveles de PARP escindida no fueron significativos independientemente de los MIX-NP probados, demostrando que no hay procesos apoptóticos importantes activos tras la aplicación de muestras de g7 ²².

En los estudios de captación y localización celular, g7-(Rhod)-MIX-N_a y g7-(Rhod)-MIX-SE_a se observó que ambas muestras fueron captadas de manera eficiente por neuronas y células gliales, mostrando después de 6 h de tratamiento absorción de las MIX-NP en cantidad similar (**Figura 19A**). Del mismo modo, ambas muestras utilizaron el mecanismo dependiente de clatrina para la captación celular, en promedio, alrededor del 5% de las MIX-NP se localizan junto con las señales positivas de caveolina (**Figura 19B**), mientras que aproximadamente el 60% se localizaron junto con las señales positivas de clatrina (**Figura 19C**). Partiendo de que los endosomas tempranos se pueden fusionar con los lisosomas dentro de la célula, al investigar la ubicación conjunta de las NP y LAMP2 (proteína de membrana 2 asociada a lisosomas), un marcador de lisosomas, se encontró acumulación de MIX-NP en los lisosomas (**Figura 19D**). Ambas g7-(Rhod)-MIX, mostraron colocalización con LAMP2 6 h después del tratamiento, mostrando una disminución 24 h después, indicando que las NP poseen la capacidad de escapar de los lisosomas hacia el citoplasma, haciendo que el Col esté disponible para funciones biológicas. Demostrando así que el Col siendo un componente de las MIX-NP es capaz de dirigirse al cerebro ofreciendo una opción terapéutica no invasiva para restaurar la deficiencia cerebral de Col ²².

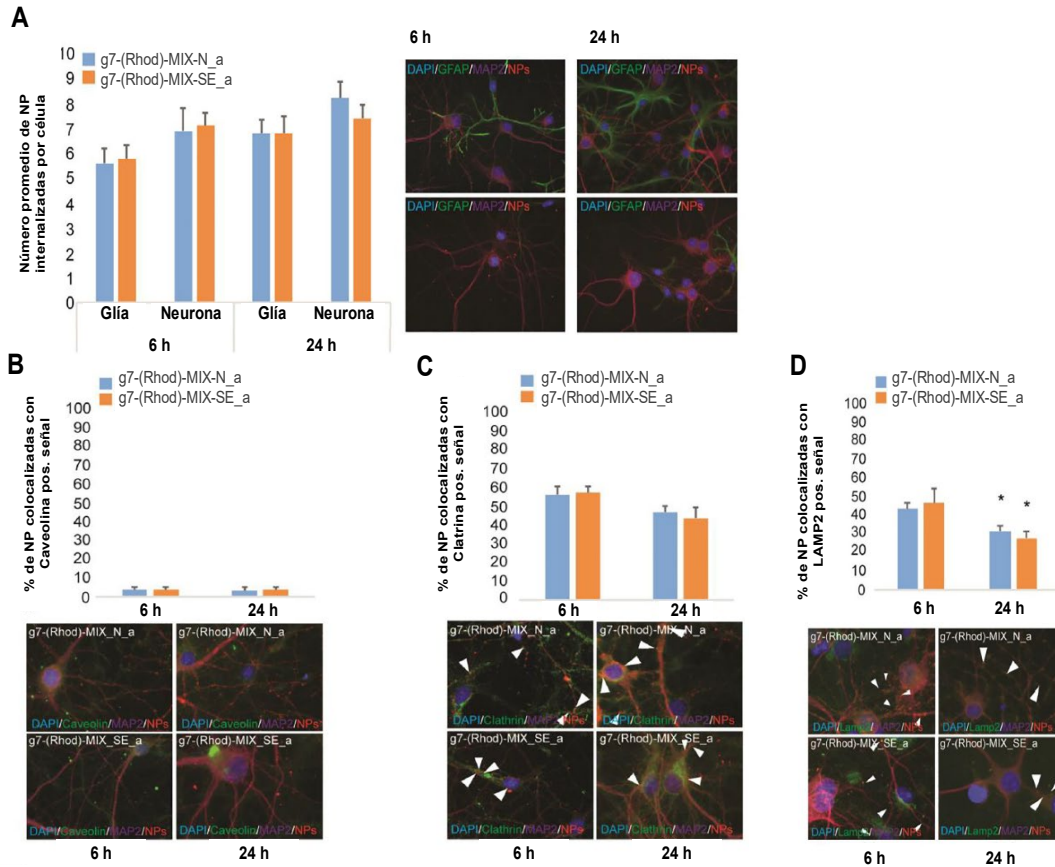


Figura 19. Captación *in vitro* de MIX-NP en células hipocámpales.

A) MIX-NP (señal roja) co-localiza con GFAP, un marcador de células gliales (verde) y MAP2, y un marcador de neuronas (magenta), evaluado después de 6 h y 24 h. Los núcleos celulares se visualizan con DAPI (azul). **B, C)** Las neuronas se visualizan mediante tinción con MAP2 y los núcleos celulares mediante DAPI. Se evalúa las MIX-NP (señales rojas) co-localizadas con señales positivas anti-Caveolina (B) y señales positivas anti-Clatrina (C) 6 y 24 h después de la aplicación de las MIX-NP. **D)** Ambos tipos de NP muestran co-localización con LAMP2, un marcador de lisosomas.

Imagen modificada de: Daniela, B. *et al.* Hybrid nanoparticles as a new technological approach to enhance the delivery of cholesterol into the brain. **543**, 300–310 (2018).

6.3 Nanopartículas de PLGA cargadas con Olanzapina para mejorar el tratamiento de la esquizofrenia.

La olanzapina (OZ) es un antipsicótico atípico o de segunda generación que se une selectivamente a los receptores centrales de dopamina D₂ y serotonina (5-HT_{2c}), siendo eficaz en el tratamiento de los síntomas asociados de la esquizofrenia con baja propensión a causar síntomas extrapiramidales. Sin embargo, su aplicación clínica se encuentra limitada por su escasa biodisponibilidad (40%) debido al metabolismo hepático del primer paso y la baja permeabilidad en el cerebro debido al eflujo generado por las glicoproteínas P, generando la necesidad de aumentar la dosis y/o la frecuencia de dosificación ²³.

En este ejemplo de aplicación de NP de PLGA se estudiará la hipótesis de que mediante el sistema de administración nasal se lograría una orientación cerebral y liberación sostenida de OZ encapsulada en NP de PLGA (50:50). Ayudando a mejorar su utilidad clínica, disminuir la dosis y la frecuencia de dosificación, reducir los efectos secundarios y mejorar la eficacia terapéutica ²³.

Se prepararon NP de PLGA cargadas con OZ y vacías mediante el método de nanoprecipitación con diferentes variables de formulación como fase orgánica (acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano), concentración de Poloxamero 407 como estabilizante (0%, 0.25%, 0.5%, 0.75 % m/v), relación de fase orgánica y fase acuosa (1:10, 2:10, 3:10, 4:10, 5:10), relación fármaco: polímero (1: 4, 1: 6, 1: 8, 1:10, 1:12) y tasa de adición de fase orgánica (0.5, 1.0, 1.5 mL en 1 min). Esto con la finalidad de obtener una formulación optimizada de NP que cumpla con las características adecuadas para atravesar BBB ²³.

Las NP fueron evaluadas en los siguientes aspectos:

- **Contenido de fármaco y eficiencia de encapsulación** ²³.
- **Tamaño de partícula e índice de polidispersidad**, determinados usando un Malvern Zetasizer Nano ZS ²³.

- **Potencial zeta**, determinado utilizando un Zetasizer ²³.
- **Calorimetría diferencial de barrido modulada**, se realizó manteniendo las muestras de OZ, PLGA y NP de PLGA cargadas con OZ en desecadores durante 24 h antes del análisis de temperatura para investigar las propiedades térmicas de la formulación, proporcionando información sobre el estado fisicoquímico del fármaco en el sistema ²³.
- **Difractometría de rayos X**, realizada en muestras de OZ, PLGA y NP de PLGA cargadas con OZ utilizando un difractómetro de rayos X con un goniómetro horizontal²³.
- **Liberación del fármaco *in vitro***, evaluada mediante la técnica de difusión de bolsa de diálisis en PBS (pH 6,4, metanol al 30% v / v) ya que la OZ tiene una solubilidad limitada en el tampón. Las muestras fueron analizadas espectrofotométricamente a 259 nm ²³.
- **Estudios de difusión *ex vivo***, a partir de membranas naturales para predecir el potencial de liberación del fármaco. Utilizando la mucosa nasal de oveja recién extirpada y una célula de difusión tipo Franz. El tejido se estabilizó con PBS en los compartimientos donante y receptor. Se agregó OZ o NP de PLGA cargadas con OZ sobre la membrana mucosa nasal estabilizada de oveja colocada en el compartimento del donante. Se extrajeron muestras de la fase del receptor, a intervalos de tiempo periódicos, analizándolas, usando un espectrofotómetro UV-Visible a 259 nm ²³.
- **Estudios histopatológicos**, realizados con mucosa nasal aislada de oveja seccionada en cuatro piezas. Cada pieza se trató con suspensión de NP de PLGA cargadas con OZ, solución de OZ en PBS pH 6.4, PBS pH 6.4 (como control negativo) y alcohol isopropílico (agente de toxicidad mucociliar nasal como positivo control), respectivamente. Después del tratamiento durante 2 h, las muestras se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina ²³.

- **Estudios *in vivo***, empleando ratas albinas blancas de cualquier sexo con un peso entre 250 y 300 g. Administrando por vía intranasal la formulación de las NP y la solución de fármaco equivalente a 400 µg de OZ con ayuda de una micropipeta (200 µL). Adicionalmente, se inyectó solución de fármaco (0,4 mL, 1 mg mL⁻¹) por vía intravenosa en la vena de la cola de las ratas. Posteriormente, los animales se sacrificaron a diferentes intervalos de tiempo (n = 4 para cada punto de tiempo), extrayendo sus cerebros y llevando a cabo el análisis de las muestras por HPLC ²³.

De la evaluación para encontrar la formulación óptima de NP, se encontró que utilizando acetonitrilo como disolvente orgánico y una concentración de 25% m/v de Poloxamero 407 se obtiene la máxima eficacia de encapsulación y el mínimo tamaño de partícula. Del mismo modo, se encontró que en las concentraciones de 1:10 y 1:5 de fase orgánica: fase acuosa se obtienen NP con el menor tamaño y máxima eficacia de encapsulación; sucediendo lo mismo con al incrementar la proporción fármaco: polímero de 1:4 a 1:8. De tal modo que con estos parámetros se obtuvieron NP optimizadas con las siguientes características: un porcentaje de encapsulamiento del fármaco de $68.91 \pm 2.31\%$, carga de fármaco de $8.613 \pm 0.288\%$ y tamaño de 91.2 ± 5.2 nm, con un índice de polidispersidad de 0.120 ± 0.018 . El potencial zeta fue de $-23,7 \pm 2,1$ mV, que se atribuyó a la carga negativa de la PLGA. Los valores negativos altos de potencial zeta indican que la repulsión electrostática entre partículas evitará su agregación y, por lo tanto, estabilizará la dispersión de nanopartículas. Los valores de potencial Zeta en el rango de 15 a 30 mV son comunes para NP estabilizado ²³.

En el análisis de calorimetría diferencial de barrido modulada se encontró para las NP cargadas con OZ, una ampliación del pico de fusión endotérmica de la OZ y una disminución del pico endotérmico del PLGA indicando una disminución en su Tg. Considerando esto y que el valor de Tg de un polímero vítreo puede ser disminuido mezclándolo con una pequeña cantidad de sustancia que actúe como plastificante, se puede concluir que este comportamiento en los termogramas podría deberse a la formación de enlaces de H entre los grupos carbonilo del PLGA y los grupos NH de OZ, así como al efecto de plastificación de OZ en PLGA ²³.

En el estudio de liberación del fármaco *in vitro* se encontró que el encapsulamiento de la OZ en NP de PLGA proporciona una liberación sostenida de la OZ (**Figura 20**). Siguiendo un modelo bifásico, con un estallido inicial atribuido al fármaco localizado en la superficie cercana de las NP, que pudo haberse desorbido al entrar en contacto con el medio de disolución. Posteriormente, la velocidad de liberación se ve disminuida, reflejando la liberación del fármaco encapsulado en la matriz polimérica²³.

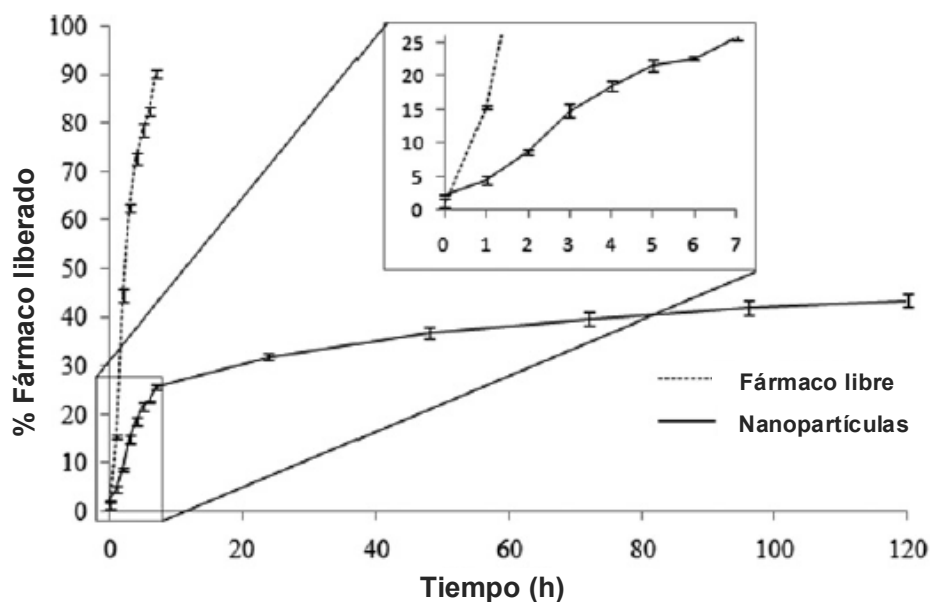


Figura 20. Perfil de difusión de la Olanzapina de una solución del fármaco libre y de NP de PLGA. Utilizando la técnica de difusión en bolsa de diálisis en PBS metanólico (pH 6.4, metanol al 30% v/v). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres lotes (algunas barras de error son demasiado pequeñas para mostrarse).

Imagen modificada de:

Seju, U., Kumar, A. & Sawant, K. K. Acta Biomaterialia Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. Acta Biomater. 7, 4169–4176 (2011)²³.

En el análisis de difusión *ex vivo* se observó que la difusión del fármaco libre a través de la mucosa nasal fue rápida en comparación con la difusión del fármaco encapsulado en las NP (**Figura 21**). Sin embargo, a diferencia de los estudios de liberación *in vitro*, no se pudo observar un comportamiento de estallido o liberación bifásica. Atribuyendo esto a las propiedades de barrera tanto de la matriz de PLGA como de la mucosa nasal, que actúan como membranas limitantes de la velocidad para la difusión de OZ desde las NP de PLGA²³.

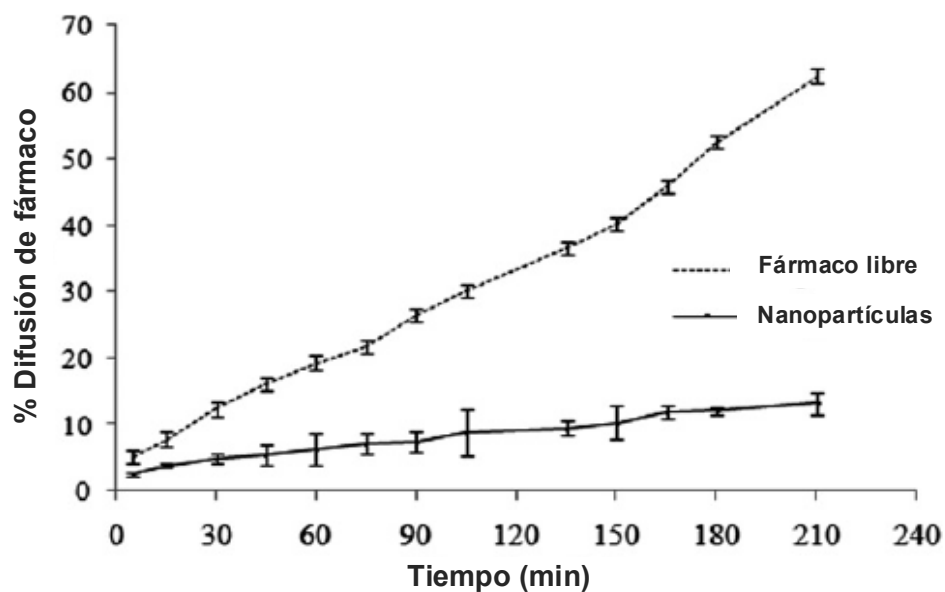


Figura 21. Difusión *ex vivo* de Olanzapina de una solución del fármaco libre y de NP de PLGA a través de la mucosa nasal de oveja. Empleando una celda de difusión tipo Franz en buffer de fosfato (pH 6.4) Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres lotes (algunas barras de error son demasiado pequeñas para mostrarse).

Imagen modificada de:

Seju, U., Kumar, A. & Sawant, K. K. Acta Biomaterialia Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. Acta Biomater. 7, 4169–4176 (2011) ²³.

Los estudios histopatológicos mostraron que las NP de PLGA cargadas con OZ son seguras para la administración nasal, ya que no se observó necrosis celular ni eliminación de los cilios de la mucosa nasal después del tratamiento (**Figura 22D**). Del mismo modo, la mucosa tratada con PBS (control negativo) mostro que la capa epitelial estaba intacta, y no hubo alteración en la membrana basal y la parte superficial de la submucosa (**Figura 22A**). En el caso de la mucosa nasal tratada con la solución de fármaco libre, algunos cilios se desprendieron (**Figura 22C**), indicando toxicidad farmacológica en la mucosa nasal. La mucosa tratada con alcohol isopropílico (control positivo) mostró una gran pérdida de células epiteliales y contracción de la capa mucosa de los tejidos epiteliales (**Figura 22B**) ²³.

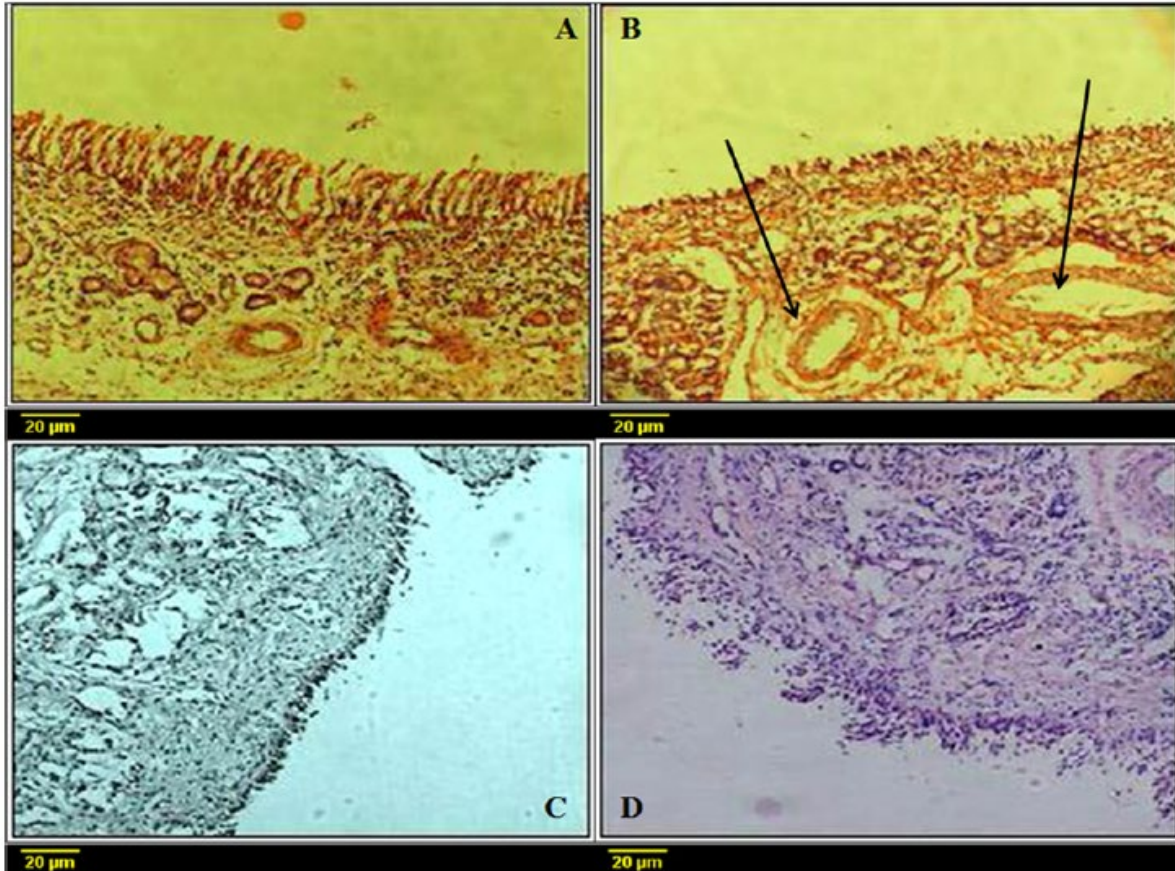


Figura 22. Estado histopatológico de la mucosa nasal de oveja posterior a 2 h de exposición con diferentes muestras. (A, control negativo) PBS pH 6.4 (B, control positivo) alcohol isopropílico (C) solución de fármaco y (D) NP cargadas con fármaco. Las flechas en (B) indican el cambio en la histopatología de la mucosa. Algunos cilios se desprendieron al tratarse con la solución de fármaco (C). No se observó ningún cambio en la histopatología de la mucosa cuando se trató con NP cargadas con fármaco (D).

Imagen modificada de:

Seju, U., Kumar, A. & Sawant, K. K. Acta Biomaterialia Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. Acta Biomater. 7, 4169–4176 (2011) ²³.

En los estudios *in vivo* como se puede observar en la **Figura 23**, después de los primeros 30 minutos, la concentración de fármaco en el cerebro fue menor para las NP cargadas con OZ administradas por vía IN en comparación con la solución de OZ administrada por vía IV. Sin embargo, a medida que transcurrió el tiempo, la concentración de fármaco de las NP de OZ administradas por vía IN aumentó para posteriormente mantenerse en un nivel constante, mientras que para la solución del fármaco administrado por la misma vía disminuyó ²³.

Por lo tanto, los resultados del presente estudio demuestran que la OZ podría ser transportada directamente al SNC haciendo uso de la administración nasal de NP de PLGA, mejorando así la concentración del fármaco en el cerebro, su permanencia y proporcionar una liberación sostenida de la OZ ²³.

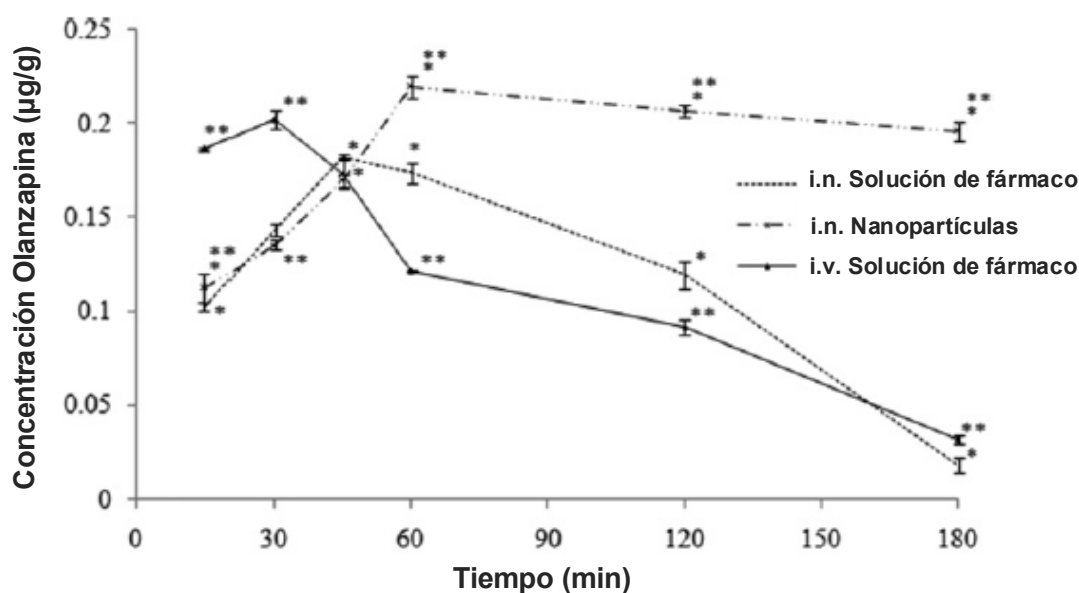


Figura 23. Perfil de concentración de Olanzapina en el cerebro después de la administración intranasal (i.n.) de NP y solución de fármaco y la administración intravenosa (i.v.) de solución de fármaco en ratas. Los valores representan la media \pm desviación estándar de seis animales (algunas barras de error son demasiado pequeñas para mostrarse). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Imagen modificada de:

Seju, U., Kumar, A. & Sawant, K. K. Acta Biomaterialia Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. Acta Biomater. 7, 4169–4176 (2011) ²³.

6.4 Nanopartículas de PLGA cargadas con clozapina y risperidona en el tratamiento para la esquizofrenia.

La esquizofrenia representa uno de los trastornos psiquiátricos más incapacitantes, se caracteriza por una profunda interrupción en el pensamiento, que afecta el lenguaje, la percepción y el sentido de sí mismo. La clozapina (CLZ), es el primer fármaco antipsicótico atípico (o antipsicótico de segunda generación) utilizado en el tratamiento de la esquizofrenia, sin embargo, la monoterapia con este fármaco a menudo es ineficaz en pacientes resistentes a él, y requiere altas dosis para observar resultados terapéuticos, lo que causa efectos secundarios. La combinación de CLZ con dosis bajas de risperidona (RIS) ha demostrado una respuesta mejorada en el tratamiento. RIS es el agente de aumento de CLZ más ampliamente documentado, una dosis baja de CLZ en combinación con RIS puede ser más efectiva en comparación con una dosis alta y puede causar menos efectos secundarios²⁴.

