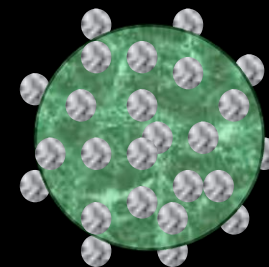


# Sistemas nanoestructurados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

*Elena Sánchez López\*, Miren Ettcheto, Ana López, Marta Espina, Amanda Cano, Jaume Folch, Eliana B Souto, Ana C. Calpena, Antoni Camins, Maria Luisa García*



\* [esanchezlopez@ub.edu](mailto:esanchezlopez@ub.edu)



Departamento de Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Físicoquímica  
Sección de Físicoquímica

# ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Pérdida progresiva de la estructura o funciones neuronales



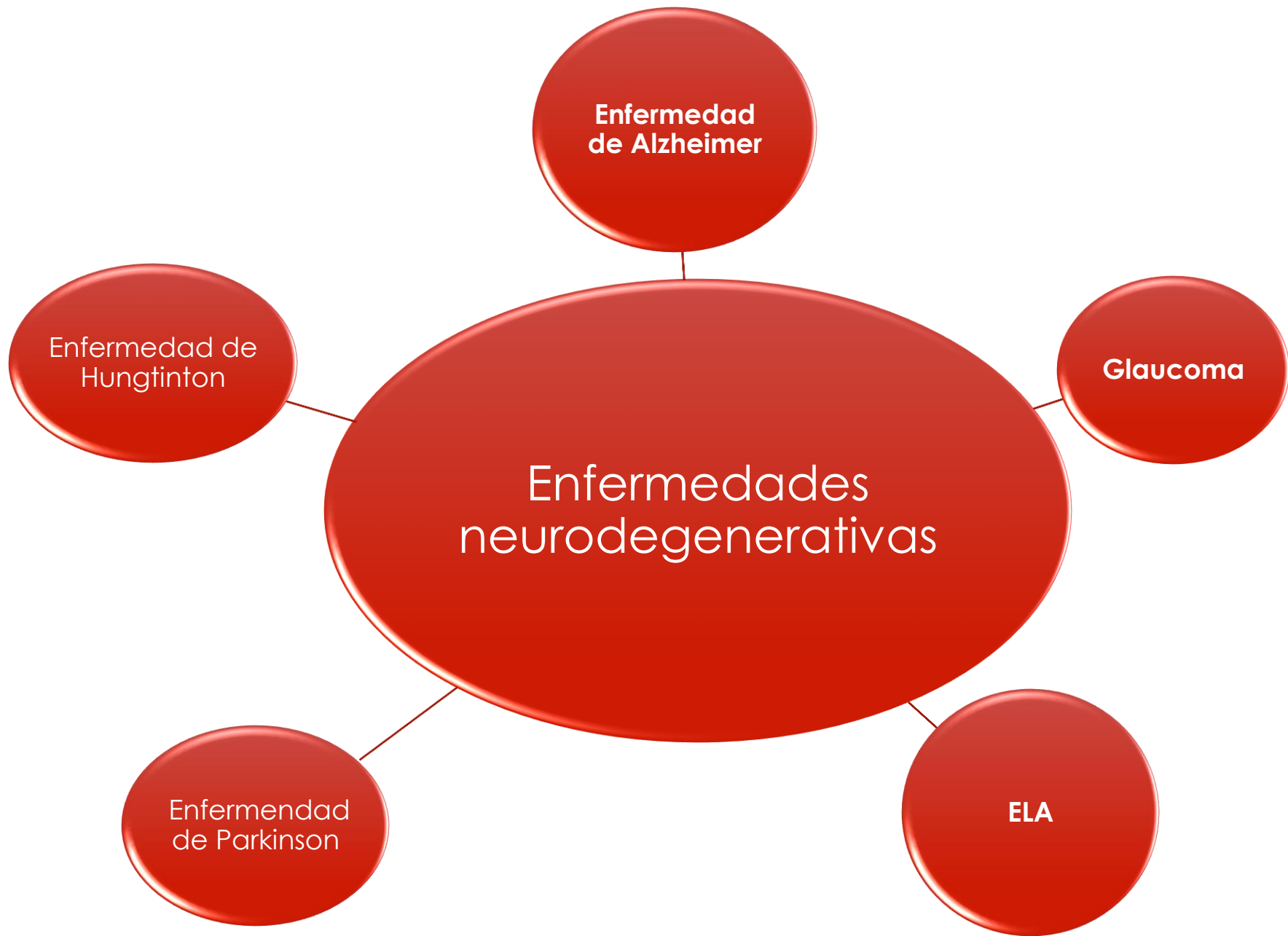
*Prevalencia*  
**EUROPA**

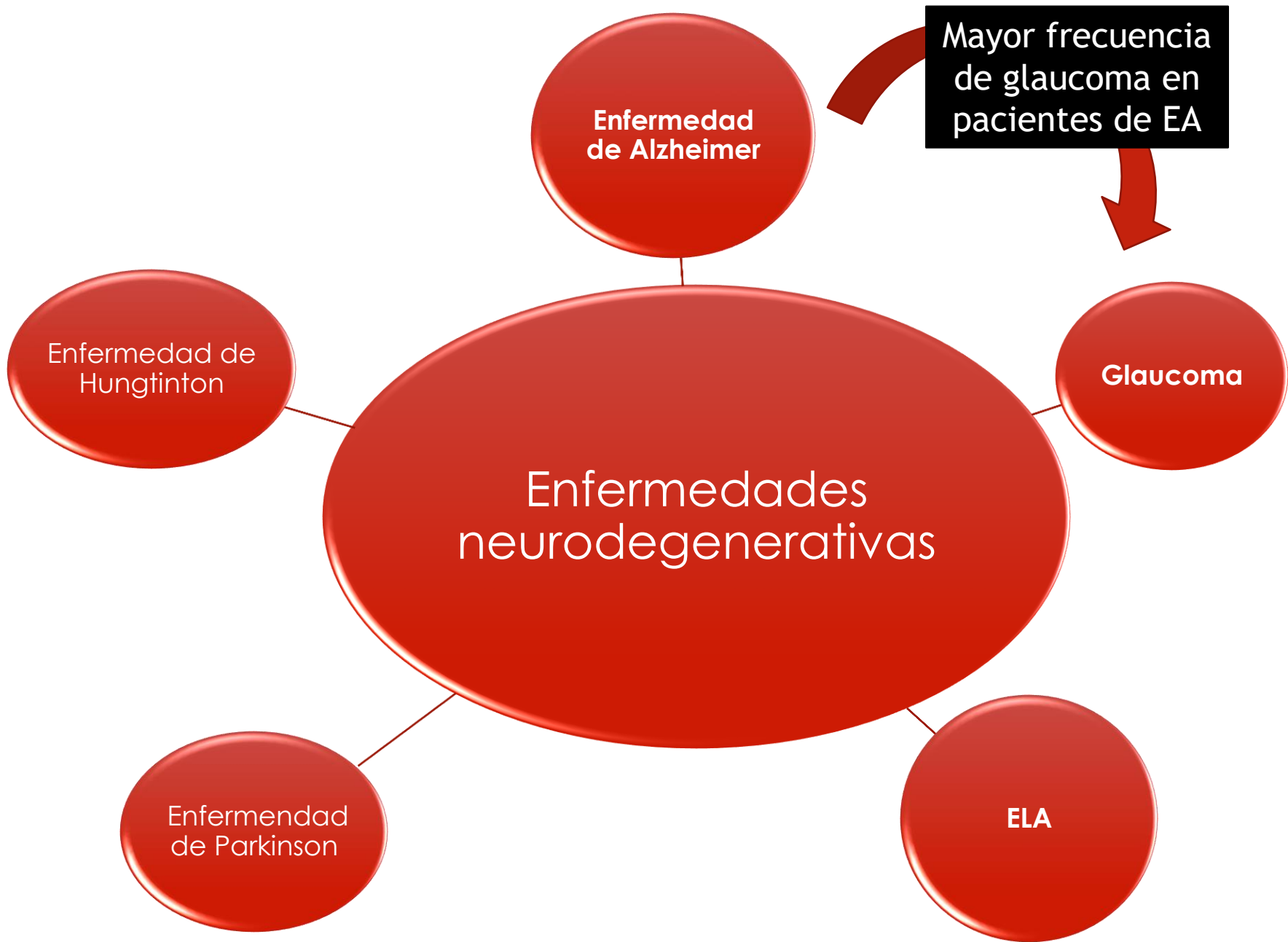
**8.559.462**  
PERSONAS AFECTADAS



*Prevalencia*  
**MUNDIAL**

**64.074.000**  
PERSONAS AFECTADAS

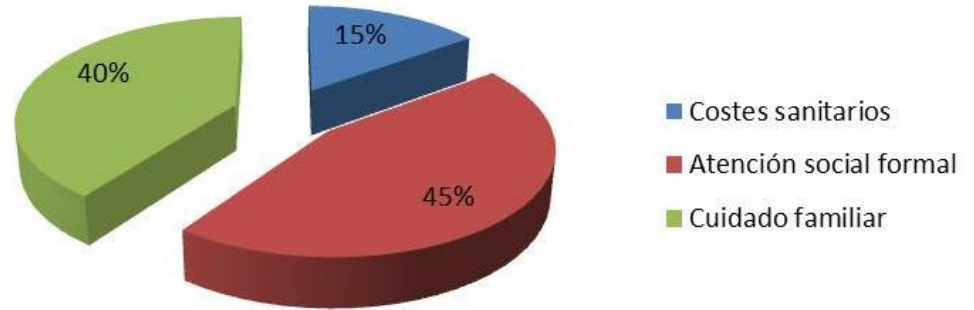




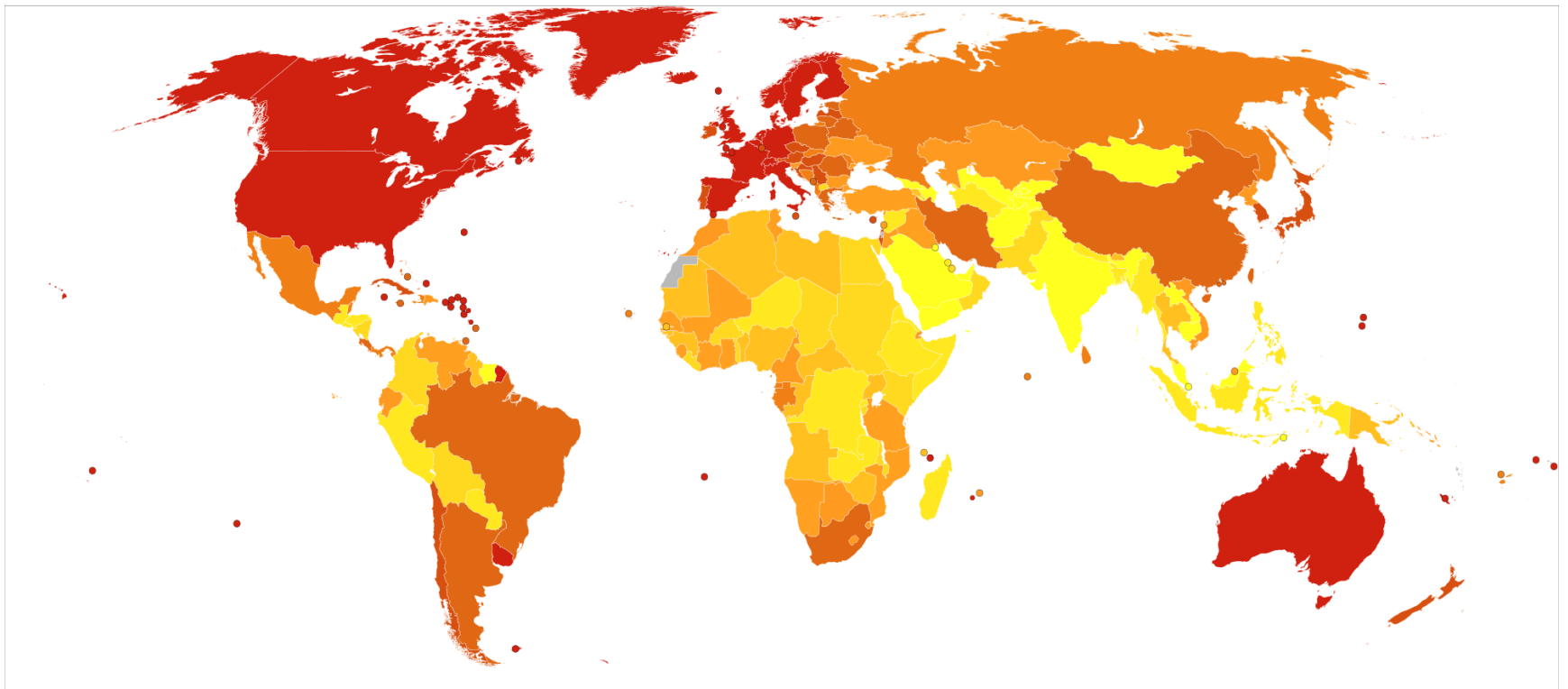
# ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)