Las NP de PLGA se prepararon utilizando PLGA (50:50) de viscosidad inherente 0.4 dL/g (45 kDa) y 0.2 dL/g (20 kDa) para diferentes formulaciones de NP. Se empleó el método de secado por aspersión utilizando el equipo Nano Spray Dryer B-90 (Buchi, Suiza), para obtener polvo de flujo libre. La formulación de las NP de PLGA se describe esquemáticamente en la **Figura 24**²⁴.

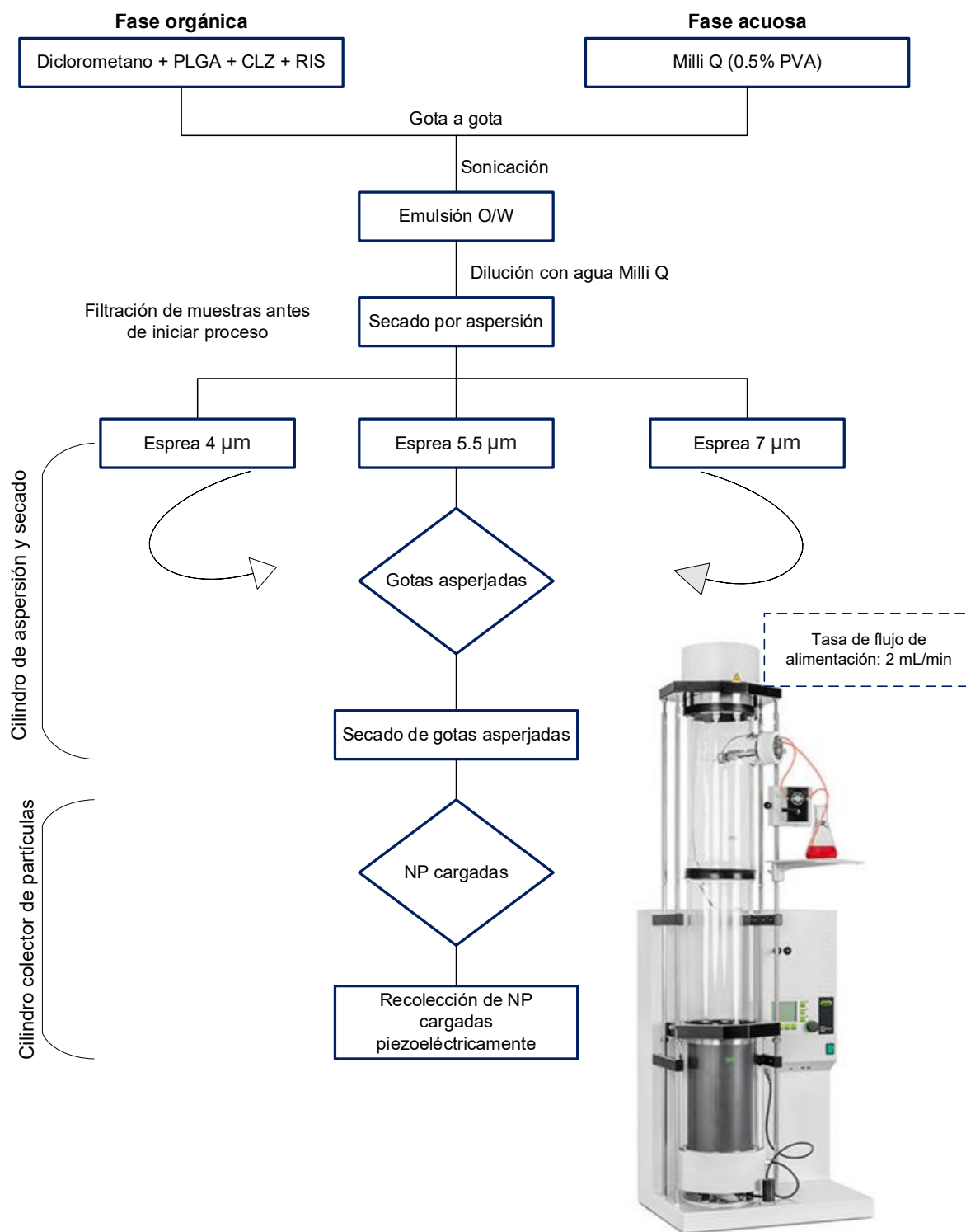


Figura 24. Diagrama de flujo de la formación de NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS utilizando el secador por aspersión Buchi Nano B-90. Imagen modificada de: Panda, A., Meena, J., Katara, R. & Majumdar, D. K. Formulation and characterization of clozapine and risperidone co-entrapped spray-dried PLGA nanoparticles. *7450*, (2016) ²⁴.

El funcionamiento del Nano secador por aspersión Buchi B-90 se basa en un solenoide accionado por un cristal piezoeléctrico que hace vibrar una membrana delgada de acero inoxidable perforada (malla de aspersión) en una pequeña tapa de aspersión a frecuencia ultrasónica. La membrana de acero inoxidable comprende una serie de orificios precisos del tamaño de micras que ajustan el tamaño de la gota. Se pueden usar tapas de aspersión con un tamaño de malla (diámetro) de 4.0, 5.5 y 7.0 μm para ajustar el tamaño promedio de gota entre 8 y 20 μm . La formulación se alimenta a través de una bomba peristáltica a la tasa de flujo deseada en forma de solución orgánica o acuosa o incluso como dispersión. El solenoide se acciona a una frecuencia ultrasónica, lo que hace que la membrana vibre y expulse una neblina de gotas de manera continua con una distribución estrecha del tamaño de las gotas. El gas de secado filtrado (nitrógeno) ingresa en el flujo laminar desde la parte superior a la cámara de secado y se calienta hasta la temperatura de entrada establecida. Las gotas ultrafinas generadas se secan suavemente en partículas sólidas. Las partículas sólidas se cargan electrostáticamente y se depositan en la superficie del electrodo colector. La temperatura de salida se mide mientras el gas de secado sale del secador por aspersión ²⁴.

Las NP CLZ-RIS-PLGA obtenidas fueron evaluadas en los siguientes aspectos:

- **Tamaño de partícula, potencial Zeta e índice de polidispersidad (PDI)**, usando un Zetasizer Malvern Nano-ZS ²⁴.
- **La morfología y la textura de la superficie de las NP** se examinaron mediante MET ²⁴.
- **Contenido cristalino de CLZ y RIS**, mediante análisis de difracción de rayos X de polvo (P-XRD) de CLZ pura, RIS, PLGA, mezcla de polímero y fármaco y NP CLZ-RIS-PLGA mediante un difractómetro de rayos X multipropósito X'Pert-PRO ²⁴.
- **Interacción fármaco-fármaco y/o fármaco-polímero**, a través de la obtención de los espectros IR de CLZ pura, RIS, PLGA, mezcla de polímero y fármaco y NP CLZ-RIS-PLGA utilizando la técnica de espectroscopía de absorción por reflexión o espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) ²⁴.

- **Contenido de humedad de las NP**, mediante el método de Karl Fischer.²⁴
- **Calorimetría diferencial de barrido**, manteniendo las muestras de CLZ, RIS, PLGA, mezcla de polímero y fármaco y NP CLZ-RIS-PLGA en desecadores durante 24 h antes del análisis de temperatura para investigar las propiedades térmicas de la formulación, permitiendo caracterizar el estado fisicoquímico de CLZ y RIS en las NP²⁴.
- **Carga de fármacos, eficiencia de encapsulación y rendimiento**, determinados utilizando HPLC de fase reversa evaluando a 279 nm (λ_{\max}) para RIS y 254 nm (λ_{\max}) para la estimación de CLZ con detector UV²⁴.
- **Liberación de fármacos *in vitro***, mediante la técnica de difusión en bolsa de diálisis, colocando una cantidad determinada de NP CLZ-RIS-PLGA en la bolsa de diálisis (membrana de celulosa, límite de peso molecular 12-14 kDa), sellada herméticamente y sumergida en PBS a pH 7.4 y 37 ± 0.5 °C con agitación constante. Se extrajeron muestras a intervalos de tiempo predeterminados reemplazando por un volumen igual de solución PBS. La concentración de CLZ y RIS liberada en diferentes puntos de tiempo se determinó midiendo la absorbancia usando un espectrofotómetro UV-visible²⁴.
- **Citotoxicidad *in vitro*** determinada mediante el ensayo MTT utilizando células PC12. Se sembraron alrededor de 90000 células en cada pocillo de placas de 24 pocillos, incubándose a 37 °C en 5% de CO₂ durante 24 h. Después de este tiempo, se descartaron 200 mL de medio de cada pocillo, agregando 200 mL de medio (Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de caballo, inactivado por calor al 10%, suero de ternero fetal al 2.5% y estreptomycin/penicilina 100 U/mL (1%)) NP sin fármacos, solución de CLZ/RIS (200/100 mg/mL) y NP CLZ-RIS-PLGA equivalentes a una solución CLZ/RIS (200/100 mg/mL). Las células se incubaron por 48 h, posteriormente se descartó el medio, agregando 1 mL de MTT (0,5 mg/mL) e incubando durante 4 h. La densidad óptica (DO) se leyó a 570 nm con un filtro de referencia de 620nm²⁴.

Del proceso de obtención y de los parámetros de formulación de las NP, se encontró que el secado por aspersión a temperaturas mayores a 60 °C conduce a la adherencia de las NP en el plato de recuperación, dando como resultado baja recuperación de las NP de PLGA. De tal modo que, para evitar la adherencia de las NP, las condiciones óptimas del proceso fueron las siguientes: 60 °C de temperatura de aire de entrada, velocidad de alimentación de la solución de 2 mL/min, velocidad de aspersión del 80%, tasa de flujo de gas de 110-118 L/min y utilizando una malla de aspersión de diámetro de 4 µm. Con estas condiciones, se obtuvieron NP de PLGA-CLZ-RIS de morfología esférica (**Figura 25**). Las propiedades de las NP de PLGA de alto y bajo peso molecular de CLZ-RIS se muestran en la **Tabla 7**. Se encontró que las NP de PLGA de bajo peso molecular con un tamaño de malla de 4 µm, son más pequeñas en tamaño medio en comparación con las NP de PLGA de alto peso molecular y podrían ser utilizadas para el co-direccionamiento de CLZ y RIS al cerebro atravesando BBB. Esto debido a que en el caso del PLGA de bajo peso molecular, se genera un rompimiento del fluido durante la aspersión, provocando un aumento de la interfaz gas-líquido y, por lo tanto, una tensión superficial más baja, favoreciendo la formación de gotas más pequeñas. Mientras que en el caso del PLGA de alto peso molecular, al tener mayor viscosidad la fase líquida, mayor será la tensión superficial en la interfaz gas-líquido, favoreciendo la formación de gotas más grandes y, por lo tanto, NP de mayor tamaño. Los resultados del PDI también mostraron una distribución de tamaño estrecha para las NP de PLGA de bajo peso molecular en comparación con las de alto peso molecular. Para el potencial Zeta de las NP de PLGA de alto y bajo peso molecular, no se observó ningún efecto significativo con base en el diámetro de la malla ²⁴.

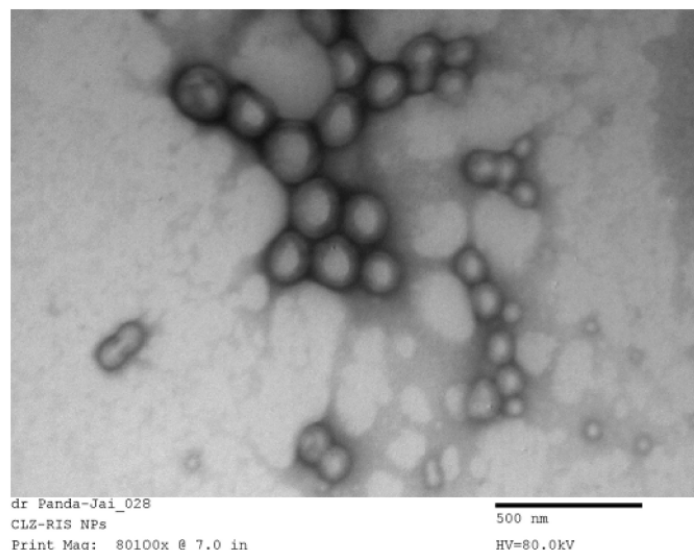


Figura 25. Microscopía electrónica de transmisión de NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS a 34 000x y 80.0 kV.

Imagen modificada de: Panda, A., Meena, J., Katara, R. & Majumdar, D. K. Formulation and characterization of clozapine and risperidone co-entrapped spray-dried PLGA nanoparticles. **7450**, (2016) ².

Tabla 7. Efecto del diámetro de la esprea y la viscosidad inherente (VI) del polímero PLGA sobre las características de las NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS.

Características de NP	Diámetro esprea		
	4 μm	5.5 μm	7 μm
PLGA (VI 0.2 dL/g)			
Tamaño (nm)	248.48 \pm 11.71 ^a	261.45 \pm 12.86 ^b	331.27 \pm 19.31 ^c
PDI	0.16 \pm 0.03	0.13 \pm 0.01	0.22 \pm 0.02
Potencial zeta (mV)	-.12.78 \pm 0.7	-. 13.5 \pm 1.2	-.12.5 \pm 1.4
PLGA (VI 0.4 dL/g)			
Tamaño (nm)	293.13 \pm 12.30 ^a	332.16 \pm 11.76 ^b	392.83 \pm 24.92 ^c
PDI	0.24 \pm 0.01	0.30 \pm 0.02	0.28 \pm 0.03
Potencial zeta (mV)	-11.34 \pm 1.2	-12.5 \pm 1.7	-11.1 \pm 1.5

^a Significativamente diferente $p < 0.05$

^b Significativamente diferente $p < 0.05$

^c Significativamente diferente $p < 0.05$

Tabla modificada de: Panda, A., Meena, J., Katara, R. & Majumdar, D. K. Formulation and characterization of clozapine and risperidone co-entrapped spray-dried PLGA nanoparticles. **7450**, (2016) ²⁴.

Las NP de PLGA-CLZ-RIS secadas por aspersión mostraron alta carga de fármacos y eficacia de encapsulación sin efecto significativo del diámetro de la malla de pulverización:

Las NP de PLGA de bajo peso molecular, con un diámetro de malla de 4 μm , mostraron cargas de fármaco de $126.3 \pm 4.20 \mu\text{m}/\text{mg}$ y $58,20 \pm 2,4 \mu\text{m}/\text{mg}$ para CLZ y RIS, respectivamente, y eficiencias de encapsulación de $94.74 \pm 3.1\%$ para CLZ y $93.12 \pm 3.8\%$ para RIS ²⁴.

De manera similar, la carga de fármacos de NP de PLGA de alto peso molecular con un diámetro de malla de 4 μm fue de $124.2 \pm 3.8 \mu\text{m}/\text{mg}$ para CLZ y $56.5 \pm 2.3 \mu\text{m}/\text{mg}$ para RIS. Mientras que la eficiencia de encapsulación fue de $93.17 \pm 2.8\%$ para CLZ y $90.40 \pm 3.6\%$ para RIS ²⁴.

El rendimiento de producción con un diámetro de malla de 4 μm fue del 48%, mientras que con un diámetro de malla de 7 μm fue del 64% para las NP de PLGA de alto y bajo peso molecular. El porcentaje de recuperación es mayor para las NP obtenidas de la malla de 7 μm , debido a que éstas son de mayor tamaño en comparación con las NP obtenidas de la malla de 4 μm , lo que facilita su recuperación en el electrodo colector ²⁴.

Como se puede observar en la **Figura 26**, el difractograma P-XRD de las NP de PLGA-CLZ-RIS se asemejan al del polímero nativo, lo que indica una disminución en la cristalinidad de CLZ y RIS en las NP. Sugiriendo así, que los fármacos encapsulados estaban presentes en un estado amorfo dentro de las NP de PLGA ²⁴.

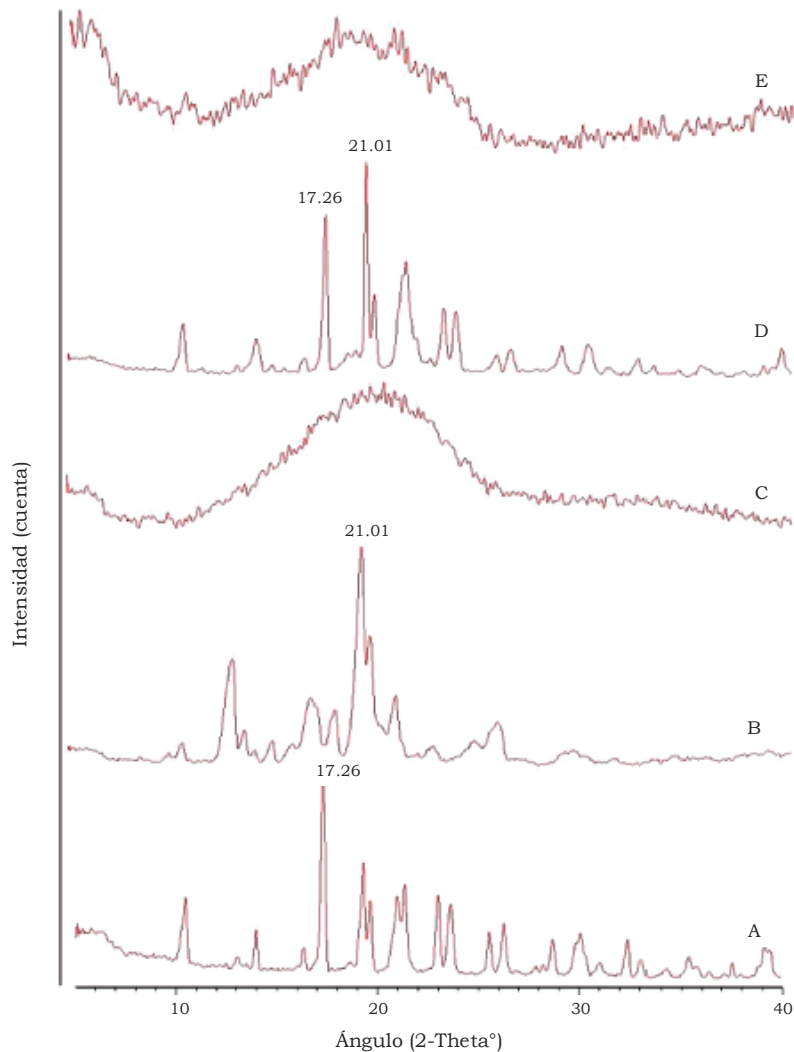


Figura 26. Espectros P-XRD de CLZ pura (A), RIS pura (B), PLGA (C), mezcla física de polímero y fármaco (CLZ/RIS) (D) y NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS secadas por aspersión (E).

Imagen modificada de: Panda, A., Meena, J., Katara, R. & Majumdar, D. K. Formulation and characterization of clozapine and risperidone co-entrapped spray-dried PLGA nanoparticles. **7450**, (2016) ²⁴.

Las NP de PLGA-CLZ-RIS en el estudio FT-IR (**Figura 27**), mostraron picos resultantes de la superposición de sus componentes separados. Indicando que no hubo cambios en las características químicas de los grupos funcionales específicos de CLZ, RIS y PLGA en las NP. De manera complementaria, la no degradación del fármaco, durante la formulación de las NP, se confirmó mediante un análisis espectral de escaneo de ondas UV (200-600 nm) de RIS y CLZ liberados de las NP y se comparó con los espectros de RIS y CLZ puros ²⁴.

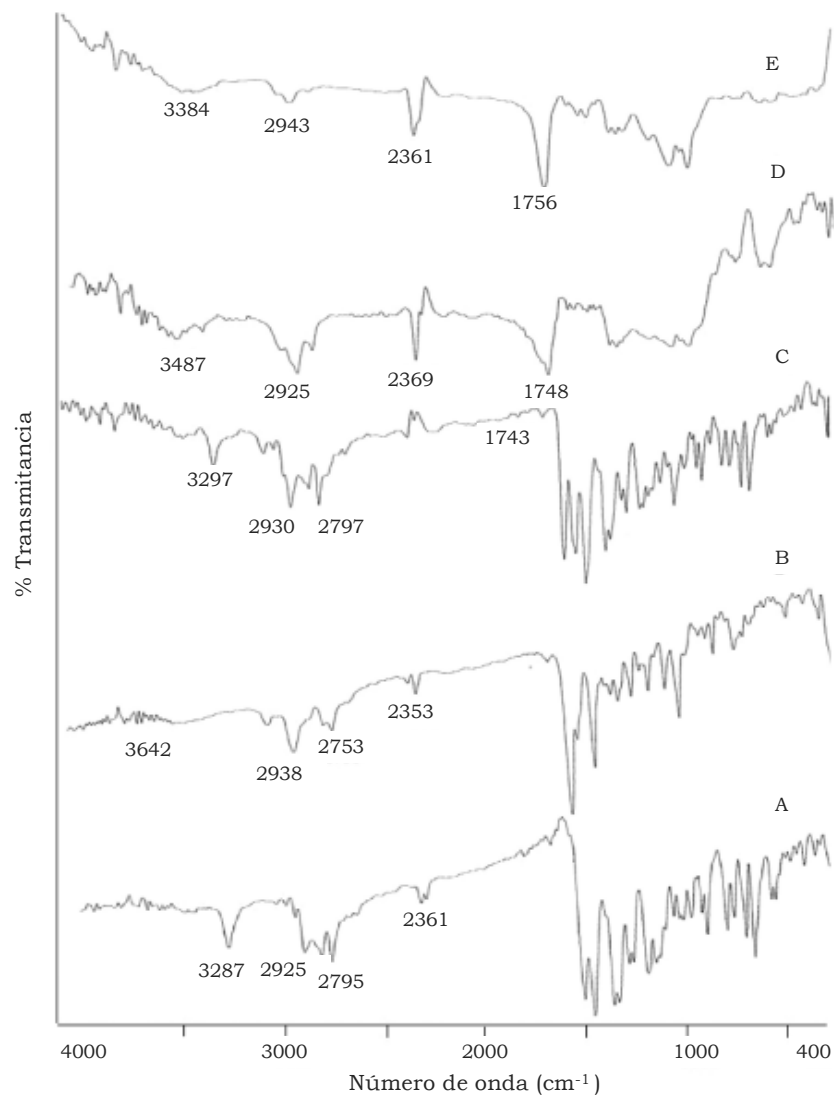


Figura 27. Espectros FT-IR de CLZ pura (A), RIS pura (B), mezcla física de polímero y fármaco (CLZ/RIS) (C), PLGA (D) y NP de PLGA cargadas con CLZ-RIS secadas por aspersión (E).

Imagen modificada de: Panda, A., Meena, J., Katara, R. & Majumdar, D. K. Formulation and characterization of clozapine and risperidone co-entrapped spray-dried PLGA nanoparticles. **7450**, (2016) ²⁴.

En el análisis de calorimetría diferencial de barrido, como se muestra en **Figura 28**, CLZ y RIS puros, mostraron un pico de fusión endotérmico a 187.5 °C y a 171.7 C, respectivamente, indicando la naturaleza cristalina de ambos fármacos. PLGA mostró un pico endotérmico a 59.69 °C correspondiente a su Tg ²⁴.

El termograma de las NP de PLGA-CLZ-RIS se asemeja al del PLGA, no mostró ningún nuevo pico o cambios de pico y carece de los picos relacionados con CLZ y RIS, lo que indica que los fármacos fueron encapsulados en estado amorfo y que no hubo interacciones que pudiera alterar las propiedades del fármaco o del polímero durante la formulación de las NP. El termograma de la mezcla física de polímero y fármacos mostró una desviación negativa para RIS, cambiando el pico de 171.7 a 146.6 °C, mientras que los picos de CLZ y PLGA fueron similares a sus espectros endotérmicos puros. Esta desviación negativa puede atribuirse a interacciones polímero-fármaco, como enlaces de hidrógeno entre el grupo carbonilo del PLGA y el grupo -NH de RIS durante el calentamiento de la muestra. Como ha sido mencionado previamente, el polímero PLGA puede formar enlaces de hidrógeno con sustancias de la formulación como los fármacos. Dichas interacciones pueden modificar la Tg, la temperatura de fusión, la forma y la entalpía de los termogramas del fármaco y el polímero. El pico de RIS se desplazó en la mezcla física fármaco-polímero, sin ningún cambio en el termograma de las NP de PLGA-CLZ-RIS. Lo que podría deberse a interacción física o a enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilos del PLGA y los grupos -NH de RIS o debido al efecto plastificante de CLZ o RIS en el PLGA. Los espectros FT-IR de la mezcla física de polímero-fármacos sugieren que, en los termogramas, el cambio observado en el pico RIS puede deberse a la interacción física polímero-fármaco, ya que no hubo cambio en el pico del grupo carbonilo del polímero PLGA y el pico del grupo -NH de RIS ²⁴.