CADA 70 SEGUNDOS  
SE DIAGNOSTICA UN CASO EN EUROPA



Cada enfermo de Alzheimer cuesta 30.000 €/año



# ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

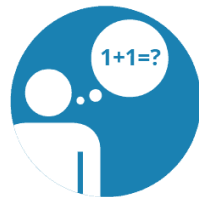


Perdida de memoria

Se caracteriza por un inicio gradual y un deterioro cognitivo continuo



Problemas de lenguaje



Dificultad para hacer tareas simples

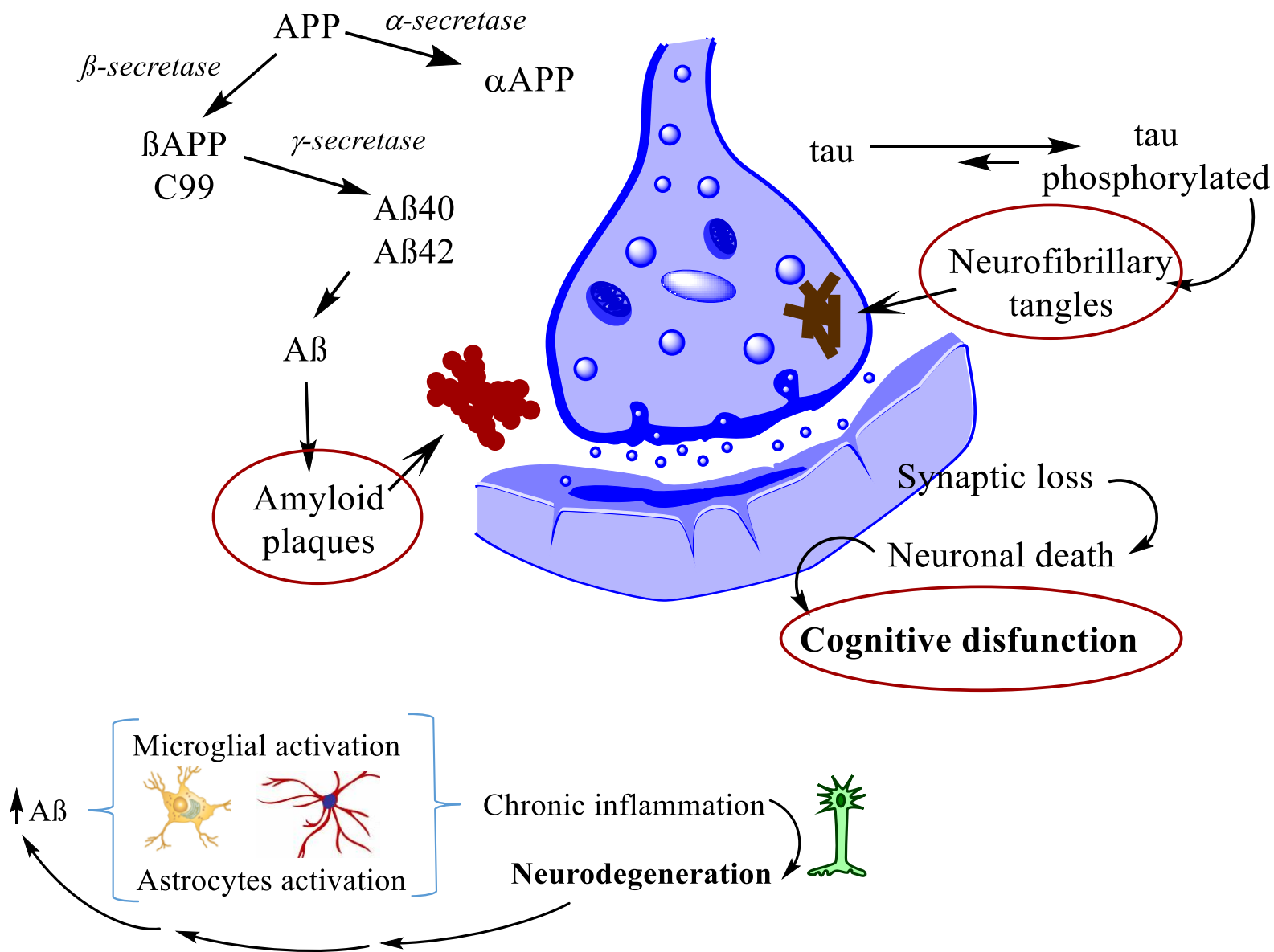


Desorientación en tiempo y espacio



Pérdida en capacidad de juzgar

# ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)



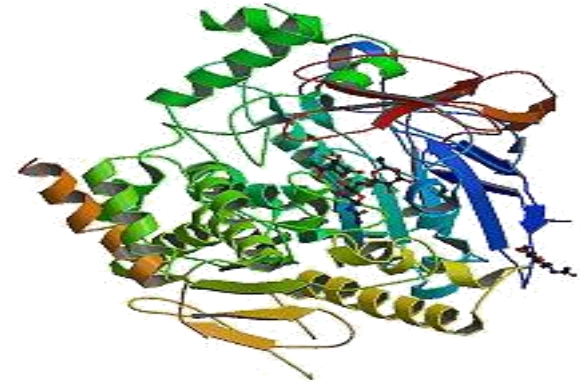
# TRATAMIENTO ACTUAL EA

Donepezilo

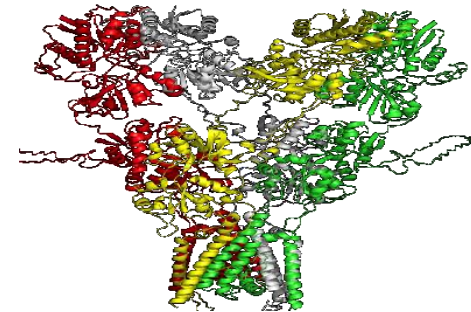
Rivastigmina

Galantamina

Memantina



**Inhibidores de la  
acetilcolinesterasa**



**Antagonista del  
receptor NMDA**

*Introducción*

*Materiales y métodos*

*Resultados*

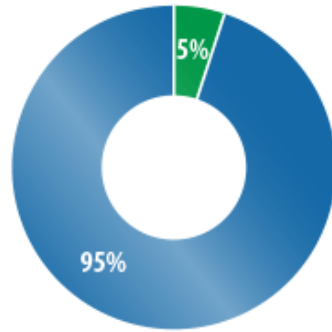
*Conclusiones*



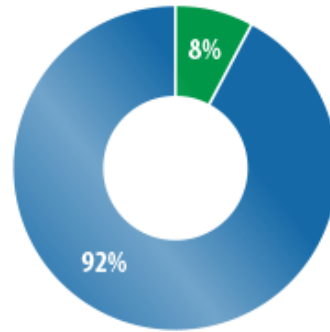
# GLAUCOMA



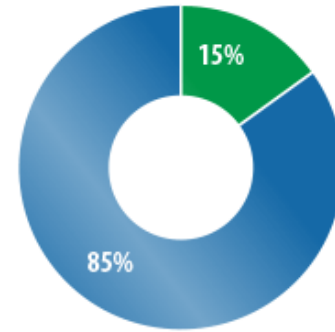
40 AÑOS



60 AÑOS



70 AÑOS



Segunda causa de ceguera en el mundo (OMS)

2040

111 millones

Visión normal



Glaucoma avanzado



Glaucoma extremo



Introducción

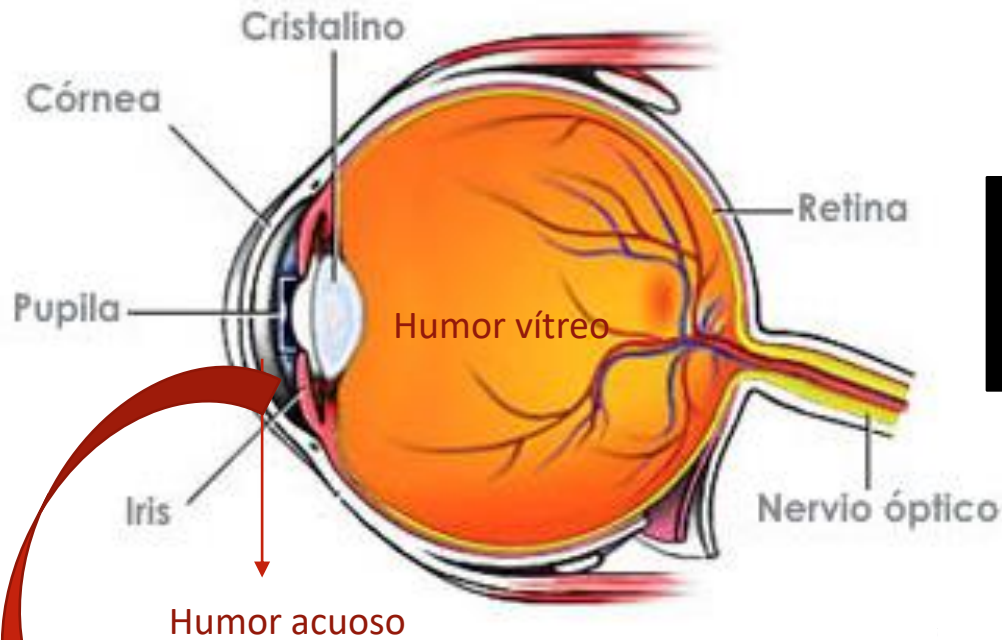
Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones

# GLAUCOMA

Enfermedad ocular

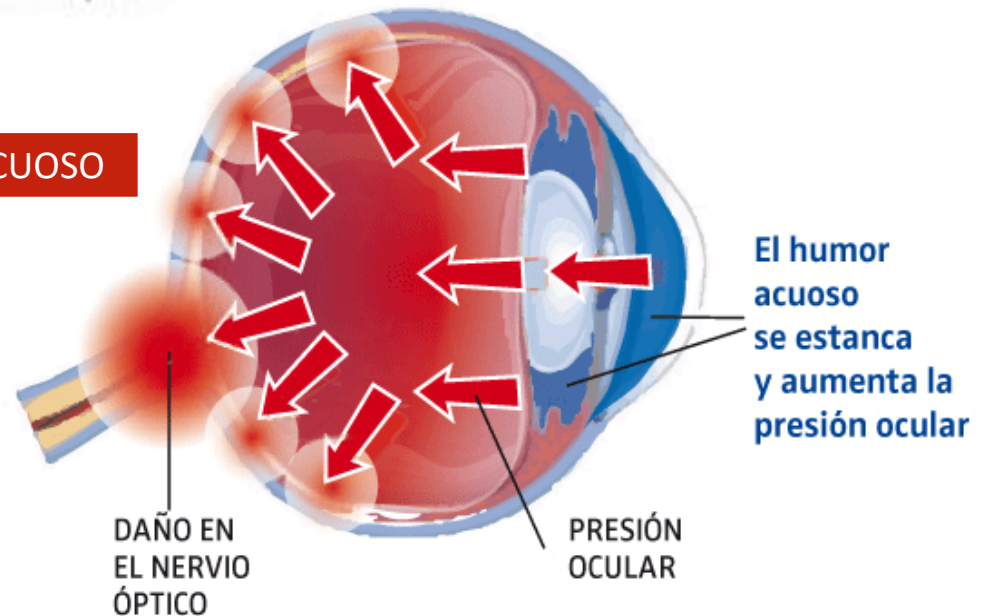


- Pérdida de visión: daño en el nervio óptico
- Aumento de la presión intraocular