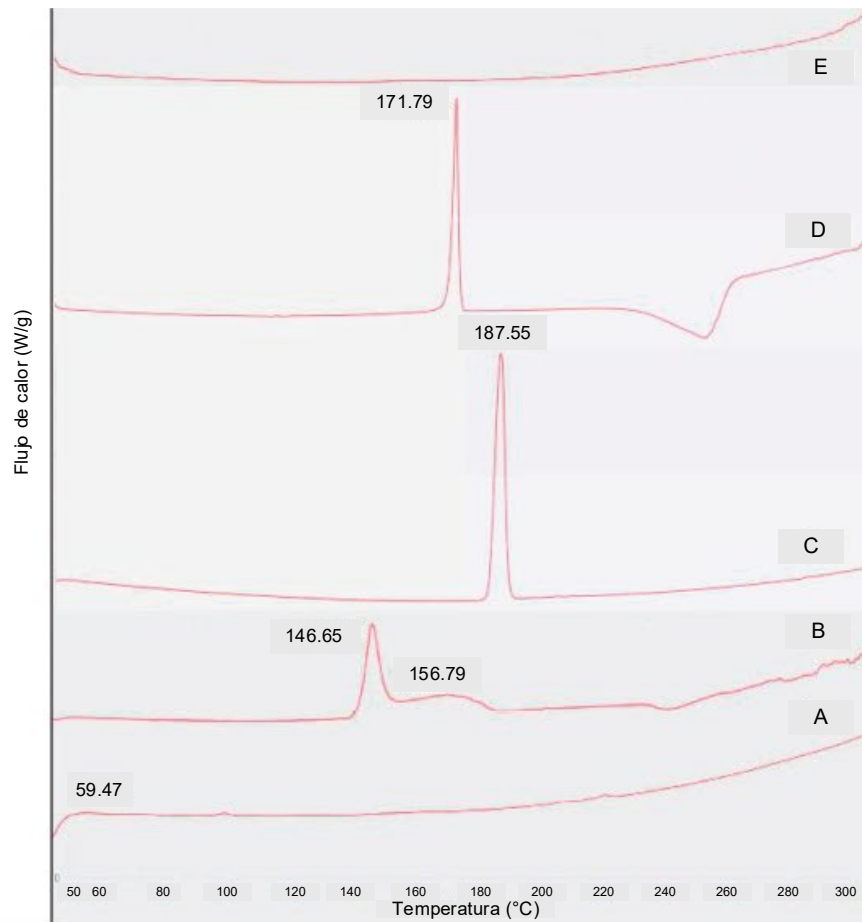


Figura 28. Termograma de PLGA (A), mezcla física CLZ–RIS con PLGA (B), CLZ pura (C), RIS pura (D) y NP de PLGA cargadas con CLZ–RIS (E).

Imagen modificada de: Panda, A., Meena, J., Katara, R. & Majumdar, D. K. Formulation and characterization of clozapine and risperidone co-entrapped spray-dried PLGA nanoparticles. **7450**, (2016) ²⁴.

La liberación de CLZ y RIS de las NP de PLGA-CLZ-RIS mostró un patrón bifásico típico. Tanto para PLGA de alto peso molecular como para PLGA de bajo peso molecular, inicialmente, se produjo una liberación de explosión en los primeros 3 días, posteriormente observando una liberación gradual de los fármacos durante los siguientes 7 días ²⁴.

Siendo mayores los valores correspondientes a la liberación de los fármacos de las NP de PLGA de bajo peso molecular (**Figura 29**), lo que podría deberse a las altas tasas de hidrólisis del polímero, erosión superficial y degradación de las NP de PLGA de bajo peso molecular en comparación con las NP de PLGA de alto peso molecular, o debido a la formación de NP duras y no porosas para las NP de PLGA de alto peso molecular en comparación con las de PLGA de bajo peso molecular, ya que la dilución de la emulsión antes del secado por aspersión puede conducir a una precipitación rápida del polímero para el caso de las NP de PLGA de alto peso molecular. El tamaño de las NP también rige la liberación del fármaco encapsulado. NP de gran tamaño liberan lentamente el fármaco encapsulado debido a la larga ruta de difusión en comparación con las NP de menor tamaño. La liberación inicial en ráfaga de los fármacos fue alta en NP de PLGA de bajo y alto peso molecular, lo que podría deberse a la migración del exceso de fármaco CLZ y RIS a la fase acuosa durante la dilución de la emulsión antes del secado por aspersión. Los datos de liberación se ajustaron a diferentes modelos de cinética de liberación como orden cero, primer orden, ecuación de Higuchi y ecuación de Korsmeyer-Peppas, para determinar el mecanismo de liberación y los coeficientes de regresión (R^2)²⁴.

La liberación de CLZ y RIS de NP de PLGA de bajo peso molecular se ajustó mejor a la cinética de liberación de primer orden, lo que se confirmó mediante la comparación de los coeficientes de regresión: orden cero ($R^2=0.969$), primer orden ($R^2=0.971$), Higuchi ($R^2=0.866$) y Korsmeyer-Peppas ($R^2=0.956$). La liberación de CLZ y RIS a partir de NP de PLGA de alto peso molecular se ajustó mejor a la cinética de liberación de Korsmeyer-Peppas: orden cero ($R^2=0.978$), primer orden ($R^2=0.989$), Higuchi ($R^2=0.941$) y Korsmeyer-Peppas ($R^2=0.990$). El exponente de difusión de la ecuación de Korsmeyer-Peppas indicó que la liberación de CLZ y RIS de las NP de PLGA-CLZ-RIS se rige por la combinación de erosión de la superficie y difusión. La liberación inicial en explosión se rigió por la difusión superficial, mientras que la liberación prolongada se controló mediante la erosión del polímero combinada con la difusión. La cinética de liberación de los fármacos a partir de las NP de PLGA de bajo peso molecular no fue consistente ya que mostraron una liberación de alta explosión en comparación con las NP de alto peso molecular²⁴.

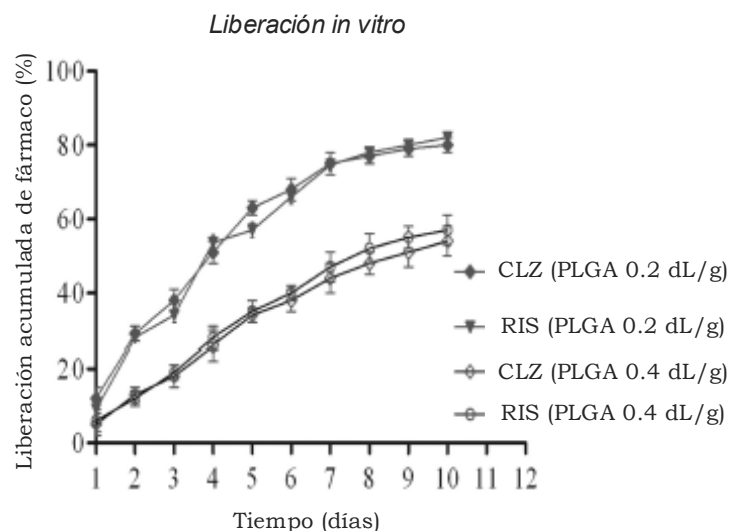


Figura 29. Perfil de liberación de fármaco *in vitro* de CLZ y RIS de NP de PLGA de bajo peso molecular (viscosidad inherente 0.2 dL/g) y alto peso molecular (viscosidad inherente 0.4 dL/g).

Imagen modificada de: Panda, A., Meena, J., Katara, R. & Majumdar, D. K. Formulation and characterization of clozapine and risperidone co-entrapped spray-dried PLGA nanoparticles. **7450**, (2016) ²⁴.

No hubo diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular para CLZ-RIS puros, NP libres de fármaco y NP de PLGA-CLZ-RIS en comparación con las células PC12 tratadas con medio. De este modo, las NP de PLGA-CLZ-RIS se consideraron biocompatibles, ya que no se observó una disminución significativa en la viabilidad celular a altas concentraciones de fármacos para las células PC12 (**Figura 30**) ²⁴.

La dosis de exposición y el tiempo de incubación jugaron un papel importante en la citotoxicidad. No se observó una influencia significativa en la viabilidad celular después de 48 h de incubación para CLZ-RIS puros, NP libres de fármaco y NP de PLGA-CLZ-RIS con PLGA de alto y bajo peso molecular en comparación con las células PC12 tratadas con medio. De este modo, las NP de PLGA-CLZ-RIS se consideraron biocompatibles, ya que no se observó una disminución significativa en la viabilidad celular a altas concentraciones de fármacos para las células PC12 (**Figura 30**) ²⁴.

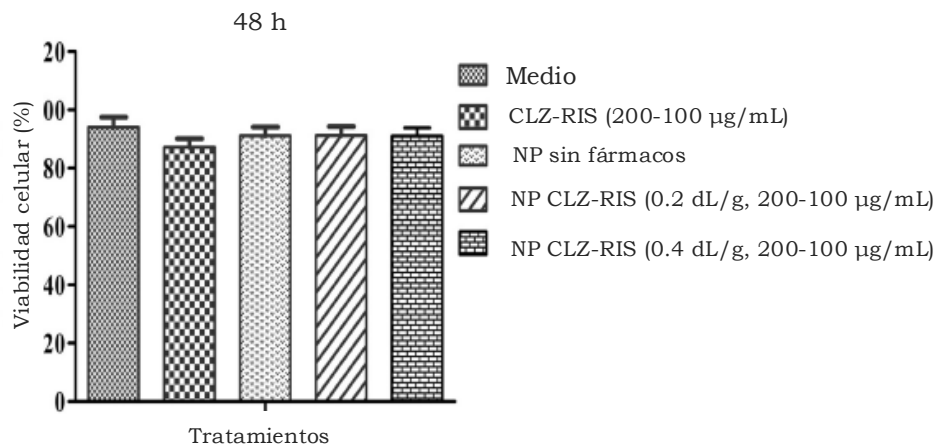


Figura 30. Citotoxicidad *in vitro* en células PC-12 (ensayo MTT) de medio DMEM, CLZ-RIS puras, NP sin fármacos y NP de PLGA (viscosidad inherente 0.2 y 0.4 dL/g) cargadas con CLZ-RIS.

Imagen modificada de: Panda, A., Meena, J., Katara, R. & Majumdar, D. K. Formulation and characterization of clozapine and risperidone co-entrapped spray-dried PLGA nanoparticles. **7450**, (2016) ²⁴.

Las NP preparadas con PLGA de bajo peso molecular tienen doble ventaja sobre las NP de PLGA de alto peso molecular, al ser de menor tamaño y presentar una cinética de liberación más rápida de los fármacos, además de ser biocompatibles. Siendo estos requisitos ideales para la liberación de fármacos en el SNC. Por lo que, estas NP de PLGA-CLZ-RIS secadas por aspersion (viscosidad inherente 0.2 dL/g) podrían analizarse para determinar su potencial terapéutico en modelos animales de esquizofrenia ²⁴.

6.5 Nanopartículas de PLGA-Tween 80 cargadas con proteína de unión a vitamina D para el tratamiento de Alzheimer.

Aunque la enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común, no existen medicamentos para prevenir o tratarla. La EA se caracteriza neuropatológicamente por placas beta amiloides extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares de proteína Tau. Específicamente, el péptido beta amiloide ($A\beta$) ha sido encontrado en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el plasma de pacientes con EA. El $A\beta$ libre puede formar agregados tóxicos, que contribuyen a la mayoría de las características patológicas de la EA, incluidos déficits cognitivos, pérdida de neuronas y neuroinflamación. Por lo tanto, retrasar o inhibir la agregación del $A\beta$ podría mitigar la neuropatología relacionada con la EA, siendo así, que las moléculas de secuestro/unión de $A\beta$ podrían ser agentes terapéuticos efectivos para el tratamiento de la EA. La proteína de unión a vitamina D (DBP) es una glucoproteína de 58 kDa miembro de la familia de proteínas Gc-globulina, que se expresa de manera considerable en una amplia variedad de tipos de células y tejidos. Varios estudios han demostrado que los niveles de DBP están alterados en el LCR y el suero de pacientes con EA. Además, de estudios anteriores, se sabe que la DBP se une al $A\beta$, lo que resulta en la mitigación de la toxicidad inducida por $A\beta$ y el deterioro de la memoria. Estudios *in vivo* también han revelado que la vida media de la DBP administrada por vía intravenosa es de 3 a 10 h en ratas. Estos hallazgos plantean la posibilidad de que NP de PLGA puedan actuar como un vehículo eficaz de suministro de DBP al cerebro, pudiendo modular su tasa de liberación y vida media cuando se administra a través de una ruta sistémica para el tratamiento de la EA²⁵.

Las NP de PLGA (75:25) cargadas con DBP se obtuvieron utilizando el método de emulsificación-difusión de solvente utilizando PVA como estabilizador. Antes del tratamiento, las NP de DBP-PLGA se resuspendieron en una solución con 4% de Tween 80 (T80), como estabilizador no iónico para proporcionar estabilidad en los experimentos *in vivo* e *in vitro*, y se reconstituyeron para formar DBP-PLGA recubiertas con T80 por sonicación²⁵.

Las NP obtenidas fueron evaluadas en los siguientes aspectos:

- **Tamaño de partícula**, utilizando el método de dispersión dinámica de luz en un analizador de tamaño de partícula Zetasizer²⁵.
- **Potencial Zeta**, mediante dispersión electroforética de luz usando un Zetasizer²⁵.
- **Eficiencia de encapsulación**, determinada mediante centrifugación de una cantidad de muestra establecida utilizando espectroscopia UV a 260 nm para analizar el sobrenadante²⁵.
- **Morfología**, utilizando los métodos microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET)²⁵.
- **Liberación *in vitro* de DBP de las NP de PLGA**, mediante la agitación de una suspensión de las NP en PBS durante 24 h, tomando muestras periódicas (1 mL) y reemplazando con un volumen equivalente de PBS. Cada muestra se centrifugó analizando el sobrenadante²⁵.
- **Citotoxicidad de DBP y DBP-PLGA-T80**, utilizado el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en células HT22 neuronales hipocampales de ratón y células U373-MG de astrocitomaglioblastoma humano incubándolas con DBP o DBP-PLGA-T80 a diversas concentraciones (10, 50, 100 y 300 µg / ml). La absorbancia se midió a 595 nm para determinar la viabilidad celular²⁵.
- **Efecto de la DBP en la agregación del A β ₁₋₄₂ monomérico**, usando el ensayo de Tioflavina T (ThT), un colorante que da una fuerte fluorescencia al unirse al A β . El A β ₁₋₄₂ (en DMSO) se agregó a cada pocillo, agregando DBP (10, 50 y 100 µg / mL en PBS), DBP-PLGA-T80 (10, 50 y 100 µg / mL en PBS) y PBS. La fluorescencia de ThT se midió a 490 nm con excitación a 450 nm²⁵.

- **Evaluación *in vivo***, se utilizaron ratones de cinco meses transgénicos machos con cinco mutaciones de EA familiares (5XFAD). Estos ratones expresan tres mutaciones en la proteína precursora amiloide humana (APP) y dos mutaciones en presenilina-1 humana (PS1). Las NP DBP-PLGA-T80 (2,5 mg / kg) o vehículo (DMEM; Medio de cultivo celular de Eagle modificado de Dulbecco que contenía 4% de T80) se administraron en la vena de la cola de los ratones una vez a la semana durante 4 semanas. Los ratones fueron sacrificados y analizados 6 días después de la última aplicación ²⁵.
- **Análisis histológico** para analizar la acumulación amiloide, los cerebros de los ratones fueron removidos y cortados colocándolos en pozos de una placa de acrílico. Las secciones de cerebro se incubaron con una solución de anticuerpo primario que contenía anticuerpo anti- β -amiloide₁₇₋₂₄ purificado (1: 1000) a 4 ° C durante toda la noche. Posteriormente, se incubaron con una solución de anticuerpo secundario que contenía el anticuerpo de burro Alexa 488-conjugado IgG anti-ratón (1: 200) durante 1 hora en la oscuridad ²⁵.

Para la **tinción de Tioflavina S (ThS)**, secciones de cerebro se incubaron en pocillos con 2.5 mL de solución de ThS durante 10 minutos en un agitador de placas. Para ambas pruebas las secciones de cerebro se observaron mediante microscopio confocal.

Para el **análisis inmunohistoquímico** de la muerte neuronal y la neuroinflamación, los cortes cerebrales colocados en pocillos de una placa acrílica se incubaron con una solución de anticuerpo primario de anticuerpo NeuN (1: 100) o anticuerpo Iba-1 (1: 500) toda la noche a 4 ° C. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado de caballo anti-ratón IgG (1: 200), durante 1.5 horas. Los cortes cerebrales fueron analizados utilizando microscopía óptica ²⁵.

Cuantificación de datos histológicos

Se seleccionaron las capas 5-6 de la corteza prefrontal para analizar cuantitativamente las señales de ThS, 4G8 NeuN e Iba-1. Las placas positivas a 4G8 y ThS se cuantificaron como fracciones de área ²⁵.

- **Laberinto en Y** evalúa la función cognitiva espacial colocando a los ratones al azar en un brazo inicial para explorar el laberinto. La alternancia espontánea se define como una serie de entradas continuas en tres brazos diferentes sin repetición (es decir, ABC, BCA, pero no ABA). La entrada de ratones a cada brazo fue registrada durante 8 minutos, calculando la alternancia espontánea (%) como $[\text{entradas sucesivas} / (\text{entradas de brazo totales} - 2) \times 100]$. Las pruebas se realizaron después de la habituación de los ratones en el laberinto en Y durante 3 días a partir del día siguiente al último tratamiento²⁵.

Con base en lo determinado por la metodología de dispersión dinámica de luz, las NP DBP-PLGA-T80 tuvieron un tamaño medio de partícula de 226.6 ± 44.4 nm y un índice de polidispersidad de 0.039 ± 0.013 . Con un potencial zeta de -0.144 mV. La liberación de DBP a partir de las NP de PLGA siguió un patrón bifásico. Presentando una liberación inicial rápida de DBP en los primeros 60 minutos, seguida de una liberación lenta que comienza a estabilizarse después de 8 horas (**Figura 31A**). La morfología observada de las NP DBP-PLGA-T80 por MET (**Figura 31B**) y MEB (**Figura 31C**) fue esférica y uniforme. La eficiencia de encapsulación de DBP en las NP fue de 89.3 ± 3.3 ²⁵.

En el ensayo de fluorescencia ThT realizado para confirmar y comparar los efectos de anti-agregación de A β de las NP de DBP-PLGA-T80 y DBP libre, se encontró que no solo la DBP libre, sino también las NP de DBP-PLGA-T80, disminuyeron la fluorescencia de ThT de manera dosis dependiente. Sin embargo, las NP de DBP-PLGA-T80 mostraron una mayor capacidad para inhibir la polimerización que la DBP libre a la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 32A**). Estos resultados sugieren que las NP de DBP-PLGA-T80 pueden tener un efecto superior al suprimir la polimerización del A β en comparación con la DBP libre a la misma concentración²⁵.

El ensayo MTT para verificar la citotoxicidad de DBP y las NP de DBP-PLGA-T80, indicó que éstas no presentan un efecto significativo sobre la viabilidad celular a 10 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$ ²⁵.

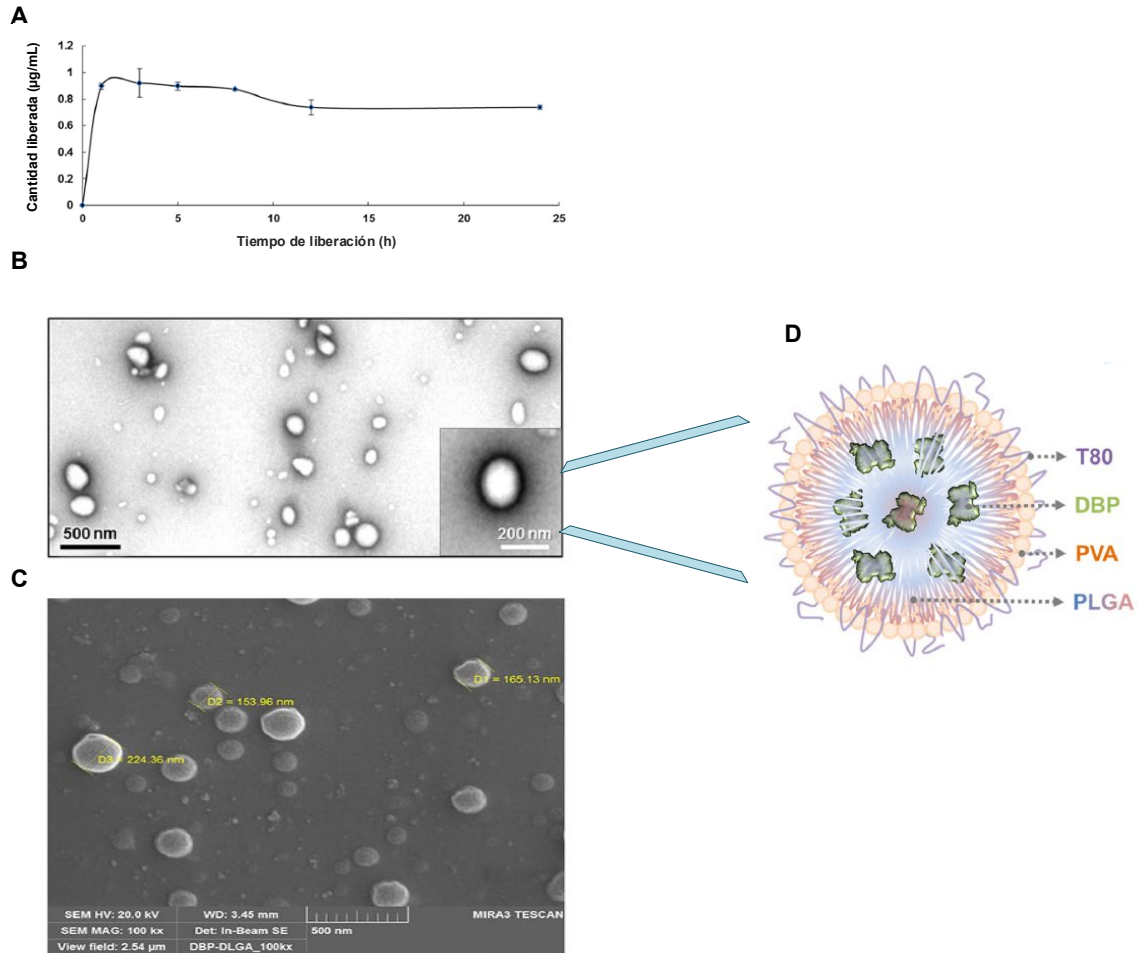


Figura 31. Caracterización de NP DBP-PLGA-T80. (A) Cantidad liberada de DBP de las NP *in vitro* durante un período de 24 h. Los resultados son representativos de más de tres experimentos independientes. (B) Estructura de NP DBP-PLGA-T80 por MET. (C) Estructura de NP DBP-PLGA-T80 por MEB. (D) NP DBP-PLGA-T80 empleando PVA como estabilizador.

Imagen modificada de:

Jeon, S. G. et al. Vitamin D-binding protein-loaded PLGA nanoparticles suppress Alzheimer's disease-related pathology in 5XFAD mice. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 17, 297–307 (2019) ²⁵.

A modo de verificar aún más la actividad inhibitoria de las NP DBP-PLGA-T80 en la acumulación del A β *in vivo*, se tiñeron las placas del A β en el cerebro de ratones 5XFAD con anticuerpo 4G8 y ThS. La tinción inmunofluorescente del anticuerpo 4G8 reveló que las NP de DBP-PLGA-T80 disminuyeron notablemente la formación de placa A β (**Figura 32B**) ²⁵.

Adicionalmente, los ratones 5XFAD inyectados con DBP-PLGA-T80 mostraron un área ThS (+) significativamente reducida en comparación con los ratones 5XFAD inyectados con vehículo (**Figura 32B**)²⁵.

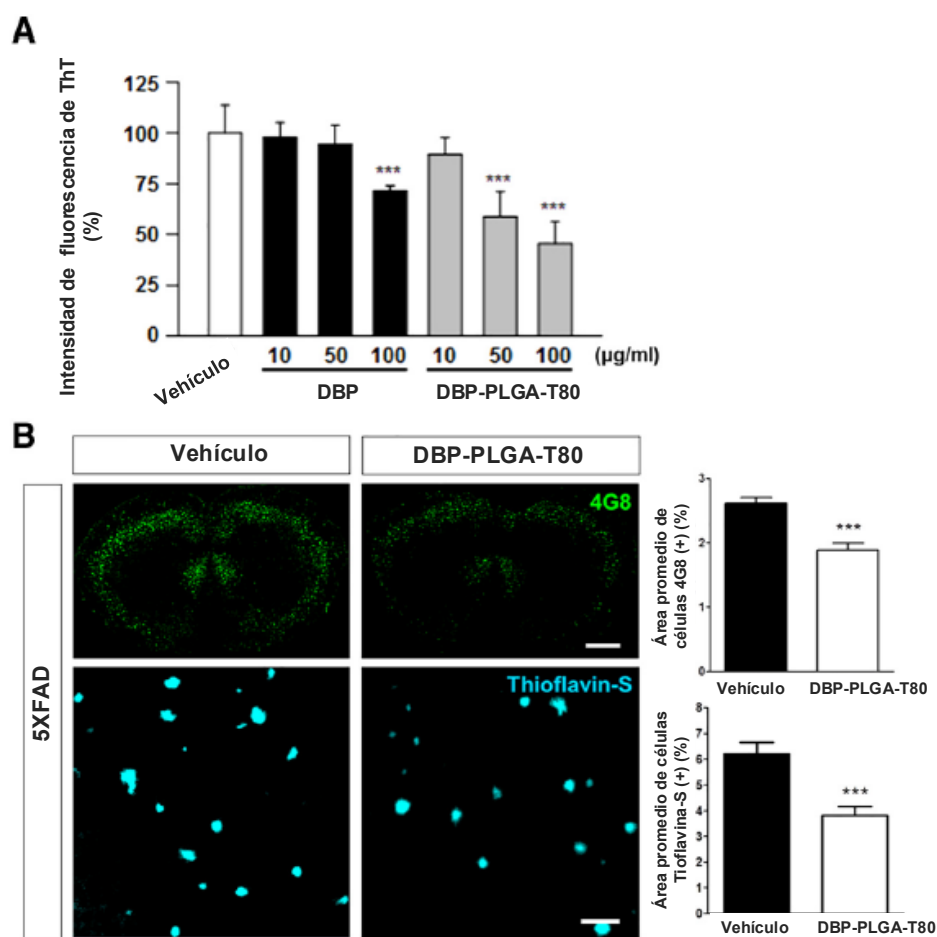


Figura 32. Efecto de NP de PLGA cargadas con DBP sobre la polimerización y acumulación de A β . (A) Se midió la intensidad de la fluorescencia de Tioflavina-T para analizar la inhibición de la agregación de A β en presencia o ausencia de NP DBP-PLGA-T80 o DBP libre. (B) Se tiñeron secciones coronales de cerebro de ratones 5XFAD (n=6) con anticuerpo anti 4G8 y se tiñeron las capas 5-6 de la corteza frontal con Tioflavina-S para detectar la acumulación de A β posterior a la administración de vehículo o NP DBP-PLGA-T80. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de área 4G8 o Tioflavina-S positiva (**p < 0.001 en comparación con el grupo tratado con vehículo). Vehículo: PBS.

Imagen modificada de:

Jeon, S. G. et al. Vitamin D-binding protein-loaded PLGA nanoparticles suppress Alzheimer's disease-related pathology in 5XFAD mice. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 17, 297–307 (2019)²⁵.

Al ser el hipocampo una región clave del cerebro para el aprendizaje y la memoria, incluida la memoria espacial y de reconocimiento, se investigó el efecto de las NP DBP-PLGA-T80 en la acumulación del A β en el hipocampo, realizando un análisis histológico mediante tinción con ThS en la sección del hipocampo de ratones 5XFAD inyectados con vehículo o NP DBP-PLGA-T80 (**Figura 33A**). Se encontró que el área de ThS (+) se redujo significativamente en ratones 5XFAD administrados con NP DBP-PLGA-T80 (**Figura 33B**), además de presentar una reducción en el tamaño de la placa A β y el tamaño promedio de las placas A β del hipocampo en comparación con los ratones 5XFAD inyectados con vehículo (**Figura 33C y 33D**)²⁵.

Se ha demostrado que el A β produce activación microglial prolongada y citocinas proinflamatorias elevadas, contribuyendo a la neurotoxicidad en cerebros con EA.^{26,27} Para examinar si la actividad de agregación anti-A β de las NP DBP-PLGA-T80 podría estar asociada con la microgliosis, se analizó el área ocupada por Iba-1, un marcador de microglia, en la corteza frontal de ratones 5XFAD y wild-type (WT). Los datos histológicos indicaron que los ratones 5XFAD inyectados con NP DBP-PLGA-T80 mostraron un área de Iba-1 significativamente reducida en comparación con los ratones 5XFAD tratados con vehículo (**Figura 34A**). Posteriormente, para investigar si las NP DBP-PLGA-T80 influyen en la pérdida neuronal, se realizó inmunotinción para NeuN, un marcador neuronal, en la corteza frontal de ratones 5XFAD y WT. Encontrando que los ratones 5XFAD mostraron un número reducido de células NeuN (+) en comparación con los ratones WT; la administración de NP DBP-PLGA-T80 rescató la pérdida de neuronas (**Figura 34B**). Estos hallazgos respaldan el papel protector de las NP DBP-PLGA-T80 contra la neuroinflamación mediada por el A β y la muerte neuronal *in vivo*²⁵.

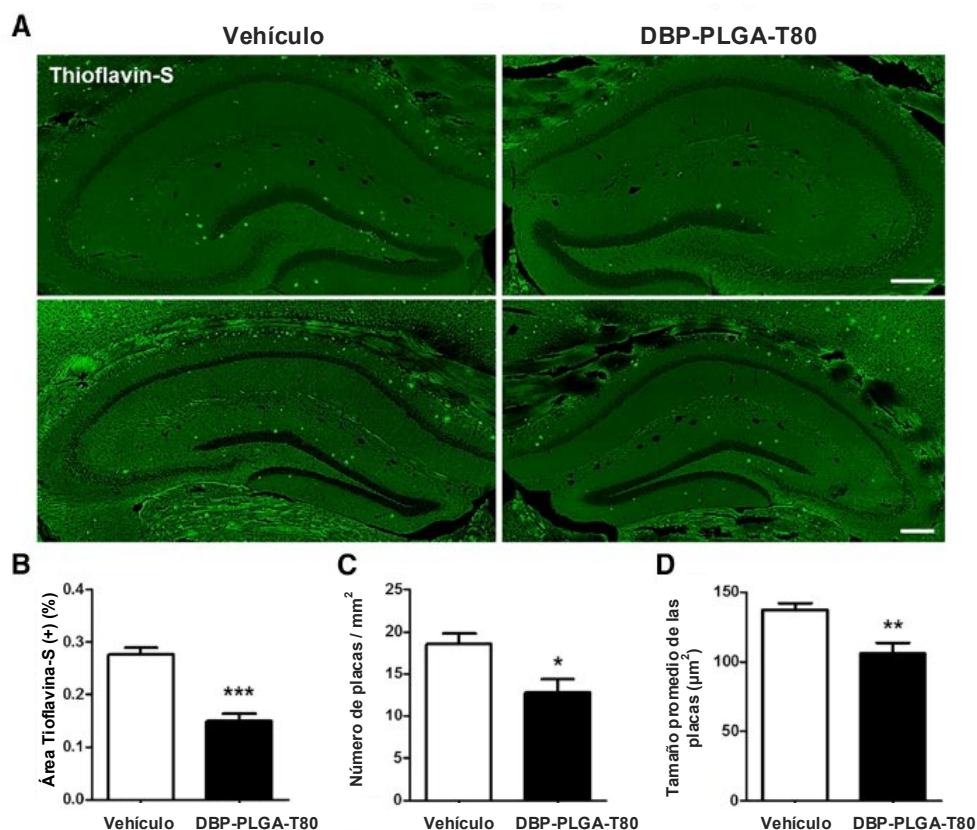


Figura 33. Efecto inhibitor de las NP DBP-PLGA-T80 sobre la acumulación de A β en el hipocampo de ratones 5XFAD. (A) Secciones coronales de cerebro se tiñeron con Tioflavina-S para detectar la acumulación de A β en el hipocampo después de la administración de vehículo o NP DBP-PLGA-T80. (B) El porcentaje de área Tioflavina-S positiva en el hipocampo se redujo significativamente en ratones 5XFAD inyectados con NP DBP-PLGA-T80. (C) El número de placas A β ($> 20 \mu\text{m}^2$) por área de hipocampo se redujo significativamente en ratones 5XFAD administrados con NP DBP-PLGA-T80. (D) El tamaño medio de la placa A β en el hipocampo fue significativamente menor en ratones 5XFAD inyectados con NP DBP-PLGA-T80 que en ratones 5XFAD inyectados con vehículo (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ en comparación con el grupo tratado con vehículo). Vehículo: PBS.

Imagen modificada de:

Jeon, S. G. et al. Vitamin D-binding protein-loaded PLGA nanoparticles suppress Alzheimer's disease-related pathology in 5XFAD mice. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 17, 297–307 (2019) ²⁵.

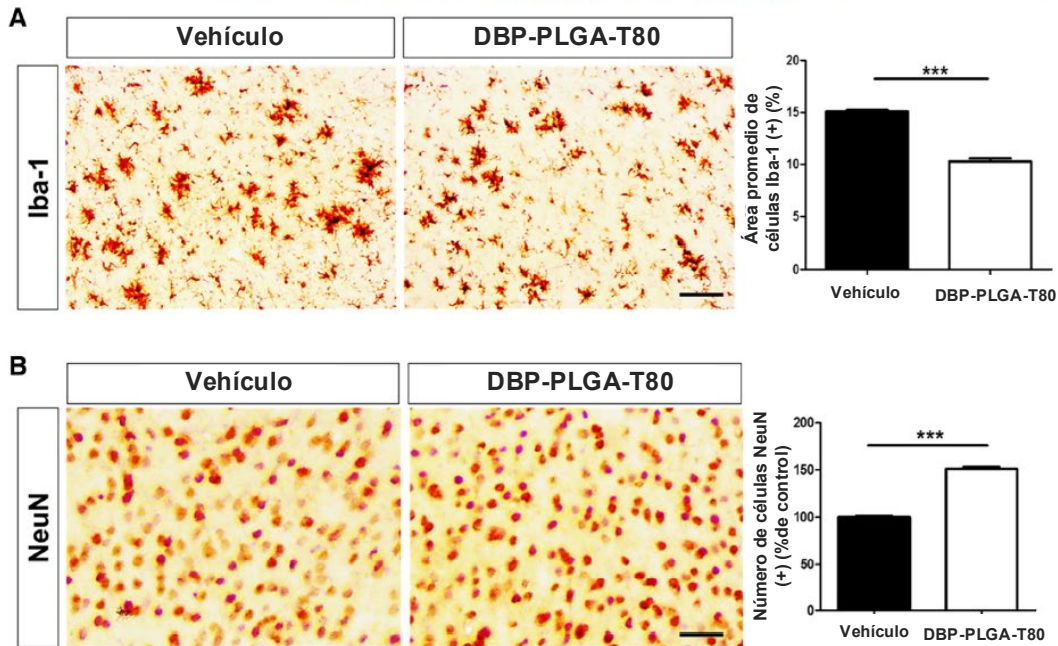


Figura 34. Efecto inhibitorio de las NP de PLGA cargadas con DBP sobre la activación glial reactiva y la pérdida neuronal. (A) Se tiñeron secciones de tejido con anticuerpo anti-Iba-1 para detectar microglia en la corteza frontal de ratones 5XFAD (n=6) posterior a la administración de vehículo o NP DBP-PLGA-T80. El gráfico de barras muestra la cuantificación del área positiva para Iba-1. (B) Se tiñeron secciones de tejido con anticuerpo anti-NeuN para detectar neuronas en la corteza frontal de ratones 5XFAD (n=6) después de la administración de vehículo o NP DBP-PLGA-T80. El gráfico de barras muestra la cuantificación del número de células positivas a NeuN (**p < 0.001 en comparación con el grupo tratado con vehículo). Vehículo: PBS.

Imagen modificada de:

Jeon, S. G. et al. Vitamin D-binding protein-loaded PLGA nanoparticles suppress Alzheimer's disease-related pathology in 5XFAD mice. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 17, 297–307 (2019) ²⁵.

Los déficits en la memoria espacial representan uno de los principales síntomas clínicos de la EA, y el A β es el principal contribuyente del deterioro de la memoria. Para determinar si el deterioro de la memoria espacial en ratones transgénicos que sobreexpresan A β puede mejorarse mediante la administración de NP DBP-PLGA-T80, se realizó la prueba del laberinto en Y, midiendo la alternancia espontánea en cada grupo. Como se esperaba, los ratones 5XFAD mostraron una alternancia espontánea significativamente disminuida en comparación con los ratones WT. Sin embargo, la administración de las NP en ratones 5XFAD restableció significativamente este comportamiento a niveles normales (**Figura 35A**) ²⁵.

No se encontraron diferencias significativas en las entradas del brazo totales entre ninguno de los grupos evaluados, lo que indica una motilidad similar (**Figura 35B**). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que las NP DBP-PLGA-T80 pueden restaurar la función cognitiva deteriorada en ratones 5XFAD ²⁵.

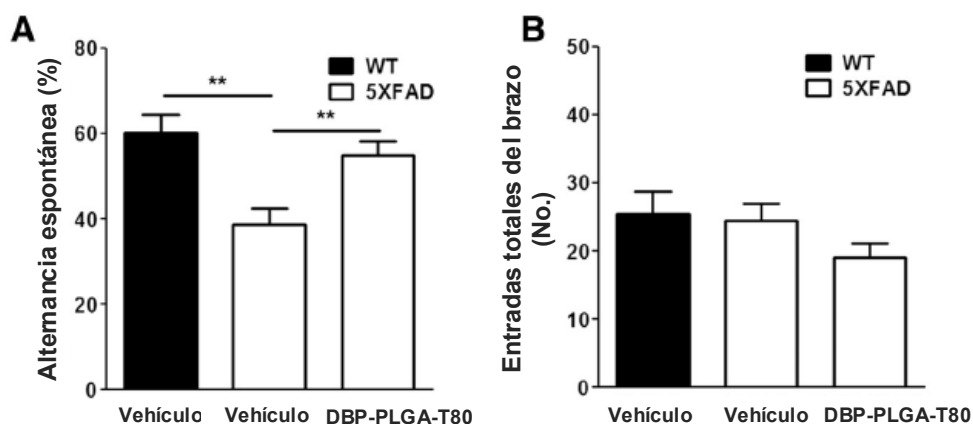


Figura 35. Efecto inhibitorio de las NP de PLGA cargadas con DBP sobre el deterioro cognitivo. (A) Se evaluó la alternancia espontánea de ratones 5XFAD administrados con vehículo (PBS) o NP DBP-PLGA-T80 (n=6) usando la prueba del laberinto en Y 24 h después de la administración final. (B) Las entradas totales del brazo no fueron significativamente diferentes entre los grupos (**p < 0.01 en comparación con cada grupo). Imagen modificada de:

Jeon, S. G. et al. Vitamin D-binding protein-loaded PLGA nanoparticles suppress Alzheimer's disease-related pathology in 5XFAD mice. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 17, 297–307 (2019) ²⁵.

Por lo tanto, se concluye que las NP de PLGA cargadas con DBP son capaces de inhibir la patogénesis de la EA al unirse la DBP a péptidos A β , bloqueando su agregación. Atenuando así la neurodegeneración y la neuroinflamación, así como el deterioro cognitivo ²⁵.

6.6 Plataformas microfluídicas para desarrollar NP de PLGA dirigidas al SNC en la terapia contra VIH.

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) pertenecen a un espectro de afecciones derivadas del VIH. La patología asociada al virus se caracteriza por un perfil neurovirulento, por lo que es capaz de infectar el cerebro, utilizando este sitio como reservorio, y causar daños severos SNC. En consecuencia, el SNC es reconocido como un sitio santuario para la replicación de virus ²⁸.

Efavirenz (EFV) es un fármaco antirretroviral, aprobado por la FDA para el tratamiento de la infección por VIH, que actúa bloqueando la transcriptasa reversa del virus. Sin embargo, en el caso de EFV y otros medicamentos antirretrovirales, la cantidad final de medicamento que llega al SNC es solo una pequeña fracción de la dosis administrada, debido a su baja capacidad para cruzar BBB ²⁸.

La carga exitosa de fármacos dentro de las NP, además de depender de las propiedades farmacéuticas del fármaco y composición de las NP, depende del método de encapsulación. Las técnicas realizadas por métodos convencionales, utilizando equipos como homogeneizadores o agitadores magnéticos, presentan varias limitaciones, como la falta de un control preciso sobre las propiedades finales de las NP. La microfluídica se asocia con una fina manipulación de los parámetros del proceso, lo que proporciona capacidad de ajuste y optimización de las propiedades de las NP, incluida la eficiencia de encapsulación de fármacos y la monodispersidad de los lotes. De ahí, que las plataformas microfluídicas sean utilizadas como candidatos potenciales para producir NP en un proceso mayormente controlado ²⁸.

Las NP de PLGA-EFV se obtuvieron mediante la técnica de nanoprecipitación realizada a través de dos enfoques: convencional y microfluídico de flujo conjunto (**Figura 36**). La fase orgánica consistió en una mezcla de 20 mg/mL de PLGA en DMSO con 3 mg/mL de EFV. Mientras que la fase acuosa de una solución de Tween 80 al 2%. Por los mismos dos enfoques, se obtuvieron NP libres de fármaco y fluorescentes ²⁸.

En el caso de las NP fluorescentes, el 10% del PLGA utilizado fue PLGA marcado con Flamma 648 (PLGA-FKR648). Las NP resultantes se lavaron tres veces con agua ultrapura y se recuperaron por ultrafiltración con un filtro de límite de peso molecular de 100 kDa²⁸.

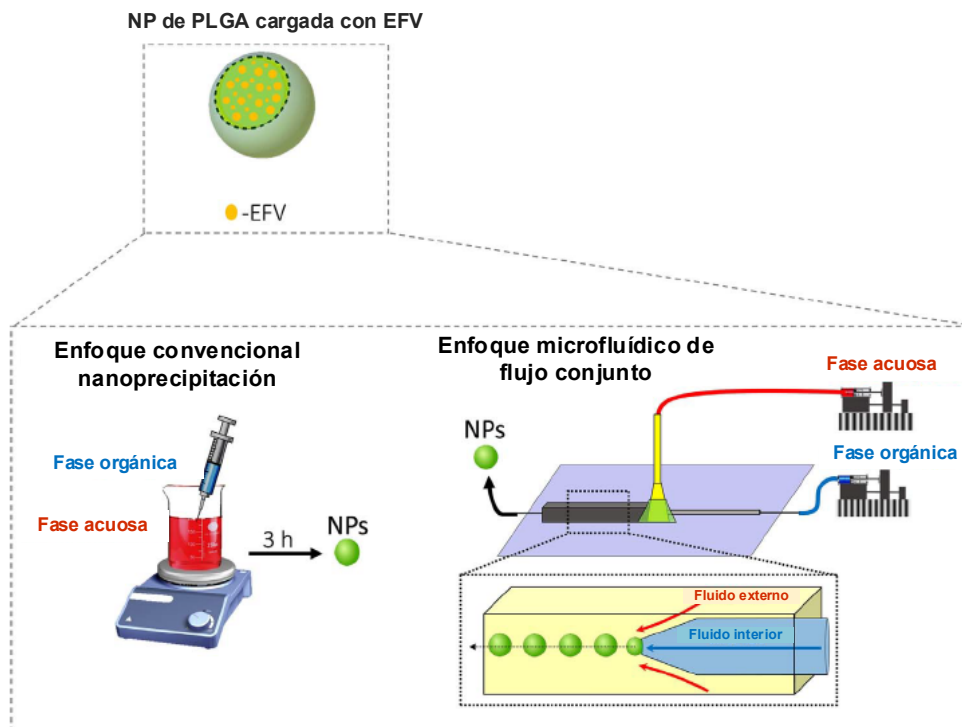


Figura 36. Representación esquemática de los enfoques convencional y microfluídico, utilizados para producir NP de PLGA cargadas con EFV. La fase orgánica consistió en una mezcla de PLGA en DMSO, mientras que la fase acuosa consistió en una solución de Tween®80.

Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using microfluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019)²⁸.

Las NP obtenidas fueron evaluadas en los siguientes aspectos:

- **Tamaño medio de partícula, distribución de tamaño y carga superficial:** Las NP fueron caracterizadas en tamaño promedio e índice de polidispersidad (PDI) por dispersión dinámica de luz. Su potencial Zeta fue determinado utilizando un Zetasizer Malvern Nano²⁸.

- **Eficiencia de encapsulación y carga de fármaco:** estimando indirectamente la cantidad de EFV asociada a las NP. Este cálculo se realizó por la diferencia entre la cantidad total de EFV utilizada para preparar las NP y la cantidad de EFV que permaneció en la fase acuosa, después de la recolección de las NP por ultrafiltración. La cantidad de EFV se determinó mediante HPLC en fase reversa con detección ultravioleta a una longitud de onda de detección de 247 nm ²⁸.
- **Morfología y cribado químico:** las características morfológicas de las NP se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (MET). Para el análisis químico, se obtuvieron espectros de rayos X por energía dispersiva (EDS) ²⁸.
- **Liberación *in vitro*:** NP cargadas con EFV (correspondientes a 315 µg de fármaco) se añadieron a una solución al 0.2% de Pluronic® F-127 en PBS pH 7.4. Y colocándolas posteriormente en una incubadora con agitador orbital, a 100 rpm y 37 ° C, durante 24 h. Se recogieron alícuotas de 500 µL en periodos de tiempo específicos reemplazando el volumen retirado con solución Pluronic® F-127 y PBS. Las alícuotas se centrifugaron a 10,000 g durante 15 minutos y el sobrenadante fue analizado por HPLC ²⁸.

Las NP se funcionalizaron con un péptido de unión al receptor de transferrina (Thr-His-Arg-Pro-Pro-Met-Trp-Ser-Pro-Val-Trp-Pro). En condiciones normales, este receptor se encuentra sobreexpresado a nivel de BBB, específicamente en los capilares cerebrales, lo que lo convierte en un prometedor mediador para el direccionamiento de fármacos al cerebro. El proceso de funcionalización (**Figura 37**) involucró dos reacciones de acoplamiento diferentes. La primera, una reacción de carbodiimida, llevada a cabo para unir los grupos carboxilo del PLGA a los grupos amina de un enlazador basado en PEG (NH₂-PEG-Mal). Este paso también involucró la PEGilación de las NP, aspecto especialmente importante cuando las NP son administradas por vía intravenosa, ya que el PEG evita la adsorción de opsoninas a los nanosistemas y su consecuente depuración a través del sistema fagocítico, prolongando así su tiempo en circulación. La segunda reacción de acoplamiento fue una reacción de maleimida, utilizada para unir el grupo maleimida (-Mal) del enlazador basado en PEG a la cisteína terminal del péptido a través de su grupo sulfhidrilo (-SH) ²⁸.

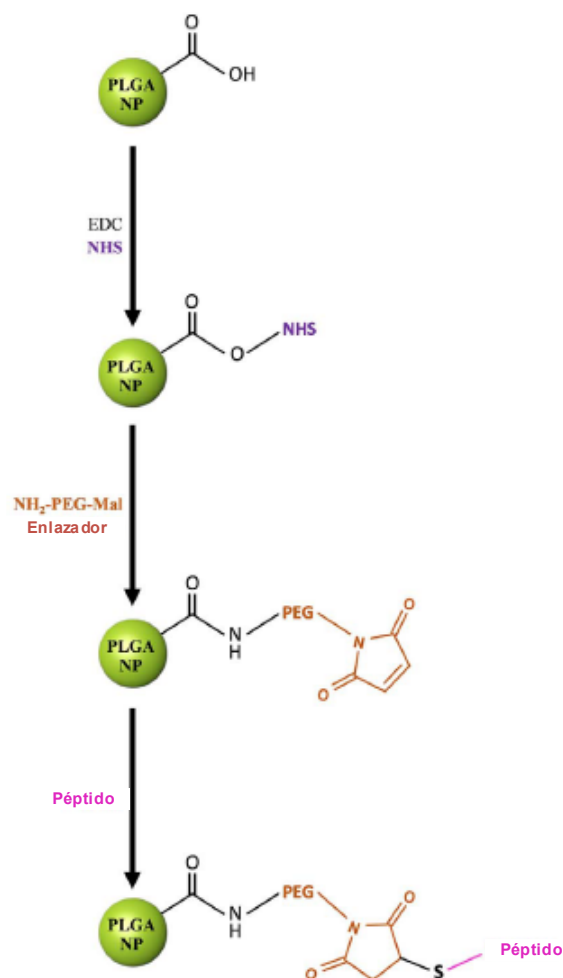


Figura 37. Grupos funcionales de las NP de PLGA durante las diferentes etapas del proceso de funcionalización con un péptido de unión al receptor de transferrina. EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; NHS: N-hidroxisuccinimida.

Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using micro fluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

Las NP obtenidas de esta funcionalización fueron evaluadas en los siguientes aspectos:

- **Confirmación de la presencia del péptido de unión al receptor de transferrina:** se utilizó espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (¹H NMR) para detectar las diferencias en los espectros de NP de PLGA funcionalizadas y no funcionalizadas ²⁸.

Toxicidad de las NP: se evaluó mediante el ensayo de viabilidad metabólica MTT utilizando las líneas celulares hCMEC/D3 y ND7/23. Se eligió la línea celular hCMEC/D3 debido a que las células endoteliales cerebrales representan el componente celular principal de BBB, mientras que las células ND7/23, se utilizaron como modelo de neuronas sensoriales del parénquima cerebral. Las células se incubaron con EFV libre, NP sin fármaco, NP sin fármaco funcionalizadas, NP con EFV y NP con EFV funcionalizadas, en concentraciones de 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 μM (en medio) por 24 h. Los cristales de formazán, resultantes de la reducción de MTT por las células viables, se solubilizaron en 200 μL de DMSO, para posteriormente medir la absorbancia a 590 y 630 nm. Se utilizó como control negativo (CN) células incubadas en medio basal endotelial 2 (EBM-2) con 1% de Triton X-100 (surfactante no iónico que lisa las células), y como control positivo (CP), células incubadas únicamente con EBM-2²⁸.

- **Ensayos de hemocompatibilidad:** utilizando eritrocitos ya que son las células más abundantes en el torrente sanguíneo y pueden experimentar deformaciones o daños en su membrana derivados de formulaciones farmacéuticas administradas por vía intravenosa²⁸.

Potencial hemolítico: los glóbulos rojos se aislaron de la capa leucocitaria. Una vez centrifugada la capa leucocitaria, se retiró la capa superior de plasma, para obtener la capa inferior que contenía los glóbulos rojos y se centrifugaron. Se colocaron 100 μL de glóbulos rojos en una concentración de 2×10^8 células/mL en tubos eppendorf, agregando 100 μL de EFV libre, NP sin carga, NP funcionalizadas sin carga, NP con EFV y NP funcionalizadas con EFV obteniendo una concentración final de éstas de 50, 5, 0.5, 0.05 y 0.005 μM en PBS. Los tubos Eppendorf se incubaron durante 3 h a 100 rpm y 37 °C. Posteriormente fueron centrifugados a 400 g durante 5 minutos para recolectar los sobrenadantes, que se transfirieron a placas de 96 pocillos para leer la absorbancia. Las absorbancias fueron determinadas a 380 nm (absorción de uroporfirina), 415 nm (absorción de hemoglobina), y 450 nm (absorción de uroporfirina). Teniendo como CP células incubadas con 1% de Triton X-100 y como CN células incubadas únicamente con PBS²⁸.

Integridad de la membrana celular y morfología de los glóbulos rojos: evaluada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Sembrando 1 mL de glóbulos rojos en una concentración de 4×10^5 células/mL en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) en placas de 6 pocillos. Agregando NP dispersadas en HBSS a los pocillos, para alcanzar una concentración final de 50 μ M de EFV, evaluando únicamente NP libres y NP cargadas con EFV. Como CN se utilizaron glóbulos rojos incubados únicamente con HBSS ²⁸.

- **Interacción célula-NP:**

Cuantificación de las NP asociadas a las células endoteliales de BBB: determinada mediante citometría de flujo. Se sembraron 100 μ L de células hCMEC/D3 en placas de 96 pocillos, resuspendiéndolas en 50 μ L de NP fluorescentes no funcionalizadas o funcionalizadas e incubándolas durante 3 h en hielo. Posterior a la incubación, las células se lavaron con PBS y se colocaron en tubos de citómetro. Se realizó un ensayo control de competencia incubando células con el péptido de unión al receptor de transferrina antes de agregar las NP funcionalizadas. Adicionalmente se analizó una muestra únicamente con células sin NP ²⁸.

Microscopía confocal láser de barrido: las células hCMEC/D3 se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 14 mm (400 μ L a una concentración de 2.5×10^5 células/mL), colocándolos dentro de una placa de 24 pocillos y recubriéndolos con colágeno tipo I durante 1 hora, permitiendo su unión durante la noche. Posteriormente se añadieron a cada pocillo 200 μ L de NP fluorescentes no funcionalizadas o funcionalizadas y se incubaron durante 3 h a 37 °C. Se realizó un ensayo control de competencia incubando células con el péptido de unión al receptor de transferrina antes de agregar las NP funcionalizadas ²⁸.