Humor acuoso

ACUMULACIÓN HUMOR ACUOSO

OBTURACIÓN TRABÉCULO



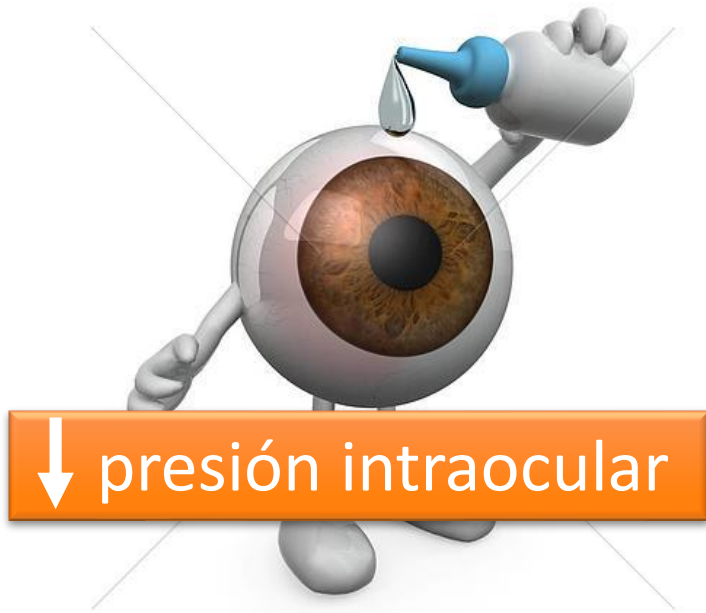
Introducción

Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones

# TRATAMIENTO ACTUAL

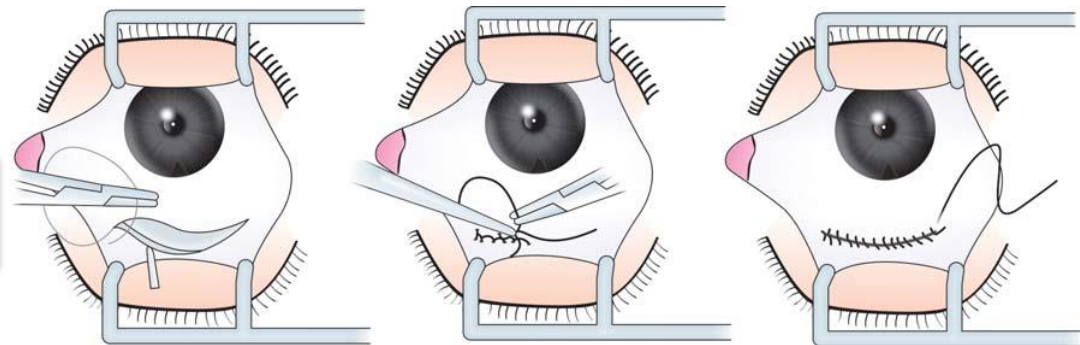


↓ presión intraocular



Láser

Trabeculectomia



**NINGÚN TRATAMIENTO ACTUAL  
RESULTA TOTALMENTE EFICAZ**

# MEMANTINA

## Channel blockers

**M** Memantine

**+**  $Mg^{2+}$

## Agonists

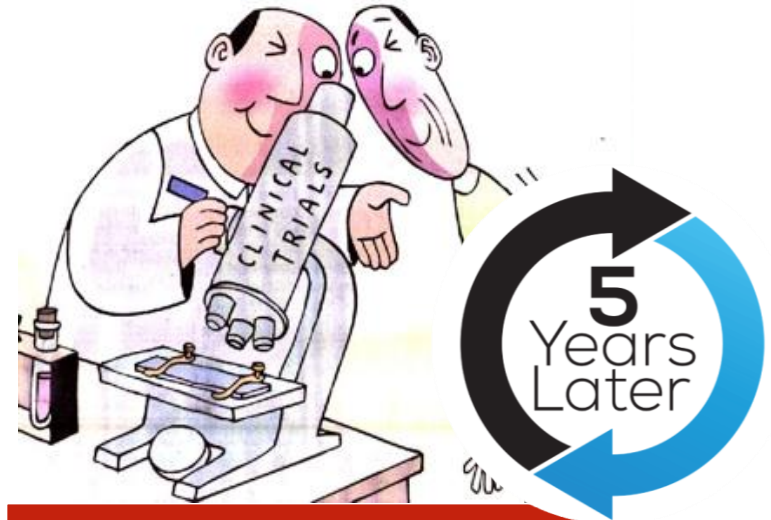
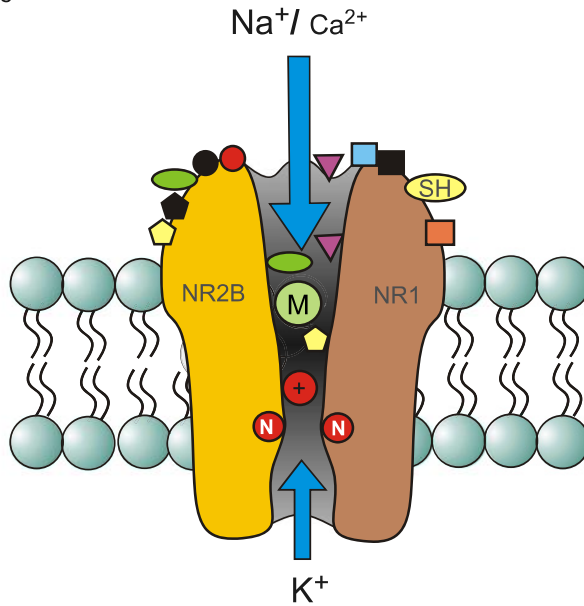
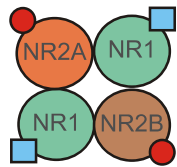
**●** Glutamate  
**●** NMDA

## Antagonists

**●** D-AP5

**■** 5,7-DCKA

**◆** Ifenprodil



## Glaucoma

Ensayos clínicos de fase III mostraron que los efectos no eran significativos

Antagonista no competitiva del receptor de NMDA  
Disminución excitotoxicidad asociada a exceso de GLU