- **Evaluación de permeabilidad en BBB:**

Se sembraron 2.5×10^4 células/cm² de células hCMEC/D3 en insertos de cultivo celular 12-Transwell® (lado apical) ²⁸.

Antes de la siembra, los insertos se recubrieron con 90 μ L de colágeno tipo I de cola de rata en solución de ácido acético (0.02 M) durante 1 h, a 37 °C, y posteriormente se lavaron con PBS pH 7.4. El lado basolateral se llenó con 1.5 mL de medio. El sistema se mantuvo en la incubadora a 37 °C con 5% de CO₂ durante 8 días, reemplazando el medio cada 2 días. La monocapa de células hCMEC /D3 se volvió confluyente el día 8 después de la siembra, siendo éste, el día apropiado para realizar el estudio de permeabilidad. La integridad de la monocapa celular se verificó cada 2 días mediante el monitoreo de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) utilizando un medidor de Volt-Ohm endotelial. El estudio de permeabilidad se realizó en la dirección apical-basolateral. Después de retirar el medio de cultivo celular, el compartimento basolateral se llenó con 1.5 ml de Pluronic® F-127 al 0.2% en HBSS. Con respecto al compartimento apical, se añadieron 500 μ L de EFV 10 μ M, de forma libre o cargado en NP de PLGA. El ensayo se realizó a 37 °C utilizando una incubadora con agitador orbital (100 rpm). En diferentes puntos de tiempo (15, 30, 45, 60, 90 y 120 min), se tomaron muestras de 200 μ L del lado basolateral, reemplazando el volumen retirado con Pluronic® F-127 precalentado al 0.2% en HBSS. Todas las muestras se analizaron por HPLC, para cuantificar la cantidad de EFV ²⁸.

Los resultados de las evaluaciones de las NP obtenidas con relación al tamaño medio de partícula, PDI y potencial Z se encuentran en la **Tabla 8**. Las NP tanto cargadas con EFV como libres, presentaron propiedades similares en relación con los parámetros fisicoquímicos mencionados. Todas las formulaciones presentaron NP que cumplen con el requisito de un tamaño promedio por debajo de 200 nm, aspecto de gran importancia para lograr el direccionamiento de fármacos al cerebro. El tamaño de las NP obtenidas por microfluídica (alrededor de 70 nm) fue significativamente menor en comparación con la metodología convencional (alrededor de 133 nm). En comparación con la metodología convencional, la mezcla en plataformas microfluídicas suele ser más rápida que el tiempo necesario para producir la nucleación y el crecimiento de las NP. Por lo tanto, el polímero no puede adsorberse en gran medida a las NP recién formadas, generando partículas de menor tamaño. En relación con el PDI de las NP, los resultados no fueron significativamente diferentes entre los diferentes enfoques ²⁸.

Sin embargo, es necesario resaltar que la tecnología microfluídica fue capaz de proporcionar valores de PDI tan bajos como los obtenidos por la metodología convencional (alrededor de 0.1), lo que indica que ambos métodos son capaces de generar NP con una distribución de tamaño estrecho. Con respecto al potencial Z, los resultados demostraron un aumento significativo en la carga superficial al realizar la producción de NP por microfluídica, lo cual puede explicarse por un aumento en la cantidad de Tween®80 asociado con las partículas cuando se produjeron utilizando el enfoque microfluídico, haciendo que presente una carga menos negativa. En general, todas las formulaciones presentaron un potencial Z negativo, debido a los grupos carboxilo terminales del PLGA ²⁸.

La eficiencia de encapsulación asociada a las NP obtenidas por microfluídica fue significativamente mayor (alrededor del 80%) en comparación con la eficiencia de encapsulación de las NP obtenidas por nanoprecipitación, con una diferencia de alrededor del 50%. Adicionalmente la carga de fármaco experimentó un aumento significativo en las NP producidas por microfluídica (alrededor del 11%) en comparación con el método convencional (alrededor del 3%). Las diferencias en la eficiencia de encapsulación y la carga de fármaco entre los dos métodos puede atribuirse a la relación fija de mayor volumen entre la fase acuosa y orgánica en la plataforma microfluídica, en lugar de un aumento gradual en la relación de estas dos fases durante la nanoprecipitación. Además, es probable que una difusión más lenta del solvente en microfluídica promueva menos la migración simultánea del fármaco fuera de las NP durante el proceso de fabricación, generando una situación, en la que no se favorezca la presencia de EFV en la fase acuosa. Esto concuerda con lo reportado en estudios anteriormente realizados, donde se reporta que la microfluídica reduce el movimiento de las moléculas de la fase orgánica a la acuosa, promoviendo así la eficiencia de encapsulación de fármacos ²⁸.

Adicionalmente, la reducción en la pérdida de fármaco debido a menos pasos involucrados en la producción de NP por microfluídica en comparación con la mezcla secuencial convencional de fases puede contribuir a esta diferencia observada entre los dos métodos con respecto a la eficiencia de encapsulación y carga de fármaco en las NP ²⁸.

La combinación seleccionada de velocidades de flujo interno (2500 $\mu\text{L}/\text{min}$) y externo (3750 $\mu\text{L}/\text{min}$) permitieron unir el flujo del fármaco con la generación de nanosistemas y que las NP de PLGA se formaran a partir del extremo cónico del capilar interno en las mismas condiciones, incluida la concentración de fármaco/ polímero y tensioactivo, contribuyendo así a un mejor encapsulamiento de EFV ²⁸.

Tabla 8. Tamaño medio de partícula, PDI (índice de polidispersidad), potencial Z, eficiencia de encapsulación y carga de fármaco de NP de PLGA vacías y cargadas con EFV obtenidas mediante los métodos convencional (nanoprecipitación) y microfluídico.

Método	NP	Tamaño promedio	PDI	Potencial Z	Eficiencia de encapsulación	Carga de fármaco
Convencional	Vacías	134.0 \pm 2.7	0.092 \pm 0.009	-27.4 \pm 3.1	NA	NA
	Cargadas-EFV	133.0 \pm 3.6	0.090 \pm 0.010	-28.0 \pm 2.4	32.7 \pm 1.0	3.2 \pm 0.1
Microfluídica	Vacías	70.9 \pm 3.2***	0.085 \pm 0.003	-15.0 \pm 1.6**	NA	NA
	Cargadas-EFV	72.8 \pm 4.9	0.086 \pm 0.004	-14.1 \pm 1.3	80.7 \pm 8.3	10.8 \pm 1.1

** y *** denotan una diferencia significativa de $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente (comparación entre las NP vacías y las NP cargadas con EFV resultantes de ambos métodos). Tabla modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using micro fluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

El análisis por MET (**Figura 38**) reveló partículas de forma redonda con superficies relativamente lisas. No se encontraron diferencias morfológicas aparentes entre las NP resultantes de los dos métodos de producción. De acuerdo con las imágenes, el PDI de las NP de ambos métodos demostró ser similar ²⁸.

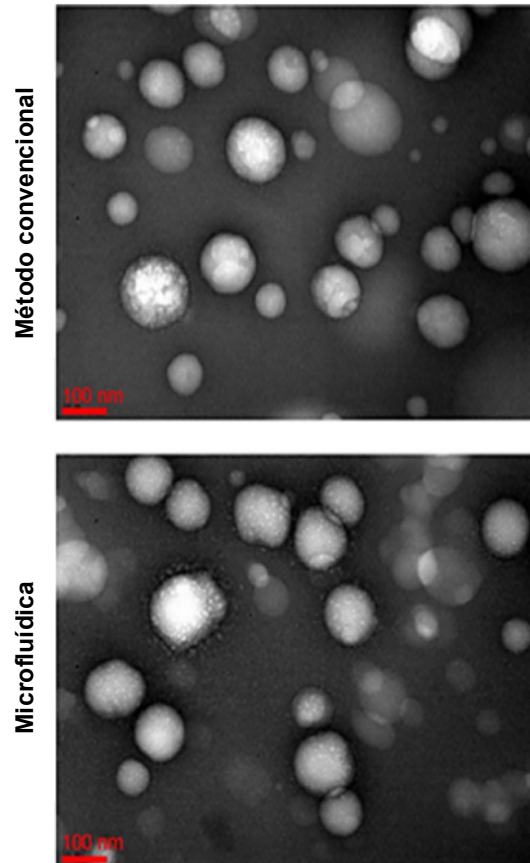


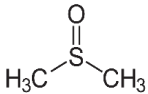
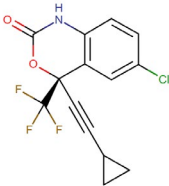
Figura 38. Imágenes de MET de NP de PLGA cargadas con EFV producidas mediante el método convencional y microfluídico.

Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using microfluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

El EDS se utilizó para el mapeo elemental de las NP de PLGA cargadas con EFV, producidas mediante los métodos de nanoprecipitación y microfluídica (**Tabla 9**). Con base en que los disolventes orgánicos deberían estar presentes en cantidades mínimas en los productos farmacéuticos finales, debido a su capacidad de aumentar los fenómenos de toxicidad, y provocar cambios en las propiedades organolépticas de las formulaciones, surgió la necesidad de evaluar la cantidad de disolvente remanente en las NP. Adicionalmente, el análisis de EDS también fue útil para informar la cantidad de EFV asociada las NP, producidas por microfluídica o nanoprecipitación. De tal modo, el análisis se centró en la detección de azufre (S) y flúor (F), componentes químicos del DMSO y EFV respectivamente, de una sola NP. Como era de esperar, los resultados confirmaron la

presencia de los elementos carbono y oxígeno en todas las formulaciones de las NP, resultado de la presencia del polímero y el tensioactivo utilizado en el proceso de producción (Tween 80). Con relación al S, no se encontraron diferencias en el contenido de DMSO entre los dos métodos de fabricación, evidenciando que la microfluídica no implica un aumento en la cantidad de solvente orgánico asociado a las NP. Por otro lado, con lo que respecta al F, se observó una diferencia significativa entre los dos métodos de obtención; el método microfluídico, permitió la formación de NP con niveles detectables de F aproximadamente dos veces más altos que el método convencional, lo que confirma una asociación exitosa del EFV con las NP al utilizar el método de producción microfluídico ²⁸.

Tabla 9. Análisis de espectro de rayos X por energía dispersiva (EDS) de NP de PLGA cargadas con EFV producidas mediante los métodos convencional y microfluídico.

Elemento	Sustancia asociada	Método de obtención de NP	Cantidad promedio detectada del elemeto (%)
S	<p style="text-align: center;">DMSO</p> 	Convencional	0.04 ± 0.02
		Microfluídica	0.02 ± 0.03
F	<p style="text-align: center;">EFV</p> 	Convencional	0.15 ± 0.10
		Microfluídica	0.37 ± 0.07*

Los resultados se presentan como media ± DE (n = 5).

S: azufre; F: flúor; DMSO: dimetilsulfóxido; EFV: Efavirenz.

* denota una diferencia significativa de $p < 0.05$ (comparación entre cada grupo de sustancia asociada).

Tabla modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using micro fluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

Los resultados obtenidos hasta este punto sugirieron que el método microfluídico podría ser de gran ventaja, proporcionando NP de tamaño adecuado para permitir el cruce de BBB, lotes monodispersos y una alta eficiencia de asociación NP-fármaco ²⁸.

Además de tratarse de una técnica rápida y de fácil uso en comparación con el método convencional. Por lo tanto, para proceder con los siguientes experimentos, que incluyen la caracterización biológica de las NP y el direccionamiento cerebral, se seleccionó la formulación producida por microfluidos ²⁸.

El perfil de liberación de EFV de las NP de PLGA producidas por microfluídica (**Figura 39**) se caracterizó por un efecto de explosión inicial, con alrededor del 30% del fármaco recuperado en el medio en los primeros 30 minutos. Esto podría deberse a la cantidad de fármaco que se encontraba cerca o adherido a la superficie de las NP. Por el contrario, la cantidad de fármaco contenida en el núcleo de las NP se liberó durante un período de tiempo más prolongado, presentando una liberación de EFV de alrededor del 50% en las primeras 24 h. El mecanismo responsable de la liberación de EFV podría señalarse como resultado de la difusión del fármaco a través del PLGA e incluso, de la degradación, erosión e hinchazón de la superficie de las NP. Se presenta un comportamiento de liberación sostenida, debido a que la estructura interna de las NP se encuentra compactada, evitando la penetración de agua, promoviendo así, una difusión relativamente baja del fármaco fuera de las NP ²⁸.

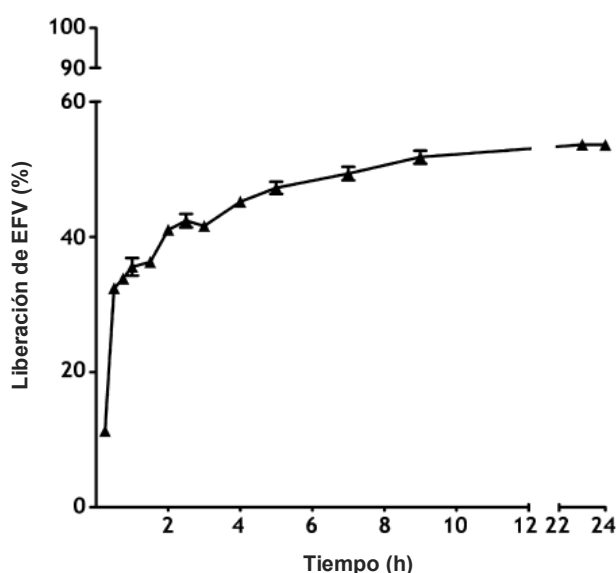


Figura 39. Perfil de liberación *in vitro* de EFV de NP de PLGA producidas mediante microfluídica.

Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using micro fluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

En cuanto a las NP funcionalizadas, mediante el análisis de sus espectros de ^1H NMR (**Figura 40**) se confirmó la presencia de pequeños picos a -0.008 y -0.017 ppm, que se describen en la literatura como trazas de la presencia del péptido, estando relacionados con los protones alquilo de sus residuos de aminoácidos ²⁸.

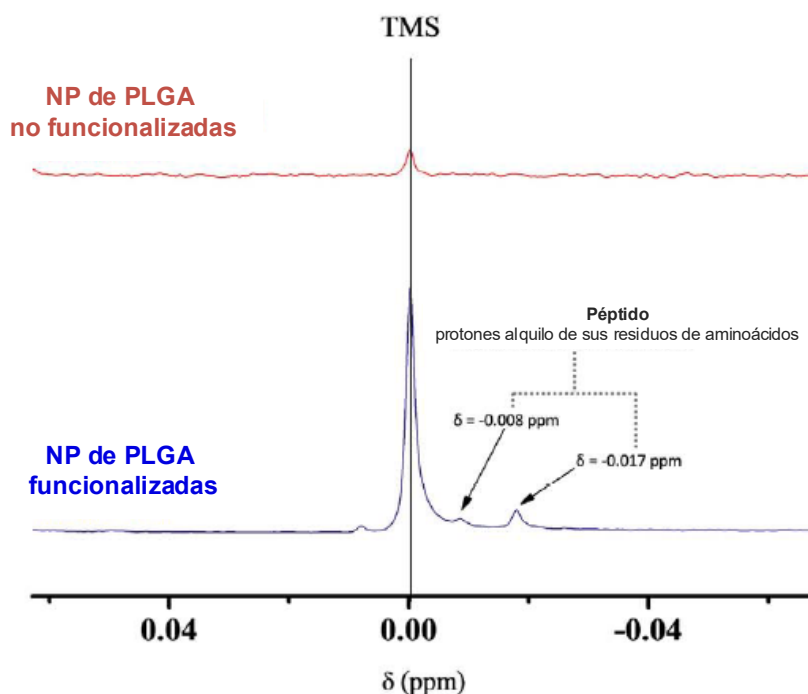


Figura 40. Análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (^1H NMR) de NP de PLGA no funcionalizadas y funcionalizadas con péptido de unión al receptor de transferrina.

Los espectros de ambos tipos de NP se encuentran cerca de 0.00 ppm, donde los picos a 0.008 y 0.017 ppm son visibles y se describen como trazas de la presencia del péptido de unión al receptor de transferrina. El análisis se realizó a temperatura ambiente en un espectrómetro Brüker AMX 300, operando a 400.13 MHz, con cada valor de desplazamiento químico (δ) expresado en relación con el tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using micro fluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

La determinación de la viabilidad celular *in vitro* de las líneas celulares hCMEC/D3 y ND7/23 tratadas con diferentes concentraciones de EFV libre, NP sin fármaco, NP sin fármaco funcionalizadas, NP con EFV y NP con EFV funcionalizadas, se muestra en la **Figura 41A** y **41B**, respectivamente ²⁸.

La actividad metabólica de las células endoteliales de BBB y las células neuronales se encontró siempre por arriba del 90% y 70%, respectivamente, al estar en contacto con todas las variantes de NP y concentraciones evaluadas. Por lo tanto, las formulaciones de las NP de PLGA se consideran no tóxicas. La concentración 100 μ M de EFV libre demostró causar daños graves a ambos tipos de células, lo que resultó en la ausencia total de actividad metabólica. Los resultados de la actividad metabólica celular, relacionada con las NP sin fármaco (> 90%) para ambos tipos de células, confirmaron una baja contribución de la matriz de las partículas a la aparición de fenómenos de citotoxicidad. Por otro lado, se pueden observar diferencias significativas en la actividad metabólica al comparar concentraciones iguales entre el grupo de NP cargadas con EFV contra EFV libre. Las NP cargadas con EFV proporcionaron una mayor actividad metabólica celular que el fármaco libre, siendo posible afirmar que la citotoxicidad celular asociada al EFV libre se puede disminuir al encapsular el fármaco en NP, demostrando que estos nanoportadores tienen un papel protector para la administración de EFV en las líneas celulares seleccionadas. Además, las NP cargadas con EFV funcionalizadas demostraron tener perfiles de actividad metabólica similares a los de las NP cargadas con EFV sin funcionalizar, lo que indica que el proceso de funcionalización con el péptido no influye en la seguridad de los nanosistemas. En general, se puede decir que la línea celular neuronal fue propensa a presentar valores más pequeños de actividad metabólica en comparación con la línea celular endotelial. Esto puede deberse a uno de los principales metabolitos del EFV, el 8-hidroxi-efavirenz, que se encuentra asociado con citotoxicidad en cultivos neuronales²⁸.

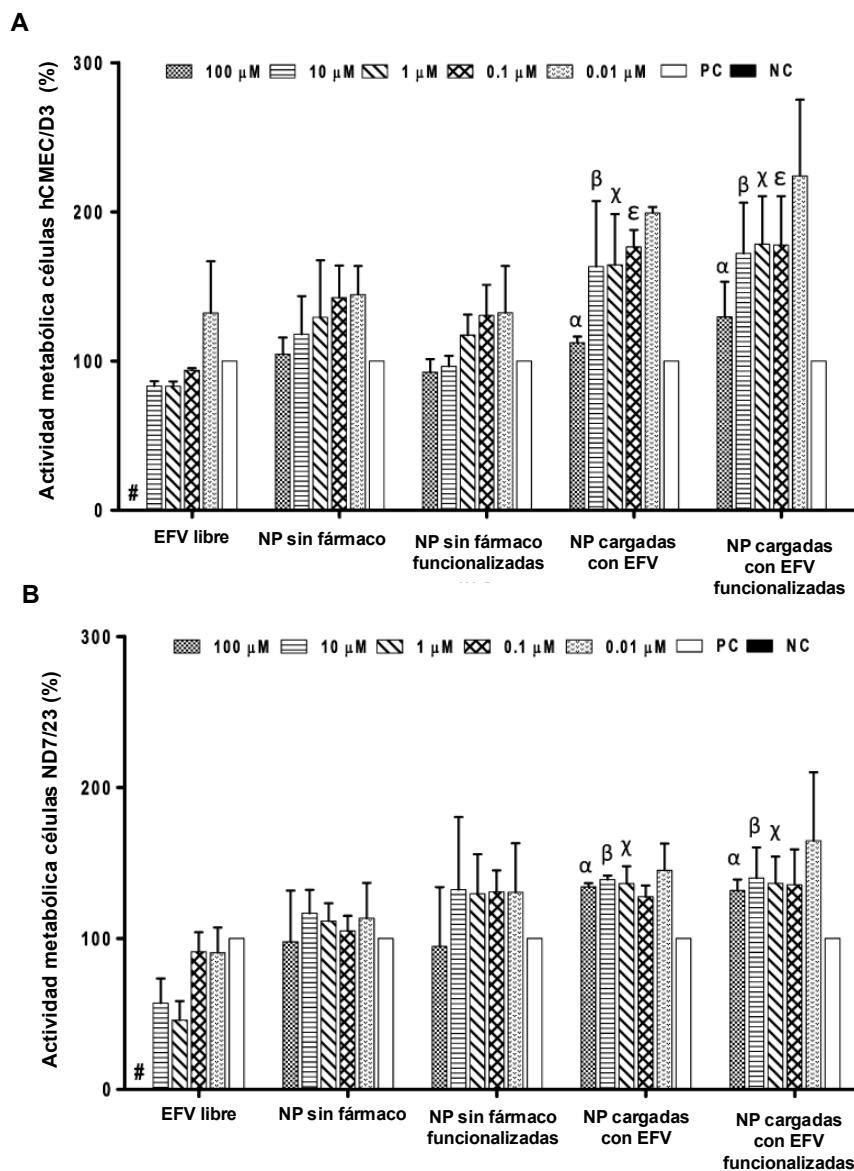


Figura 41. Actividad metabólica de las células hCMEC/D3 y ND7/23 incubadas con diferentes concentraciones de EFV libre, NP sin fármaco, NP sin fármaco funcionalizadas, NP cargadas con EFV y NP cargadas con EFV funcionalizadas durante 24 h. **A)** Actividad metabólica de las células hCMEC/D3: # denota una diferencia significativa entre EFV libre 100 μM y las otras concentraciones en el mismo grupo. Los grupos de NP cargadas con EFV y NP cargadas con EFV funcionalizadas se compararon con el EFV libre, estando α, β, χ y ε relacionados con una diferencia significativa de $p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.05$ y $p < 0.05$, respectivamente (comparación entre concentraciones iguales). NC: control negativo células incubadas en medio basal endotelial 2 (EBM-2) con 1% de Triton X-100; PC: control positivo células incubadas únicamente con EBM-2. **B)** Actividad metabólica de las células ND7/23: # denota una diferencia significativa entre EFV libre 100 μM y las otras concentraciones en el mismo grupo. Los grupos de NP cargadas con EFV y NP cargadas con EFV funcionalizadas se compararon con el EFV libre, estando α, β y χ relacionados con una diferencia significativa de $p < 0.001$, $p < 0.01$ y $p < 0.01$, respectivamente (comparación entre concentraciones iguales). NC: control negativo células incubadas en medio basal endotelial 2 (EBM-2) con 1% de Triton X-100; PC: control positivo células incubadas únicamente con EBM-2. Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using micro fluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

Con relación a la hemo compatibilidad; los resultados para la hemólisis se muestran en la **Figura 42**. El porcentaje de hemólisis, para todas las muestras a todas las concentraciones analizadas, fue siempre inferior al 2%, lo que corresponde a concentraciones de hemoglobina entre 2.1 y 3.7 mg/dL, no encontrando diferencia significativa entre los diferentes grupos, donde el porcentaje de hemólisis calculado para el CN fue 0% y para el CP 100%, correlacionándose con una concentración de hemoglobina de 0.1 mg/dL y 209.5 mg/dL, respectivamente. Así, los resultados obtenidos demuestran que ni el fármaco libre, las NP sin fármaco, ni las NP con EFV se consideran dañinas para los glóbulos rojos. En cuanto a las NP funcionalizadas, éstas demostraron tener un perfil hemolítico similar a las NP no funcionalizadas, demostrando, que el proceso de funcionalización no afecta la hemocompatibilidad de las nanoformulaciones. De acuerdo con la guía para la hemólisis *in vitro* descrita por Johnson & Johnson y Novartis Pharmaceuticals Corporation, los porcentajes de hemólisis por debajo del 10% están relacionados con formulaciones no hemolíticas, mientras que los porcentajes de hemólisis por encima del 25% se asocian con formulaciones hemolíticas. Por tanto, los nanosistemas de PLGA desarrollados se consideraron no hemolíticos. Para descartar hemolisis por efectos de osmolaridad, se midió la osmolaridad de las formulaciones, encontrando a todas ellas con valores de osmolaridad dentro del rango de osmolaridad sanguínea (285-300 mOsm/L), por tanto, no se espera que ocurra hemólisis relacionada con osmolaridad ²⁸.

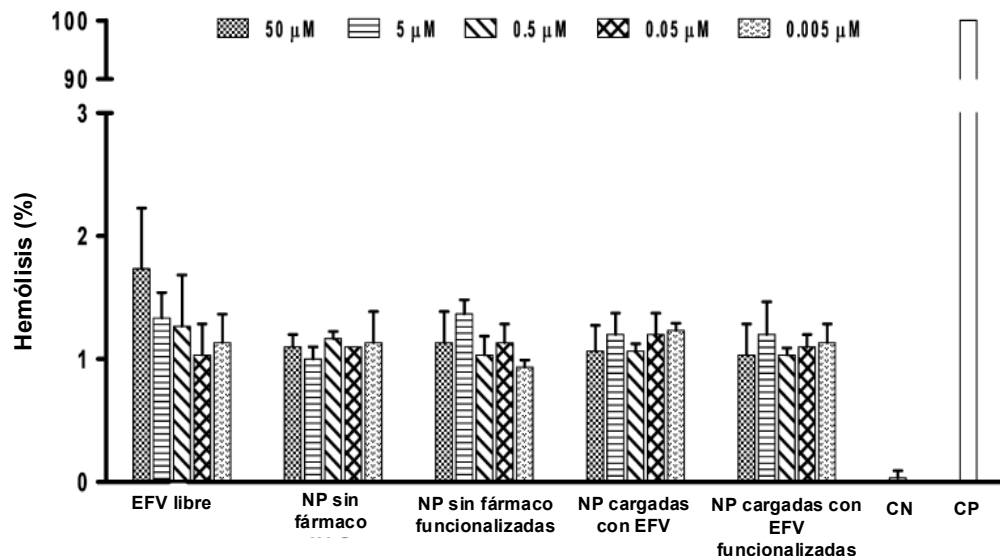


Figura 42. Porcentaje de hemólisis asociado con EVF libre, NP sin fármaco, NP sin fármaco funcionalizadas, NP cargadas con EFV y NP cargadas con EFV funcionalizadas. CN: Control Negativo; y CP: Control Positivo, consistieron en células incubadas únicamente con PBS y con 1% de Triton X-100, respectivamente.

Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using microfluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

La morfología de los eritrocitos, después de su interacción con las NP, se observa en la **Figura 43**. Tanto los eritrocitos tratados con NP libres, como los tratados con NP cargadas con EFV, 50 μ M, presentaron un comportamiento similar al de los glóbulos rojos del CN. Por tanto, se puede decir, que no se observan cambios morfológicos considerables en las células. Así, con estas dos determinaciones se apoya la teoría de que las formulaciones de las NP evaluadas son hemocompatibles y, por lo tanto, podrían ser seguras para la administración intravenosa ²⁸.

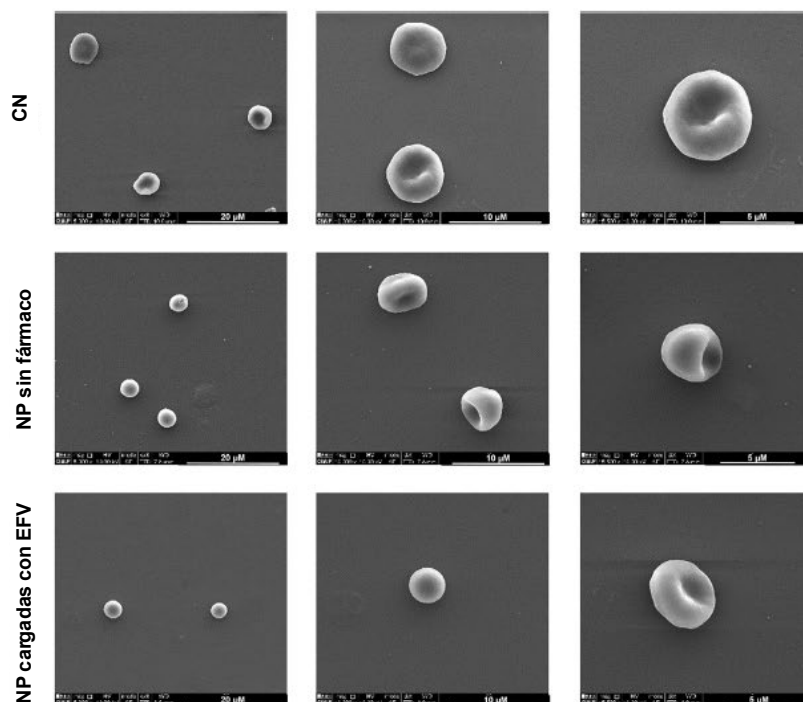


Figura 43. Imágenes de MEB de la morfología de glóbulos rojos posterior a su incubación con 50 μM de NP sin fármaco y NP cargadas con EFV, durante 3 h. No se encontraron diferencias morfológicas relevantes entre los tres grupos. CN: glóbulos rojos incubados únicamente con HBSS.

Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using microfluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

La interacción entre NP no funcionalizadas y funcionalizadas con células endoteliales de BBB humanas (hCMEC/D3) se evaluó cuantitativamente mediante citometría de flujo y cualitativamente mediante microscopía confocal laser de barrido ²⁸.

Los resultados de citometría de flujo de las muestras analizadas se expresaron como Intensidad de Fluorescencia Media (IFM). En la **Figura 44** se puede observar que las NP funcionalizadas producidas por microfluídica interactuaron con las células endoteliales de BBB en mayor medida que las no funcionalizadas, lo que lleva a un valor significativamente mayor de IFM ²⁸.

Por tanto, la funcionalización peptídica de las NP, hacia el receptor de transferrina, aumenta la interacción y la unión a la superficie y/o internalización de los nanosistemas en las células. El análisis de microscopía confocal (**Figura 45**) evidenció un aumento en la fluorescencia asociada a las NP funcionalizadas acumulada en las células hCMEC/D3, en comparación con las NP no funcionalizadas. Por lo tanto, la citometría de flujo y la microscopía confocal corroboran el resultado de la RMN y demuestran el logro de una unión exitosa del péptido a las NP de PLGA producidas por microfluidos. Para verificar aún más el papel específico del péptido de unión al receptor de transferrina utilizado para funcionalizar las NP, se evaluó la interacción de los nanosistemas funcionalizados en presencia de péptido libre, actuando como competidor por la unión al receptor. Como se muestra en la **Figura 44**, el péptido libre disminuye la interacción entre las NP funcionalizadas y las células endoteliales de BBB, a niveles similares a los observados para las NP no funcionalizadas, lo que sugiere que las NP funcionalizadas interactuaban con las células hCMEC/D3 específicamente a través del receptor de transferrina. Es decir, las NP utilizan un mecanismo activo de transporte, donde el receptor se asocia con una endocitosis mediada por clatrina. Las imágenes de microscopía confocal (**Figura 45**) respaldan el papel clave de este receptor en la interacción de las NP funcionalizadas con las células, demostrando similitudes entre el comportamiento del control (adición de péptido libre antes de las NP funcionalizadas) y las NP no funcionalizadas²⁸.

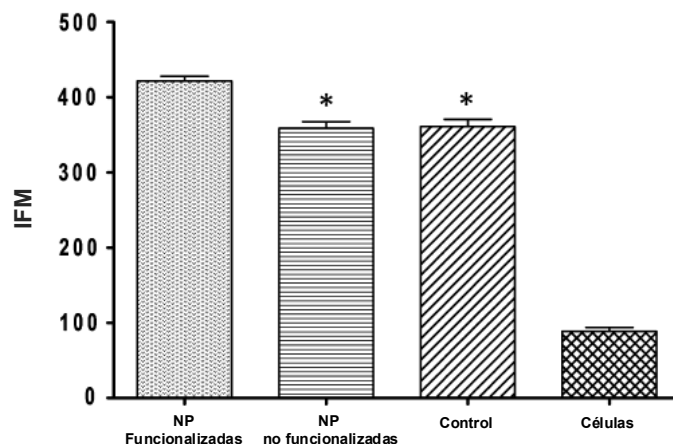


Figura 44. Nivel de interacción entre las células hCMEC/D3 y las NP de PLGA producidas por microfluídica, funcionalizadas y no funcionalizadas. La determinación se llevó a cabo mediante citometría de flujo (después de 3 h de incubación) y se reportó como Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) \pm SD. *Denota una diferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar las NP funcionalizadas con péptido de unión al receptor de transferrina tanto con NP no funcionalizadas como con el control, que consistió en la adición de péptido libre antes de la adición de NP funcionalizadas (ensayo de competencia). Adicionalmente se analizó una muestra únicamente con células sin NP (células). Datos ($n=3$) ilustrativos de tres experimentos independientes.

Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using microfluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

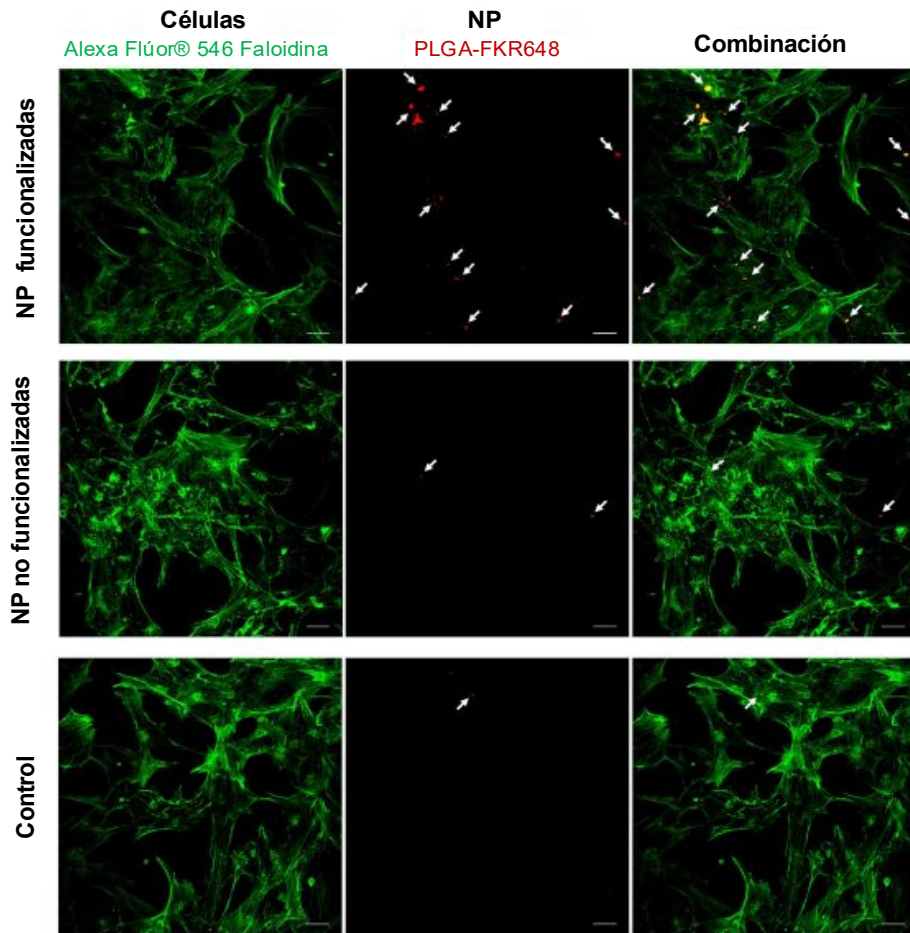


Figura 45. Nivel de interacción entre células hCMEC/D3 y NP de PLGA producidas por microfluidos funcionalizadas con péptido de unión al receptor de transferrina. Analizado cualitativamente mediante microscopía confocal (después de 3 h de incubación). Las células están marcadas en verde y las NP en rojo. Las flechas blancas evidencian NP asociadas con células. El grupo control consistió en la adición de péptido libre antes de la adición de NP funcionalizadas (ensayo de competencia). Las barras de escala representan 20 μm .

Alexa Flúor® 546 Faloidina: la faloidina es un péptido usado comúnmente en aplicaciones de imágenes para marcar selectivamente F-actina. La faloidina se une a la F-actina con alta selectividad, mientras que Alexa Flúor® 546 proporciona la fluorescencia.²⁹

PLGA-FKR648: PLGA marcado con Flamma 648, colorante fluorescente que emite fluorescencia roja, siendo su extensión máxima 648 nm. Utilizado comúnmente para evaluar capacidad de atravesar BBB.

Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using microfluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019)²⁸.

Por último, para comprender hasta qué punto los nanosistemas podrían mejorar la biodisponibilidad del fármaco a través de BBB, se evaluó la permeabilidad mediante un modelo *in vitro* de BBB basado en células hCMEC/D3. De la verificación de la integridad de la monocapa celular antes de que la membrana se volviera confluyente, se obtuvieron valores de TEER dentro del rango 40-70 Ω cm², lo que demuestra la integridad de la monocapa celular. La permeación de EFV a través del modelo *in vitro* de BBB fue alrededor de 1.3 veces mayor al utilizar NP de PLGA como portadores del fármaco (NP funcionalizadas y no funcionalizadas), en comparación con el fármaco libre, durante el marco de tiempo experimental de 120 min. (**Figura 46**). El aumento en la permeabilidad de EFV puede estar asociado con la capacidad de las NP para mejorar la escasa solubilidad acuosa del fármaco, lo que conduce a mejorar su biodisponibilidad en BBB y, en un mejor cruce de esta barrera. En cuanto a la permeabilidad de las NP con EFV no funcionalizadas y funcionalizadas, no se encontraron diferencias significativas entre ellas (**Figura 46**). Aunque la funcionalización demostró ser capaz de dirigir eficazmente las NP a BBB, no pudo promover una mayor permeación de EFV a través de la monocapa de células hCMEC/D3. Lo cual puede explicarse por el rápido reciclaje asociado con el receptor de transferrina. Con base en la literatura, este receptor tiene un tiempo medio de pre-reciclaje de alrededor de 10 min después de la internalización, lo que limita la vía transcitótica y, en consecuencia, la permeación mediada por el receptor de las NP funcionalizadas a través de BBB. Por lo tanto, el tráfico endosómico asociado con el receptor de transferrina puede verse comprometido debido al carácter altamente dinámico y transitorio de los endosomas. Además, más allá de la formación del endosoma durante la internalización celular, la endocitosis mediada por clatrina puede seguir la vía de degradación lisosómica²⁸.

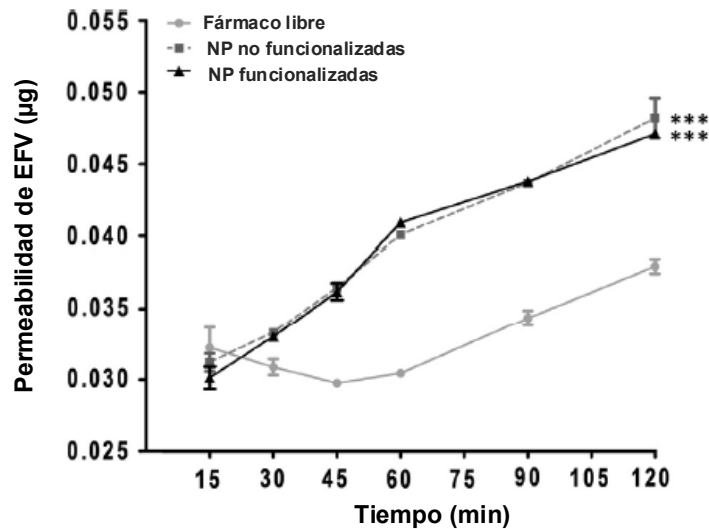


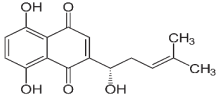
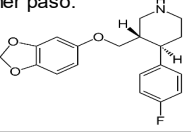
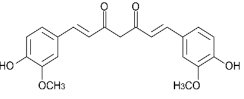
Figura 46. Permeabilidad de EFV en forma libre, así como cargado en NP no funcionalizadas o funcionalizadas, a través de un modelo de BBB *in vitro*. Los datos se representan como media \pm DE (n=3). *** Denota una diferencia significativa ($p < 0.001$) cuando se compara la permeabilidad del EFV libre con el EFV cargado en ambos nanosistemas.

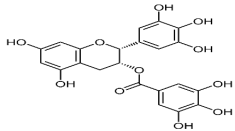
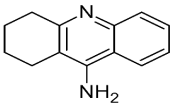
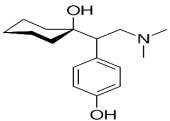
Imagen modificada de: Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using micro fluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019) ²⁸.

En resumen, en este ejemplo de aplicación, el método de microfluidos demostró ser una técnica de obtención de NP de PLGA cargadas con EFV rentable, destacando un tamaño más pequeño y una eficiencia de encapsulación y carga de fármaco notablemente mayor, en comparación con el método convencional de nanoprecipitación. Las NP producidas, demostraron cumplir con los requisitos de seguridad necesarios para ser administrados por vía intravenosa, con especial énfasis en la efectividad para evitar la citotoxicidad en relación con el EFV libre. El direccionamiento funcional adicional de las NP permitió promover su deposición en BBB, y se espera que controle la biodistribución de este fármaco anti-VIH. Aunque la estrategia de funcionalización no pudo potenciar la permeabilidad del EFV a través de BBB, se lograron mejoras considerables en la biodisponibilidad del fármaco en este sitio biológico a través de los nanosistemas, abriendo las puertas a futuros avances en terapias contra la neuropatología del VIH. Así pues, se estarían sentando las bases para probar la eficacia de esta nanofomulación desarrollada, en modelos de cultivo de células infectadas por el VIH, así como en condiciones *in vivo* ²⁸.

6.7 Ejemplos adicionales de aplicación de NP de PLGA para favorecer el direccionamiento cerebral.

Tabla 10. Otros ejemplos de aplicación de NP de PLGA con direccionamiento al cerebro.

NP	Función	Tipo de fármaco	Método	Diámetro	Eficiencia de encapsulación	Carga de fármaco	Modelo de evaluación
NP de PEG-PLGA cargadas con Shikonina funcionalizadas con lactoferrina. ³⁰	Glioma	Fármaco de escasa solubilidad, bajo tiempo de retención y biodisponibilidad. Es un compuesto de naftoquinona aislado de la raíz de <i>Lithospermum erythrorhizon</i> . 	Emulsificación-evaporación de solvente: emulsión única	174 nm	92.45%	15.57%	* Células de glioma de rata (células C6) * Ratas Sprague Dawley
NP de PLGA cargadas con Paroxetina. ³¹	Depresión y ansiedad	Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, fármaco altamente lipofílico con vida media de alrededor de 21 horas, biodisponibilidad oral baja debido a metabolismo del primer paso. 	Nanoprecipitación	184.20 nm	86.03%	14.06%	Línea celular de neuroblastoma de ratón (Neuro-2a, ATCC CCL-131)
NP de PLGA cargadas con Curcumina. ³²	Deterioro motor y déficit de memoria: estrés oxidativo	Polifenol dietético derivado del rizoma de <i>Curcuma longa</i> con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias sirviendo como agente neuroprotector. Presenta baja biodisponibilidad, y metabolismo rápido. 	Nanoprecipitación	114.9 nm	93.61%	4.80%	Ratas macho Sprague Dawley

NP	Función	Tipo de fármaco	Método	Diámetro	Eficiencia de encapsulación	Carga de fármaco	Modelo de evaluación
NP de PLGA PEGiladas cargadas con epigallocatequina-3-galato (EGCG). ³³	Epilepsia	<p>Polifenol más abundante en el té verde con actividad antioxidante. Molecula de baja estabilidad: disminuye significativamente la cantidad total de EGCG en pocas horas, disminuyendo su biodisponibilidad y eficacia.</p> 	Emulsificación-evaporación de solvente: emulsión doble	169 nm	95.00%	No evaluado	<p>* Astrocitos, células bEnd.3 y PC12 * Ratones wild-type C57BL/6J de un mes de edad</p>
NP de PLGA recubiertas de protamina cargadas con Tacrina. ³⁴	Alzheimer	<p>Inhibidor reversible de la acetilcolinesterasa de actividad central. Sufre metabolismo del primer paso, presentando biodisponibilidad baja (17-24%).</p> 	Nanoprecipitación	167.33 nm	20.56%	No evaluado	Ratas albinas Wistar macho
NP de PLGA-quitosano cargadas con Desvenlafaxina. ³⁵	Depresión	<p>Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina de segunda generación. Metabolito activo de la venlafaxina. con una biodisponibilidad oral del 80% y una vida media plasmática de 11 h. La terapia oral se asocia con varios efectos secundarios: aumento de presión y frecuencia arterial, estreñimiento, agitación, temblor, sudoración, náuseas, dolor de cabeza, y alteraciones del sueño.</p> 	Emulsificación-evaporación de solvente: emulsión única	172 nm	76.40%	38.80%	Ratas Wistar macho

7. Estado actual y desafíos de las NP de PLGA como sistemas de liberación de fármacos novedosos en aplicaciones clínicas.

La investigación y el desarrollo (I&D) en la industria farmacéutica, son dos actividades clave que juegan un papel importante para los nuevos fármacos revolucionarios, incluidas las nuevas entidades moleculares (NEM) y las formas farmacéuticas novedosas. En los últimos años, existe una brecha significativa entre el aumento de la productividad y el gasto en I&D, ya que la productividad de las NEM es considerablemente lenta. Los costos de las NEM están creciendo significativamente a una tasa promedio del 13.4% anual. Sin embargo, la tasa de éxito de las NEM en los ensayos clínicos es aproximadamente del 10%. En 2019, solo 48 NEM fueron aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA) ³⁶. Los altos costos de I&D y la baja producción de NEM han llevado a muchas compañías farmacéuticas a desarrollar sistemas avanzados de administración de fármacos. El gasto en I&D de las nuevas formulaciones es mucho menor que el de las NEM. Además, los productos farmacéuticos actuales están lejos de tener un rendimiento óptimo en la práctica clínica debido a su baja solubilidad, escasa estabilidad y escaso efecto de focalización. Por lo tanto, actualmente, se están desarrollando diferentes formas de dosificación y sistemas de administración de fármacos novedosos (como es el caso de las NP de PLGA) para promover la eficacia clínica de los fármacos, reducir su toxicidad, mejorar el apego al tratamiento por parte del paciente y prolongar en gran medida el ciclo de vida de las NEM ³⁷.

Como se observó en los capítulos anteriores, la vía de administración es un factor de gran importancia a considerar para lograr la focalización del fármaco. La vía de administración de los productos farmacéuticos comercializados actualmente se muestra en la **Figura 47**. En general, la vía de administración oral (62.02%) representa la mayor parte de los productos farmacéuticos, seguida de inyección (22.43%), cutánea (8.70%), mucosa (5.22%), inhalación (1.21%) y otros (0.42%) (**Figura 47A**). Los resultados muestran que la administración oral sigue siendo la vía más atractiva debido al alto apego al tratamiento por parte del paciente y la facilidad de administración ³⁷.

Es más probable que las compañías de medicamentos genéricos desarrollen formulaciones con vías de administración tradicionales en comparación con los medicamentos nuevos. Aspecto que puede ser observado en la **Figura 47B**, donde la proporción de productos genéricos orales ha superado el 60% ³⁷. Sin embargo, como se mostró en el capítulo 6 “Ejemplos de aplicaciones de NP de PLGA para el direccionamiento cerebral”, la vía de administración oral, no siempre resulta ser la mejor opción para lograr el direccionamiento deseado del fármaco, ya que éste es susceptible de sufrir degradación por el metabolismo del cuerpo, como sería el caso del efecto del primer paso.

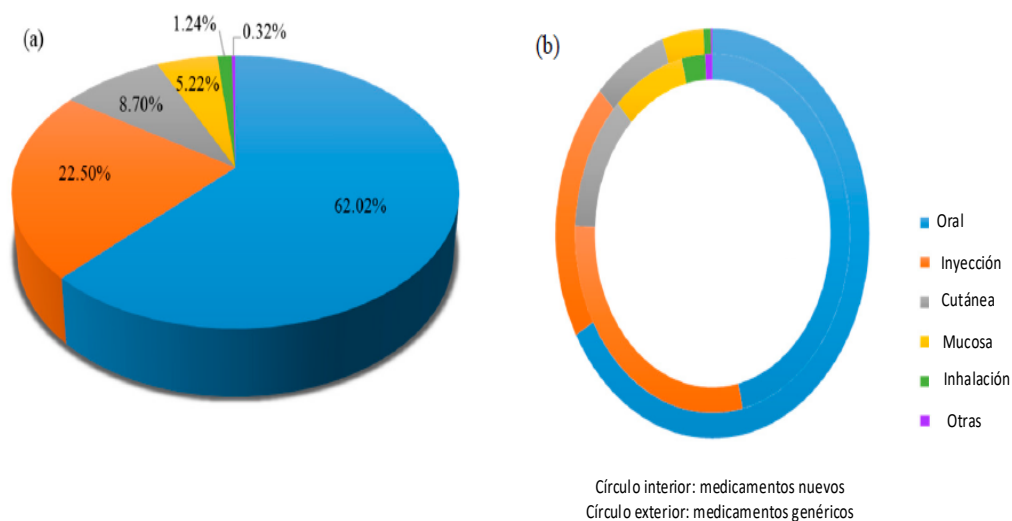


Figura 47. Vía de administración de productos farmacéuticos comercializados actualmente. (a) Distribución general de la vía de administración de los productos farmacéuticos aprobados por la FDA.(b) Proporción de la vía de administración. El círculo interior representa medicamentos nuevos, mientras que el círculo exterior medicamentos genéricos. Imagen modificada de: Zhong, H., Chan, G., Hu, Y. & Hu, H. A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products. 1–19 (2018). doi:10.3390/pharmaceutics10040263 ³⁷.

La relación mostrada entre medicamentos genéricos y medicamentos nuevos se utiliza para evaluar el nivel de barreras técnicas y la capacidad del mercado. En términos generales, cuanto menores son las barreras técnicas y mayor la capacidad del mercado, mayor es la proporción entre el medicamento genérico y el nuevo medicamento. La **Tabla 11** muestra el valor de la proporción de diferentes vías de administración (oral: 4.69 > inyección: 2.29 > cutánea: 2.03 > mucosa: 1.61 > inhalación: 0.92) ³⁷.

La proporción más alta, en la vía de administración oral, simboliza una barrera técnica más baja. Por lo tanto, es más probable que los medicamentos con vía de administración oral de marca tengan problemas con la entrada de medicamentos genéricos posterior a que expiren las patentes. Por el contrario, los sistemas de administración por inhalación, con una proporción baja, muestran una barrera técnica alta. Los nuevos medicamentos por inhalación pueden disfrutar de un período más prolongado de exclusividad comercial, debido a la alta barrera técnica a la entrada de fabricantes genéricos³⁷. Poniendo así, a las NP de PLGA como una ventaja competitiva en el mercado farmacéutico.

Tabla 11. Relación entre la cantidad de medicamentos genéricos y medicamentos nuevos.

Posición	Vía de administración	Medicamentos nuevos	Medicamentos genéricos	Proporción
1	Oral	1119	5252	4.69
2	Inyección	702	1609	2.29
3	Cutánea	295	599	2.03
4	Mucosa	205	331	1.61
5	Inhalación	66	61	0.92

Tabla modificada de: Zhong, H., Chan, G., Hu, Y. & Hu, H. A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products. 1–19 (2018). doi:10.3390/pharmaceutics10040263³⁷.

Los sistemas de liberación de fármacos (DDS) novedosos como las NP, se han estudiado ampliamente tanto en lo académico como en la industria farmacéutica. Ha habido un aumento importante en el número de publicaciones y ensayos clínicos sobre nuevos DDS durante las últimas tres décadas. Sin embargo, debido a la alta barrera técnica existente en este tipo de productos, se puede observar una brecha significativa entre la fabricación del producto y la entrada de la investigación³⁷.

En la **Figura 48**, se clasifican 10 DDS en 4 tipos según dos parámetros (la proporción entre los ensayos clínicos globales y las publicaciones globales y la proporción de productos aprobados por la FDA con respecto a los ensayos clínicos en EUA.) (los datos para el cálculo de las proporciones se muestran en la **Tabla 12**). El eje horizontal representa la eficiencia traslacional: la relación entre los ensayos clínicos globales y las publicaciones globales³⁷.

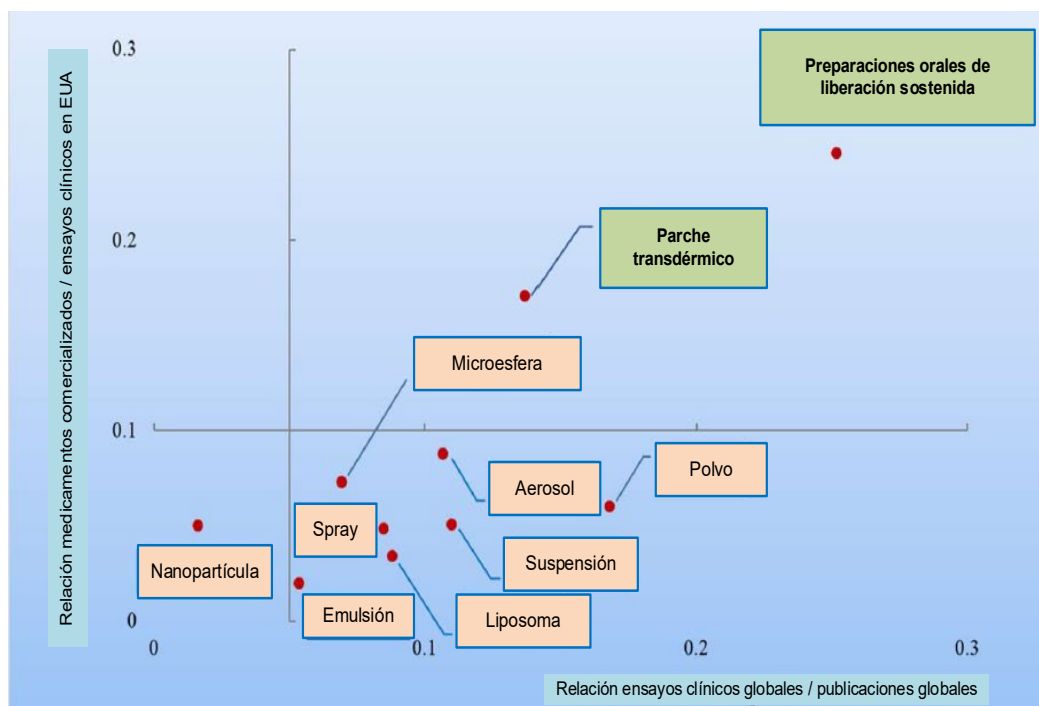


Figura 48. Clasificación de 10 sistemas de liberación de fármacos (DDS) con base en la proporción de los ensayos clínicos globales y las publicaciones globales (eje horizontal), y la proporción de productos aprobados por la FDA con respecto a los ensayos clínicos en EUA (eje vertical).

Imagen modificada de: Zhong, H., Chan, G., Hu, Y. & Hu, H. A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products. 1–19 (2018). doi:10.3390/pharmaceutics10040263³⁷.

El eje vertical muestra la tasa de éxito clínico acumulativo: la proporción de medicamentos aprobados por la FDA con respecto a los ensayos clínicos en EUA. El cinco por ciento del valor del eje horizontal y el 10% del eje vertical, se eligieron como puntos originales de los cuatro cuadrantes y la taxonomía para estas tecnologías de liberación de fármacos³⁷.

Una proporción del 5% entre los ensayos clínicos globales y las publicaciones globales representa un punto clave de la eficiencia traslacional de la investigación académica a los ensayos clínicos, mientras que una tasa de éxito clínico del 10% es la tasa de éxito clínico promedio de las NEM en los últimos 20 años. Estas 10 tecnologías de liberación de fármacos se pueden clasificar en cuatro cuadrantes en un sistema de coordenadas. El primer tipo representa tecnologías con una alta eficiencia traslacional y una alta tasa de éxito clínico, comprendiendo el parche transdérmico y preparaciones orales de liberación sostenida.

El segundo tipo tiene una baja eficiencia traslacional y una alta tasa de éxito clínico, no habiendo DDS que pertenezca a esta categoría. El tercer tipo representa una alta eficiencia traslacional y una baja tasa de éxito clínico, en este cuadrante se incluye inhalación (aerosol, polvo y espray) y las inyecciones complejas (emulsión, liposomas, nanopartículas, suspensión y microsferas). El cuarto tipo tiene una eficiencia traslacional baja y un éxito clínico bajo, como es el caso de las nanopartículas ³⁷. Lo que lleva a lo observado en el capítulo 6 “Ejemplos de aplicaciones de NP de PLGA para el direccionamiento cerebral”, donde las NP eran probadas únicamente en modelos animales y celulares, pero no en humanos, debido a la baja tasa de éxito clínico que se tiene como referencia.

Hablando específicamente de las NP como sistemas de liberación de fármacos novedosos, Lupron depot fue el primer producto comercializado de NP de liberación sostenida, en EE. UU., siendo desarrollado en 1985 por Takeda. Lupron depot que contiene un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) se utiliza para el tratamiento paliativo del cáncer de próstata avanzado. Actualmente, se encuentran disponibles en el mercado 8 formulaciones basadas en PLGA de liberación sostenida aprobadas por la FDA (**Tabla 13**)³⁷.

Como se puede observar en la **Tabla 13**, ha habido poco progreso en el desarrollo de NP de PLGA. En especial para aquellas direccionadas al cerebro, a pesar de conferirle al fármaco propiedades que de forma libre no tendría, por ejemplo, protección contra degradación, aumento en su tiempo de circulación, así como una liberación sostenida ³⁸.

Tabla 12. Número de publicaciones, ensayos clínicos y productos comercializados de 10 tecnologías farmacéuticas avanzadas (1980-2017).

Tecnologías clave de liberación de fármacos	Número de publicaciones globales	Número de ensayos clínicos globales	Relación ensayos clínicos / publicaciones (%)	Número de ensayos clínicos en EUA	Número de productos comercializados en EUA	Relación productos / ensayos clínicos en EUA (%)
Preparaciones orales de liberación sostenida	7150	1798	25.15	859	205	24.55
Parche transdérmico	4161	570	13.70	323	54	17.09
Aerosol inhalación*	3204	342	10.67	171	16	9.36
Polvo inhalación*	5227	878	16.80	383	25	6.53
Spray inhalación*	2284	194	8.49	82	4	4.88
Liposoma inyección #	3885	342	8.80	232	8	3.45
Emulsión inyección #	5033	269	5.34	119	5	4.20
Microesfera inyección #	1329	92	6.92	45	11	7.32
Suspensión inyección #	3558	58	1.63	40	2	5.00
Nanopartícula inyección #	5468	601	10.99	276	11	5.07

* Pertenecen al sistema de administración por inhalación. # Pertenecen al sistema de administración por inyección.

Tabla modificada de: Zhong, H., Chan, G., Hu, Y. & Hu, H. A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products. 1–19 (2018). doi:10.3390/pharmaceutics10040263³⁷.

Recientemente se ha informado de un número creciente de estudios sobre efectos restauradores de NP de PLGA en modelos animales con trastornos neurológicos (p. ej. accidente cerebrovascular, Alzheimer y Parkinson). Sin embargo, se necesitan más investigaciones para aclarar las diferencias en el transporte de NP en modelos animales sanos y enfermos, siempre teniendo en cuenta las limitaciones de que un modelo experimental no puede imitar por completo una enfermedad humana determinada. Aunque se sabe que las propiedades de BBB se alteran sustancialmente en modelos *in vivo* de enfermedades neurodegenerativas, no se han realizado estudios sistemáticos para dilucidar cómo las propiedades fisicoquímicas de las NP afectan el transporte de estas y su localización cerebral, por lo que este tipo de estudios sería un paso de gran importancia para el desarrollo de nuevas NP. Adicionalmente, abordar los problemas de seguridad también es muy importante para mover esta área de investigación a posibles terapias clínicas. Es importante tener en cuenta que aún las formulaciones de NP más eficaces, para el direccionamiento cerebral, se acumulan significativamente en otras regiones del cuerpo, como el hígado, el bazo, el riñón, entre otros órganos / tejidos, antes de ser eliminadas. Por tanto, es importante diseñar NP que solo después de llegar al cerebro se activen de forma remota para liberar el fármaco en lugar de hacerlo en otras partes del cuerpo. Se espera que los desarrollos futuros en nanoformulaciones faciliten el uso clínico de NP en el área de la medicina regenerativa. Otro tema importante que merece mayor investigación es el desarrollo de nanopartículas de PLGA que pueden apuntar a células cerebrales específicas. Por ejemplo, en el contexto de trastornos neurodegenerativos, la focalización en células cerebrales específicas como las neuronas dopaminérgicas (objetivo principal en Parkinson), la microglía (neuroinflamación) o las células madre neurales (reparación neuronal) podría mejorar su valor terapéutico. En resumen, el desarrollo de nuevas NP que sean capaces de explotar las alteraciones de BBB que se produzcan en los trastornos neurodegenerativos, en combinación con prometedores agentes terapéuticos y/o de imagen, es fundamental para desarrollar terapias no invasivas y dirigidas al cerebro, más eficaces que puedan llegar a la clínica ³⁹.

Tabla 13. Formulaciones inyectables basadas en PLGA de liberación sostenida aprobadas por la FDA.

Nombre producto	Ingrediente activo	Composición	Empresa	Indicación	Mecanismo de acción	Año de aprobación
Lupron Depot®	Acetato de leuprolida	PLGA	Abbvie	Cáncer de próstata avanzado	Agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), generando regulación a la baja de la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). ^{40,41}	1989
Sandostatin Lar®	Acetato de octreotida	PLGA	Novartis	Acromegalia	Agonista de la hormona somatostatina. Es un inhibidor de la hormona del crecimiento. ⁴²	1998
Trelstar®	Pamoato de triptorelina	PLGA	Allergen	Cáncer de próstata avanzado	Agonista de la GnRH. El pamoato de triptorelina tiene una actividad 13 veces mayor sobre la LH y una actividad 21 veces mayor sobre la FSH en comparación con la GnRH nativa. Afectando la liberación de las hormonas sexuales testosterona, dihidrotestosterona, estrona y estradiol. ⁴³	2000
Bydureon®	Exenatida sintética	PLGA	Astrazeneca	Diabetes tipo 2	Las incretinas, como el péptido 1 tipo glucagón (GLP-1), mejoran la secreción de insulina dependiente de glucosa y exhiben otras acciones antihiper glucémicas después de su liberación a la circulación desde el intestino. Bydureon® es un agonista del receptor de GLP-1 que mejora la secreción de insulina dependiente de glucosa por parte de las células beta pancreáticas, suprime la secreción de glucagón elevada y ralentiza el vaciamiento gástrico. ⁴⁴	2012
Signifor Lar®	Pamoato de pasireotida	PLGA	Novartis	Acromegalia	Análogo de la somatostatina. La pasireotida ejerce su actividad farmacológica mediante la unión a los receptores de somatostatina (SSTR). Inhibe la producción de la hormona del crecimiento por la hipófisis. ⁴⁵	2014
Triptodur Kit®	Pamoato de triptorelina	PLGA	Arbor	Pubertad precoz central	Agonista de la hormona liberadora de gonadotropina. ⁴⁶	2017
Eligard®	Acetato de leuprolida	PLGA	Tolmar	Cáncer de próstata avanzado	Agonista de la GnRH que actúa como un potente inhibidor de la secreción de LH y FSH cuando se administra de forma continua en dosis terapéuticas. ⁴⁷	2002
Sublocade®	Buprenorfina	PLGA	Indivior	Trastorno por consumo de opioides de moderado a grave	Agonista parcial del receptor opioide mu y antagonista del receptor opioide kappa. ⁴⁸	2017

Tabla modificada de: Zhong, H., Chan, G., Hu, Y. & Hu, H. A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products. 1–19 (2018). doi:10.3390/pharmaceutics10040263³⁷.

8. Nanopartículas, una alternativa en la formulación de vacunas contra COVID-19.

Los virus corona humanos se descubrieron por primera vez en la década de 1960, siendo llamados de esta manera por la estructura en forma de corona que simulan las proteínas localizadas en su superficie, siendo fundamental para su infectividad. De las bases de datos de secuencias actuales se sabe que todos los virus corona humanos encontrados se han originado en animales. Algunos tipos de coronavirus, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1, causan síntomas respiratorios leves similares al resfriado común, mientras que el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV), que surgieron en 2002 y 2012, respectivamente, son más infecciosos y responsables de enfermedades potencialmente mortales en bebés, personas mayores y pacientes inmunodeprimidos ⁵³.

Un nuevo coronavirus, el SARS-CoV-2, apareció en diciembre de 2019 en Wuhan, China. Se trata de un virus envuelto de RNA de cadena sencilla (ssRNA) con glicoproteínas en forma de pico expresadas en la superficie formando una "corona". La transmisión del virus se logra principalmente a través de contacto directo o gotas respiratorias, siendo dependiente del tiempo y la proximidad, lo que a menudo requiere un contacto menos a metro y medio durante un período de 15 minutos o más. Sin embargo, se ha demostrado la posibilidad de transmisión aérea bajo ciertas circunstancias, incluida la exposición prolongada en un espacio cerrado sin una ventilación adecuada. El virus se propagó rápidamente a través del mundo superando los 91 millones con más de un millón de muertes al 12 de enero de 2021. Se reconoce que las cifras de casos positivos reportadas son subestimadas, considerando que personas infectadas asintomáticos pudieron no realizarse alguna de las pruebas, y, además que los protocolos de seguridad no son respetados por gran parte de la población. Con la obtención de la secuencia genética del SARS-CoV-2, el virus fue identificado como un betacoronavirus con una similitud genética de 79.6% con el SARS-CoV. Si bien el SARS-CoV-2 es menos mortal que SARS-CoV, se transmite mucho más fácil y rápido, y tomando en consideración el largo período de incubación y los síntomas inexistentes a moderados, hacen que la identificación,

rastreo y eliminación de la enfermedad causada por la infección por SARSCoV-2, coronavirus de 2019 (COVID-19), sea realmente difícil. Los síntomas más comunes del COVID-19 son fiebre, tos seca, fatiga y disnea, mientras que los síntomas graves se acompañan de infección sistémica y neumonía ⁵³.

Durante los últimos 100 años, las vacunas han aumentado significativamente la esperanza de vida, remodelando fundamentalmente la comunidad y la economía. A medida que la vacunación esté disponible y se utilice ampliamente, los efectos devastadores de muchas enfermedades infecciosas disminuirán. El tratamiento de las enfermedades infecciosas es costoso, como se ha demostrado por la gripe estacional que tiene una enorme carga económica y social por salvar miles de vidas cada año. La vacunación contra SARS-CoV-2 puede reducir estos costos, pudiendo desempeñar un papel fundamental en la protección de las personas de manera eficiente y sostenible, lo que resulta en la eliminación completa o una transmisión significativamente reducida dentro de la población. Las estrategias de prevención y opciones terapéuticas contra COVID-19, incluido el plasma de personas infectadas, anticuerpos monoclonales, los medicamentos reposicionados que ya están aprobados en la clínica y una variedad de vacunas, se están explorando frenéticamente utilizando los avances en el enfoque de la ciencia de los materiales para sistemas de liberación. Se tienen más de 200 candidatos a vacunas en todo el mundo; sin embargo, persiste una falta de claridad en cuanto al desarrollo de una vacuna contra COVID-19 segura y altamente inmunogénica (**Figura 49**). Los principales obstáculos en el desarrollo de la vacuna contra COVID-19 incluyen la dificultad para validar y apuntar a las tecnologías de la plataforma de vacunas apropiadas, falla en generar inmunidad a largo plazo e incapacidad para calmar la tormenta de citocinas. Además de las formas de vacunas convencionales de virus atenuados, vectores virales y vacunas de subunidades, los enfoques de vacunas emergentes que utilizan nanotecnología son altamente adaptables y contribuyen al desarrollo acelerado de vacunas⁵³.

Tal es el caso de la vacuna BNT162b2, desarrollada por Pfizer, Fosun Pharma y BioNTech, que hoy en día es administrada al personal médico de primera línea. Esta vacuna utiliza como plataforma nanopartículas lipídicas que encapsulan ARN mensajero (ARNm) de la proteína S de SARS-CoV-2, y que a pesar de tener como principal inconveniente el almacenamiento

a largo plazo (debe almacenarse a -70°C), ha mostrado presentar una respuesta favorable en el título de anticuerpos neutralizantes y respuesta celular contra el virus, así como un perfil de seguridad aceptable ⁵⁴.

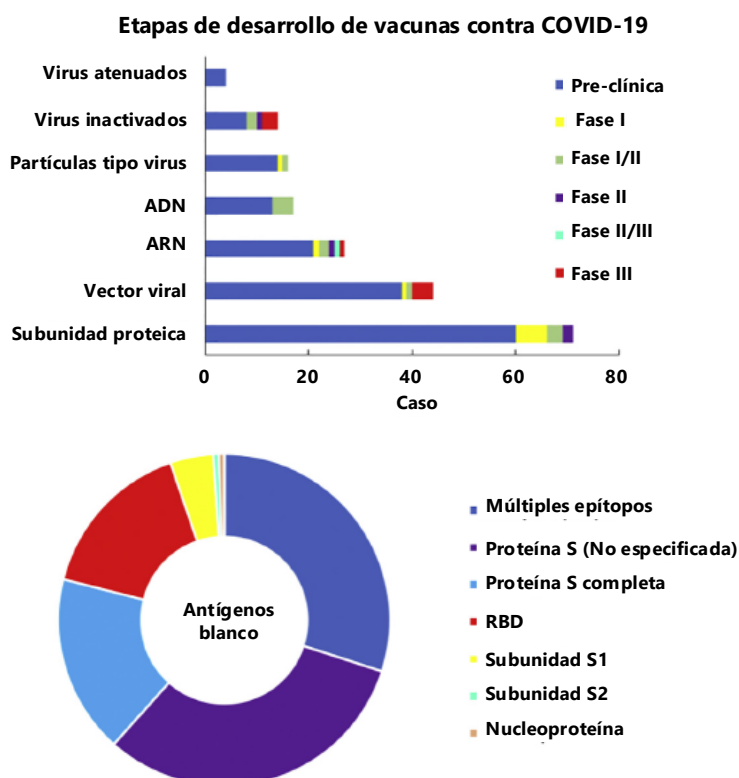


Figura 49. Ensayos pre-clínicos y clínicos actuales de las vacunas contra COVID-19, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) al 8 de diciembre de 2020. De las 214 vacunas candidatas, 52 se encuentran en ensayos clínicos y 162 en estudios preclínicos. Las vacunas candidatas principalmente se dirigen a la proteína S del SARS-CoV-2. Imagen modificada de: Young, J., Thone, M. N. & Jik, Y. COVID-19 vaccines : The status and perspectives in delivery points of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **170**, 1–25 (2021) ⁵³.

La proteína S permite la unión y entrada del SARS-CoV-2 a las células huésped, se une al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en la superficie de la célula huésped, acompañada de una estimulación adicional de una serina proteasa transmembrana (TMPRSS2). TMPRSS2 escinde la proteína S en dos subunidades, S1 y S2, durante la entrada viral en la célula huésped a través de fusión de membrana (**Figura 50**). La expresión de ACE2 es ubicua en el epitelio nasal, pulmón, corazón, riñón e intestino ⁵³.

La subunidad S1 contiene el estado de profusión del dominio de unión al receptor (RBD) responsable de la unión a ACE2, mientras que la subunidad S2 contiene el sitio de escisión que es crítico para la fusión de las membranas viral y celular. La proteína S, además, induce la fusión entre las células infectadas y no infectadas, lo que permite la propagación viral directa entre células, evitando así los anticuerpos neutralizantes. El papel fundamental que desempeña la proteína S y las subunidades S1, RBD y S2 en la entrada viral, las convierten en un objetivo atractivo para las vacunas contra COVID-19 ⁵³.

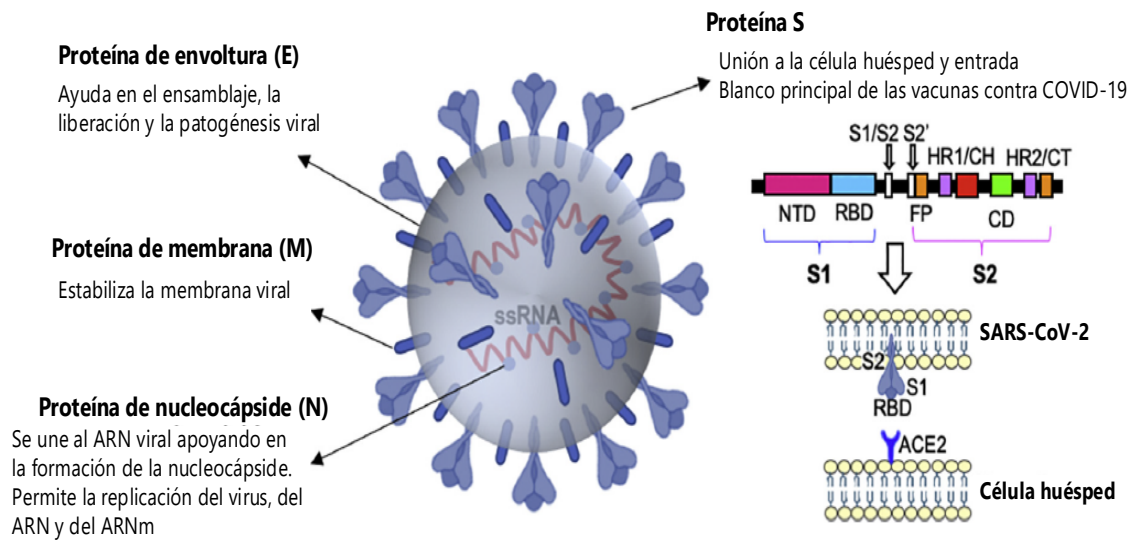


Figura 50. Estructura de SARS-CoV-2, virus de ARN monocatenario de sentido positivo que comparte una similitud genética de 79.6% con el SARS-CoV y que codifica las proteínas S, M, E y N. La proteína S contiene tres elementos críticos: las subunidades S1 y S2 y el dominio de unión al receptor (RBD). La subunidad S1 contiene el subdominio N-terminal y C-terminal (CTD) que están en una conformación cerrada hasta que proteasas específicas escinden los sitios S1/S2 y S2'. El RBD se encuentra en el S1-CTD y es necesario para unirse al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en la superficie de las células huésped. El dominio de la subunidad S2 forma una estructura trimérica, conteniendo el péptido de fusión (FP) y dos repeticiones de heptada (HR1 y HR2) que son necesarias para la fusión de la membrana viral y del huésped. La proteína N que es la más abundante, empaqueta el genoma en un virión para una replicación viral efectiva. La proteína M está involucrada en la integración viral y la proteína E facilita el ensamblaje, la formación de la envoltura y la replicación.

Imagen modificada de: Young, J., Thone, M. N. & Jik, Y. COVID-19 vaccines : The status and perspectives in delivery points of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **170**, 1–25 (2021) ⁵³.

Los ácidos nucleicos son candidatos de vacunas atractivos ya que son relativamente simples de producir (reduciendo tiempo y costos), seguros de administrar y capaces de generar una alta inmunogenicidad. Adicionalmente, las proteínas producidas por las vacunas basadas en ácidos nucleicos pueden proporcionar una presentación más natural al sistema inmunológico, produciendo mejores respuestas de las células T ⁵⁵. Dada la presencia ubicua de enzimas ARNasas y las diferencias estructurales, la vida media del ADN es más larga en comparación con el ARNm, sin embargo, el ADN aún necesita ingresar al núcleo para la transcripción, lo que puede resultar en integración y mutación en el genoma del huésped. Las vacunas de ADN plasmídico no provocan una respuesta inmune adecuada, teniendo la necesidad de múltiples vacunas o el uso de un adyuvante que promueva una mayor respuesta inmune adaptativa. Por otro lado, las vacunas de ARNm deben liberarse al citoplasma de la célula huésped para su traducción a las proteínas antigénicas diana. Las vacunas de ARNm son una alternativa prometedora a las vacunas convencionales de proteínas o virus completos, atribuidas a su seguridad, alta potencia para generar una respuesta inmune y a su fabricación rápida y de bajo costo. Un obstáculo adicional que comparten las vacunas de ADN y ARNm es la penetración en las células diana. Los avances en los sistemas de liberación han aumentado el potencial de las vacunas de ácidos nucleicos para mejorar la inmunogenicidad. Tal es el caso de las nanopartículas lipídicas (LNP), que se han convertido en una de las herramientas más favorables para la administración de ARNm, estas NP constan de cuatro componentes principales: un lípido catiónico ionizable, polietilenglicol ligado a lípidos (PEG-lípidos), colesterol y fosfolípidos naturales (**Figura 51**) ⁵³.

Los lípidos catiónicos ionizables son un componente crítico de las LNP, y un determinante importante de la potencia de estas. Son lípidos que se encuentran cargados positivamente a pH ácido y neutros a pH fisiológico (torrente sanguíneo). Esta característica confiere al lípido/LNP las ventajas de la carga positiva (capacidad de complejar al ácido nucleico y la capacidad de interactuar con la membrana endosomal como parte del proceso de fusión para liberar el ácido nucleico al citosol de la célula), presentando una farmacocinética mejorada, ya que las partículas no son eliminadas rápidamente por el sistema reticuloendotelial (RES). Teniendo por consiguiente una vida media mayor en el torrente sanguíneo (aproximadamente 30 min) ⁵⁶.

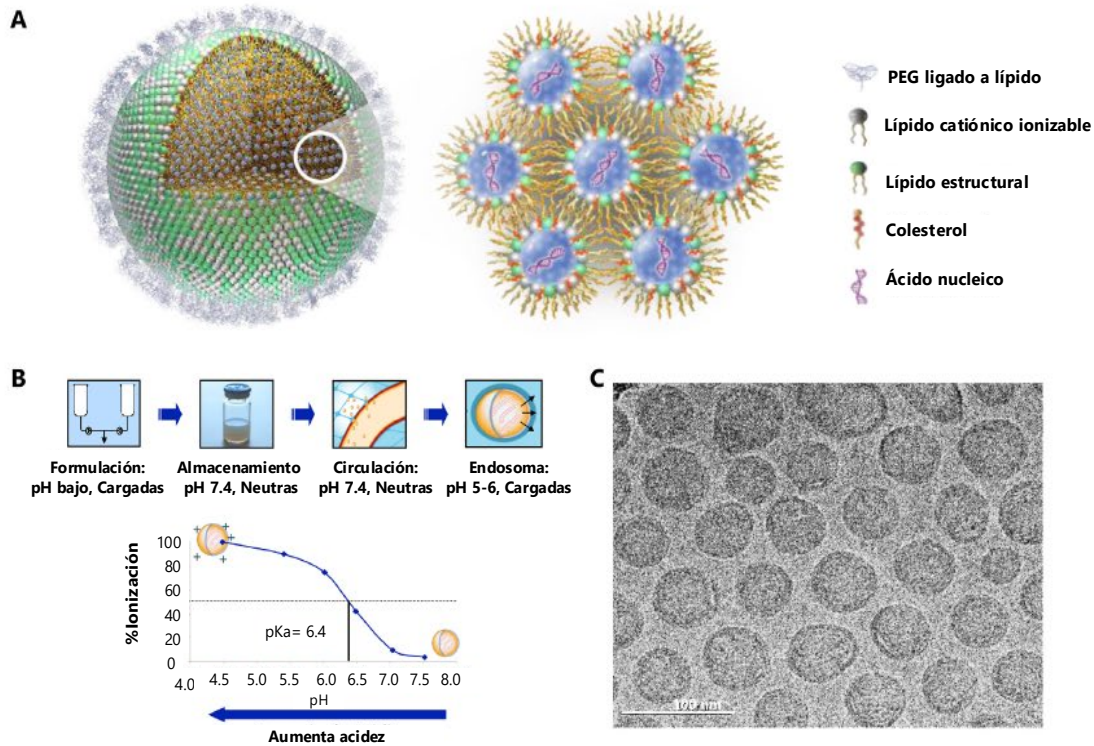


Figura 51. (A) Representación esquemática de la estructura de nanopartículas lipídicas (LNP). (B) Principio e importancia del pKa en el mecanismo de acción de los lípidos ionizables. (C) Micrografía electrónica criogénica de LNP con un aumento de 110,000x. Barra de escala: 100 nm. PEG: Polietilenglicol.

Imagen modificada de: Samaridou, E., Heyes, J. & Lutwyche, P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 154–155, 37–63 (2020)⁵⁶.

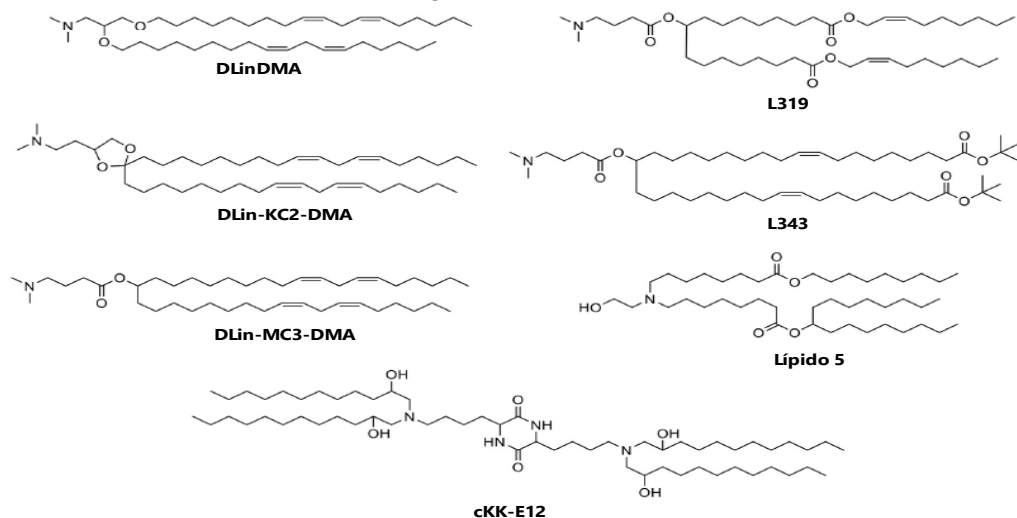
La naturaleza ionizable mejora aún más el perfil de tolerabilidad, ya que los lípidos catiónicos cargados permanentemente son propensos a causar toxicidad celular y las partículas que los contienen tienen más probabilidades de estimular el sistema inmunológico y / o agregarse en la sangre, por lo que podrían depositarse en lechos capilares finos como el pulmón ⁵⁶.

Una característica importante de las LNP es la constante de disociación ácida (pKa), una medida del pH en el que el lípido ionizable /LNP se carga positivamente y que tiene un fuerte efecto sobre la potencia. El pKa de las LNP debe estar entre 6.2 y 6.5 para una actividad óptima en la célula, ya que la superficie de la partícula debe ser esencialmente neutra a pH fisiológico, y cargarse dentro del endosoma acidificante después de la captación celular (Figura 51) ⁵⁶.

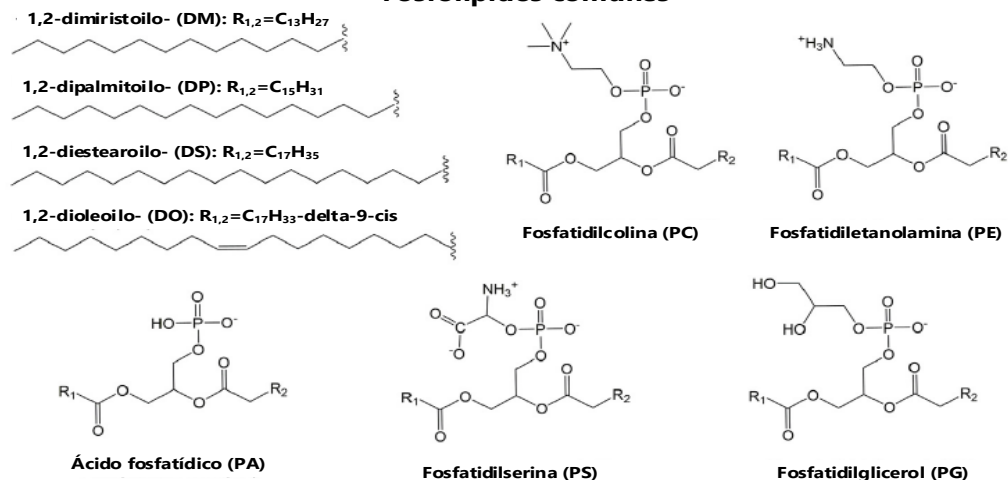
Hablar de LNP biodegradables, comprende lípidos ionizables enzimáticamente lábiles. La biodegradabilidad es de gran importancia para las aplicaciones de LNP que requieren una administración más frecuente, por ejemplo, administración de ARNm que codifica una proteína terapéutica. La frecuencia de dosificación se encuentra determinada por la tasa de renovación de la transcripción y la vida media del producto proteico. Como componente principal de las LNP, los lípidos ionizables deben considerarse primero para rediseñarlos con propiedades biodegradables. Una alternativa para esto es incorporar al lípido grupos éster carboxílicos que se pueden escindir mediante esterasas. Un ejemplo de eso es el lípido catiónico ionizable L319 (**Figura 52**), el cual muestra una rápida degradación *in vivo*, mientras que L343 estrechamente relacionado (**Figura 52**), muestra una estabilidad prolongada, que se presume se debe al impedimento estérico que protege al éster de la acción de la enzima ⁵⁶.

El PEG-lípidos es otro componente importante de las LNP que juega varios roles. Su estructura consta de dos dominios: polímero PEG hidrófilo conjugado con un ancla lipídica hidrófoba. Están situados en la superficie de las partículas lipídicas, con el dominio lipídico enterrado en la partícula y el dominio PEG extendiéndose desde la superficie. Son utilizados para equilibrar el tiempo en circulación y la captación celular ya que el polímero PEG representa una barrera estérica que evita la unión de proteínas plasmáticas (opsoninas) que de otro modo resultarían en su rápida eliminación por parte del sistema reticuloendotelial. Adicionalmente, determinan el tamaño de partícula durante la fabricación. Sin un PEG-lípido presente, el pH bajo y el entorno etanólico del proceso de fabricación de las LNP promoverían la fusión de partículas a medida que se forman. La barrera estérica del PEG-lípido previene esto y ayuda a producir una población de partículas homogénea con polidispersidad estrecha y tamaño de partícula pequeño, típicamente 50 -100 nm, dependiendo de la cantidad exacta de PEG-lípido utilizada ⁵⁶.

Lípidos ionizables



Fosfolípidos comunes



Lípidos adicionales usados en la formulación de LNP

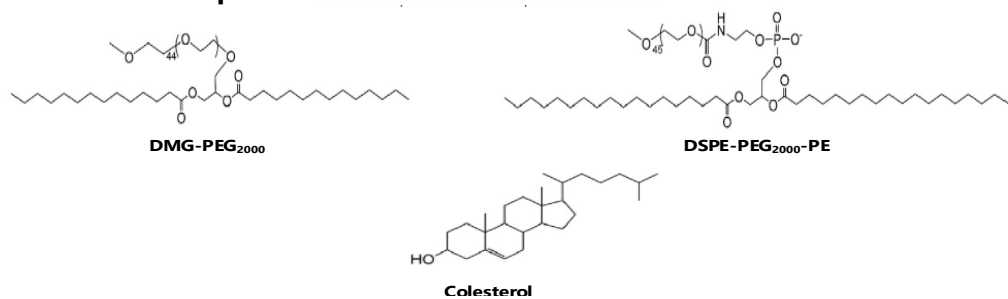


Figura 52. Estructuras de componentes empleados en la formulación de nanopartículas lipídicas.

Imagen modificada de: Fan, Y., Marioli, M. & Zhang, K. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **192**, 113642 (2021) ⁵⁷.

A pesar de las ventajas mencionadas, los PEG-lípidos interfieren con pasos importantes asociados con la liberación y actividad de la carga. Por ejemplo, el escape endosómico que debe ocurrir para la liberación intracelular exitosa del ácido nucleico, se ve impedido ya que la capa de PEG evita el acercamiento y fusión de las LNP con la bicapa endosomal. Por tal motivo, el contenido de PEG debe mantenerse aproximadamente de 10% a 1,5 mol %. Por otro lado, el PEG-lípidos puede diseñarse para que se difunda lejos de la partícula y, dado lo anterior, la velocidad a la que lo haga es claramente importante. Ésta puede ajustarse cambiando el tamaño del ancla del PEG-lípidos. Las velocidades de difusión del PEG también son importantes por razones de seguridad, debido a que los PEG-lípidos unidos permanentemente (y las partículas de circulación más larga resultantes) promueven la inmunogenicidad cuando se administran ácidos nucleicos. Generando una respuesta de anticuerpos robusta y de larga duración contra la química de la superficie (PEG) de tales partículas, lo que da como resultado una eliminación acelerada de la sangre y una hipersensibilidad aguda tras la administración repetida ⁵⁶.

Los fosfolípidos y el colesterol son empleados por sus útiles contribuciones a la integridad estructural, siendo necesarios para garantizar una encapsulación adecuada del ácido nucleico y estabilidad a través del tiempo ⁵⁶.

La técnica de obtención de LNP más utilizada es la de dilución de etanol, una técnica robusta, reproducible y escalable, que implica la disolución de los lípidos en etanol a concentraciones adecuadas. Esta solución se mezcla en condiciones específicas (temperatura, velocidad de flujo) con una solución acuosa que contiene el ácido nucleico a un pH ácido, usando un mezclador de tubo en T. A medida que se mezclan estas dos soluciones, el lípido ionizable se carga positivamente y forma complejos con el ácido nucleico cargado negativamente, al mismo tiempo que la solubilidad general de los lípidos se reduce mediante la dilución del etanol. Esto da como resultado la formación de partículas nacientes de lípido-ácido nucleico que son inestables y susceptibles al crecimiento del tamaño de partícula hasta que se realiza una dilución adicional con buffer neutro. Esta técnica resulta en altas eficiencias de encapsulación del ácido nucleico (> 80%) ⁵⁶.

Recientemente, se ha desarrollado una técnica microfluídica de mezclado como una herramienta eficaz para realizar formulaciones rápidamente a pequeña escala en el laboratorio, generando LNP con propiedades similares a las generadas a gran escala, que exhiben un núcleo denso en electrones debido a la conformación del lípido ionizable y sus complejos formados con el ácido nucleico ⁵⁶.

De manera general, con base en diferentes estudios, se recomienda reducir el contenido de PEG a aproximadamente 1.4mol% y aumentar notablemente el contenido de lípidos ionizables a aproximadamente 57%, para obtener mejoras en la potencia sin cambiar los componentes lipídicos ⁵⁶.

9. Conclusiones.

En general, las nanopartículas de PLGA representan oportunidades prometedoras para mejorar el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, y que podrían dar al paciente mejor calidad de vida.

A pesar de que el método de emulsificación- evaporación de solvente es el método de obtención de NP de PLGA más utilizado en los estudios, a lo largo de la investigación, se pudo observar que otros métodos, tanto convencionales (p. ej. nanoprecipitación) como aquellos novedosos (p. ej. microfluídica o secado por aspersion) son eficaces para obtener NP con las características deseadas. Y que, con la ayuda de modificaciones superficiales, por ejemplo, con PEG o polisorbato para conferirle propiedades hidrófilas a las NP de PLGA o con algunos ligandos específicos (glucosa, lactoferrina, transferrina, péptidos específicos, etc.), las NP puedan cruzar eficientemente BBB y sean capaces de liberar el fármaco en el sitio blanco. Aspecto que no sería posible si se administrara el fármaco libre, pues BBB es una barrera de protección muy eficiente, a tal grado, que no únicamente evita la entrada de agentes patógenos al cerebro, sino que también, evita el cruce de fármacos, aun siendo estos lipofílicos, debido a la presencia de bombas de eflujo en su superficie. Del mismo modo, el uso de NP de PLGA, aumenta el tiempo de circulación en sangre del fármaco, ya que lo protege de la degradación.

A pesar de la ventaja que representa utilizar NP como sistemas de liberación de fármacos sobre la administración del fármaco libre, este campo aún requiere de grandes esfuerzos y estudio. Se deben resolver varios problemas antes de que la nanomedicina de enfermedades neurodegenerativas llegue al entorno clínico. Entre ellos, la eficiencia de focalización, que en general es el mayor obstáculo, que puede impactar en el efecto terapéutico y causar daño a otros órganos. Además, es preciso tomar en consideración, que no solo se dirige a BBB, también se dirige al sitio de la lesión, para evitar la distribución en todo el cerebro, ya que podrían generarse daños en otras regiones de éste. Del mismo modo, se debe pensar a largo plazo, no debe pasarse por alto la toxicidad de los nanomateriales.

Las propiedades de degradación de los nanomateriales deberían ser motivo de gran preocupación, en el caso del PLGA, a pesar de ser hidrolizado a ácido láctico y ácido glicólico, y de que estos pueden ingresar a vías metabólicas como el ciclo de Krebs, estos metabolitos son ácidos, por lo que sería de gran importancia, evaluar y considerar el efecto de estos a largo plazo en el cuerpo.

A manera de resumen, se puede decir que las NP de PLGA son un sistema de liberación de fármacos eficiente, con propiedades fisicoquímicas favorables para la administración cerebral dirigida, de un fármaco. Y que, al utilizar las modificaciones superficiales pertinentes, el efecto de focalización al blanco de las NP se puede ver notablemente mejorado. Sin embargo, aún hacen falta estudios para que estos nanoportadores lleguen a la aplicación clínica para mejorar la calidad de vida de pacientes con enfermedades neurológicas. Por lo que, aumentar los esfuerzos en este campo, vale en gran medida la pena, ya que el desarrollo de nuevas entidades moleculares se encuentra notablemente disminuido. De tal modo que, al utilizar estos sistemas de liberación, se estaría dando pauta a utilizar fármacos ya conocidos pero que no son empleados por sus propiedades no favorables para el cruce de BBB.

10.Referencias.

1. Mir, M., Ahmed, N. & Rehman, A. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **159**, 217–231 (2017).
2. Sharma, S., Parmar, A., Kori, S. & Sandhir, R. Trends in Analytical Chemistry PLGA-based nanoparticles : A new paradigm in biomedical applications. *Trends Anal. Chem.* **80**, 30–40 (2016).
3. Danhier, F. *et al.* PLGA-based nanoparticles : An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **161**, 505–522 (2012).
4. Zhang, Y., Chan, H. F. & Leong, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery : The past and the future ☆. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 104–120 (2013).
5. Sadat, F. *et al.* PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. **15**, 517–535 (2014).
6. Croll, T. I., Connor, A. J. O., Stevens, G. W. & Cooper-white, J. J. Controllable Surface Modification of Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I : Physical , Chemical , and Theoretical Aspects. 463–473 (2004). doi:10.1021/bm0343040
7. ASCO. Cancer.Net. (2020). Disponible en: https://www.cancer.net/cancer-types/brain-tumor/statistics?fbclid=IwAR0fTw9voZI_08fXF1hZKZuJdLC5gI49wGfH92sIvvHdBs7FjefuB1DUJ5g.
8. Facts, Q. Brain Tumors By The Numbers. 0–1 (2019).
9. Nabi, B., Rehman, S., Khan, S., Baboota, S. & Ali, J. Ligand conjugation : An emerging platform for enhanced brain drug delivery. *Brain Res. Bull.* **142**, 384–393 (2018).
10. Drugbank. Tramadol. (2020). Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00193>. (Consultado: 20a febrero 1a. C.)
11. Ji, X., Wang, H., Chen, Y., Zhou, J. & Liu, Y. Recombinant expressing angiopep - 2 fused anti - VEGF single chain Fab (scFab) could cross blood – brain barrier and target glioma. *AMB Express* (2019). doi:10.1186/s13568-019-0869-3
12. Holgado, M. A. Functional PLGA NPs for Oral Drug Delivery : Recent Strategies and. 58–69 (2013).
13. Martins, C., Sousa, F., Araújo, F. & Sarmiento, B. Functionalizing PLGA and PLGA Derivatives for Drug Delivery and Tissue Regeneration Applications. **1701035**, 1–24 (2017).
14. Kim, K., Lee, J., Kim, D. & Yoon, I. Recent Progress in the Development of Poly (lactic- co -glycolic acid) -Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy.
15. Swider, E. *et al.* Acta Biomaterialia Customizing poly (lactic- co -glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomater.* **73**, 38–51 (2018).
16. Prajapati, S. K. *et al.* Biodegradable polymers and constructs : A novel approach in drug delivery. *Eur. Polym. J.* **120**, 109191 (2019).
17. Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K. & Sparreboom, A. Cremophor EL : the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. **37**, 1590–1598 (2001).

18. Drugbank. Amprenavir. (2020). Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00701>. (Consultado: 8a mayo 2020)
19. Sloan Kettering Institute. SK-BR-3: Human Breast Cancer Cell Line (ATCC HTB-30). (2020). Disponible en: <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/human-breast-cell-line-sk-br-3>. (Consultado: 13a mayo 2020)
20. Kaur, S., Manhas, P., Swami, A., Bhandari, R. & Sharma, K. K. Bioengineered PLGA-chitosan nanoparticles for brain targeted intranasal delivery of antiepileptic TRH analogues. *Chem. Eng. J.* **346**, 630–639 (2018).
21. Wade, L. *Química Orgánica*. (2012).
22. Daniela, B. *et al.* Hybrid nanoparticles as a new technological approach to enhance the delivery of cholesterol into the brain. **543**, 300–310 (2018).
23. Seju, U., Kumar, A. & Sawant, K. K. Acta Biomaterialia Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery : In vitro and in vivo studies. *Acta Biomater.* **7**, 4169–4176 (2011).
24. Panda, A., Meena, J., Katara, R. & Majumdar, D. K. Formulation and characterization of clozapine and risperidone co-entrapped spray-dried PLGA nanoparticles. **7450**, (2016).
25. Jeon, S. G. *et al.* Vitamin D-binding protein-loaded PLGA nanoparticles suppress Alzheimer ' s disease-related pathology in 5XFAD mice. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **17**, 297–307 (2019).
26. Li, T. & Zhang, S. Microgliosis in the Injured Brain : Infiltrating Cells and Reactive Microglia Both Play a Role. (2015). doi:10.1177/1073858415572079
27. Bachiller, S. *et al.* Microglia in Neurological Diseases : A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. **12**, 1–17 (2018).
28. Martins, C., Araújo, F., João, M. & Fernandes, C. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Using micro fluidic platforms to develop CNS-targeted polymeric nanoparticles for HIV therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 111–124 (2019).
29. Thermo Fisher Scientific. Alexa Fluor™ 546 Phalloidin. (2020).
30. Li, H. *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Lactoferrin functionalized PEG-PLGA nanoparticles of shikonin for brain targeting therapy of glioma. *Int. J. Biol. Macromol.* **107**, 204–211 (2018).
31. Sharma, S. & Dang, S. Materials Today : Proceedings Paroxetine loaded PLGA nanoparticles. *Mater. Today Proc.* 1–6 (2020). doi:10.1016/j.matpr.2020.01.568
32. Mandal, M., Jaiswal, P. & Mishra, A. Journal of Drug Delivery Science and Technology Curcumin loaded nanoparticles reversed monocrotophos induced motor impairment and memory de fi cit : Role of oxidative stress and intracellular calcium level. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **56**, 101559 (2020).
33. Cano, A. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate loaded PEGylated-PLGA nanoparticles : A new anti-seizure strategy for temporal lobe epilepsy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **14**, 1073–1085 (2018).
34. Shamarekh, K. S., Gad, H. A., Soliman, M. E. & Sammour, O. A. Journal of Drug Delivery Science and Technology Development and evaluation of protamine-coated PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery of tacrine : In-vitro and in-vivo assessment. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **57**, 101724 (2020).

35. Tong, G., Qin, N. & Sun, L. Development and evaluation of Desvenlafaxine loaded PLGA-chitosan nanoparticles for brain delivery. *Saudi Pharm. J.* **25**, 844–851 (2017).
36. FDA. Novel Drug Approvals for 2019. (2020).
37. Zhong, H., Chan, G., Hu, Y. & Hu, H. A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products. 1–19 (2018). doi:10.3390/pharmaceutics10040263
38. Saraiva, C. *et al.* Nanoparticle-mediated brain drug delivery : Overcoming blood – brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J. Control. Release* **235**, 34–47 (2016).
39. Niu, X., Chen, J. & Gao, J. Nanocarriers as a powerful vehicle to overcome blood-brain barrier in treating neurodegenerative diseases : Focus on recent advances. *Asian J. Pharm. Sci.* **14**, 480–496 (2019).
40. FDA. LUPRON DEPOT (leuprolide acetate for depot suspension). *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION* 32 (2014).
41. Drugbank. Leuprolide. (2020).
42. FDA. SANDOSTATIN® LAR DEPOT (octreotide acetate) for injectable. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION* (2019).
43. FDA. TRELSTAR® (triptorelin pamoate for injectable suspension). *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION* (2011).
44. FDA. BYDUREON® (exenatide extended-release) for injectable suspension, for subcutaneous use. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION* (2018).
45. FDA. SIGNIFOR® LAR (pasireotide) for injectable suspension, for intramuscular use. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION* (2014).
46. FDA. TRIPTODUR (triptorelin) for extended-release injectable suspension, for intramuscular use. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION* (2017).
47. FDA. ELIGARD (leuprolide acetate) suspension for subcutaneous injection. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION* (2014).
48. FDA. SUBLOCADE (buprenorphine extended-release) injection, for subcutaneous use. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION* (2017).
49. Jose, S. *et al.* European Journal of Pharmaceutical Sciences Surface modified PLGA nanoparticles for brain targeting of Bacoside-A. *Eur. J. Pharm. Sci.* **63**, 29–35 (2014).
50. Caban-toktas, S. *et al.* Combination of Paclitaxel and R-flurbiprofen loaded PLGA nanoparticles suppresses glioblastoma growth on systemic administration. *Int. J. Pharm.* **578**, 119076 (2020).
51. Huo, X., Zhang, Y., Jin, X., Li, Y. & Zhang, L. Journal of Photochemistry & Photobiology , B : Biology A novel synthesis of selenium nanoparticles encapsulated PLGA nanospheres with curcumin molecules for the inhibition of amyloid β aggregation in Alzheimer ' s disease. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **190**, 98–102 (2019).
52. Madani, F., Sara, S., Camilla, M. & Webster, T. J. Paclitaxel / methotrexate co-loaded PLGA nanoparticles in glioblastoma treatment : Formulation development and in vitro antitumor activity evaluation. *Life Sci.* **256**, 117943 (2020).
53. Young, J., Thone, M. N. & Jik, Y. COVID-19 vaccines : The status and perspectives in delivery points of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **170**, 1–25 (2021).

54. Rawat, K., Kumari, P. & Saha, L. COVID-19 vaccine : A recent update in pipeline vaccines , their design and development strategies. *Eur. J. Pharmacol.* **892**, 173751 (2021).
55. Hassett, K. J. *et al.* Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Mol. Ther. Nucleic Acid* **15**, 1–11 (2019).
56. Samaridou, E., Heyes, J. & Lutwyche, P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery : Current perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **154–155**, 37–63 (2020).
57. Fan, Y., Marioli, M. & Zhang, K. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **192**, 113642 (2021).
58. Mathew, E., Kumar, S., Purohit, R., Dhakad, S. K. & Rana, R. S. Materials Today : Proceedings Nanolithography and its current advancements. *Mater. Today Proc.* **26**, 2351–2356 (2020).
59. Bhagoria, P., Mathew, E., Kumar, S., Purohit, J. & Purohit, R. Materials Today : Proceedings Nanolithography and its alternate techniques. *Mater. Today Proc.* **26**, 3048–3053 (2020).
60. Española, R. A. Real Academia Española. *advección* (2021).