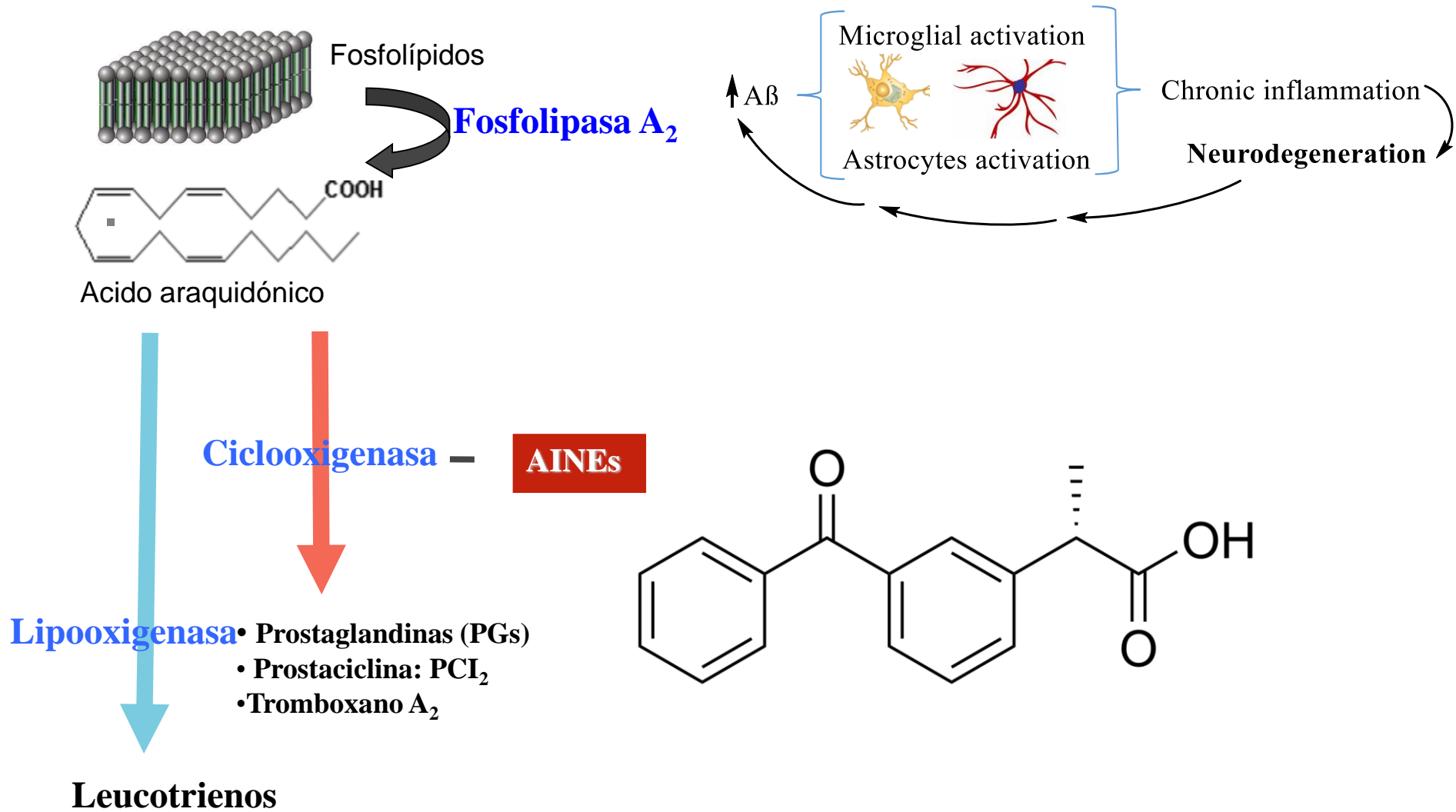
Introducción

Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones

# DEXIBUPROFENO



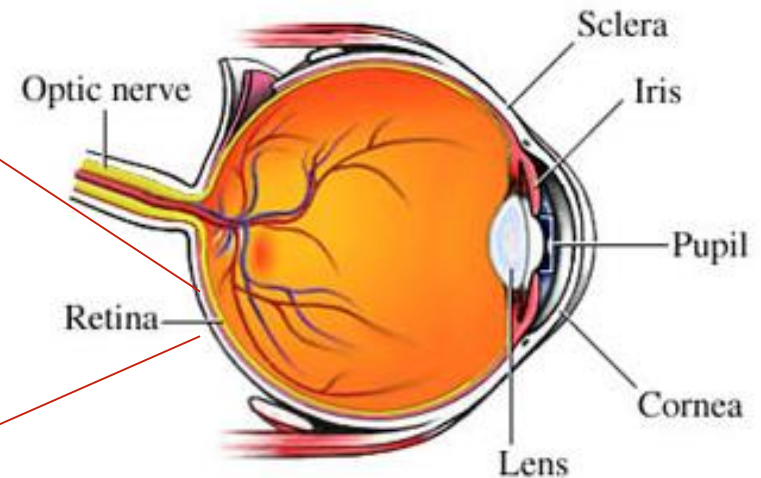
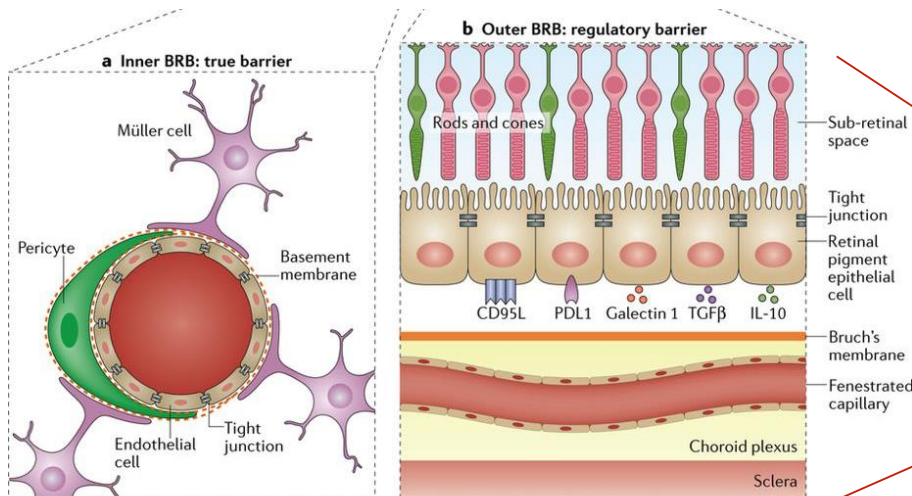
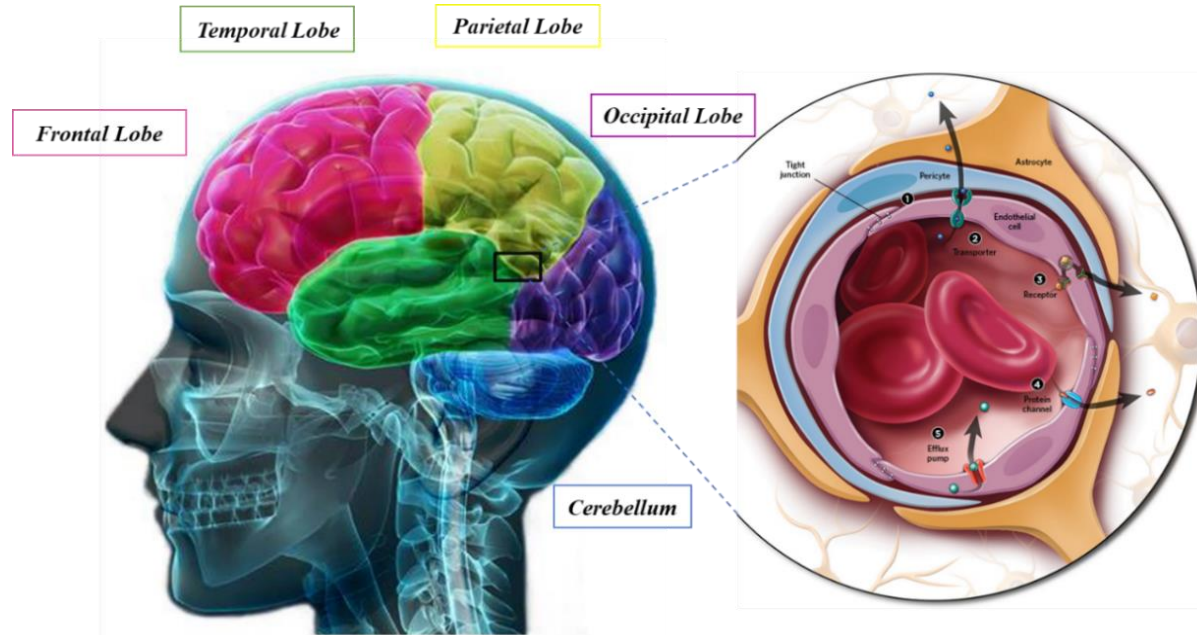
Introducción

Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones

# BARRERAS: BHE Y BHR



Introducción

Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones

# TRANSPORTE DE FÁRMACOS AL CEREBRO

Estrategias para el transporte de fármacos al cerebro

Técnicas invasivas

Disrupción BHE

Liberación directa

Inyección intraventricular

Inyección intracerebral

Técnicas NO invasivas

Métodos químicos

Modificaciones químicas del fármaco

Métodos biológicos

Liberación intranasal

Immuno targeting

Sistemas nanoestructurados

Terapia génica

Introducción

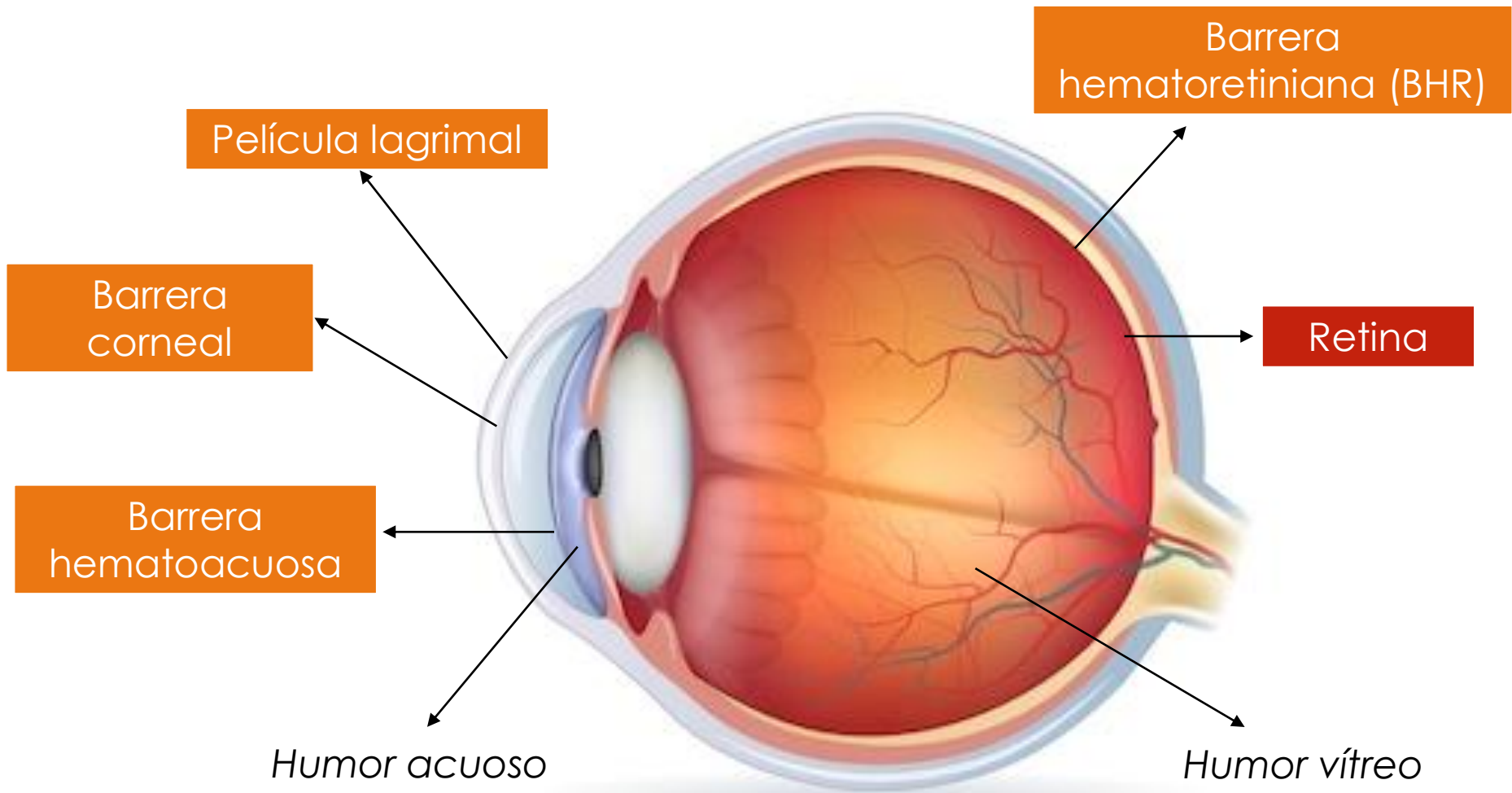
Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones



# BARRERAS – GOTAS OCULARES



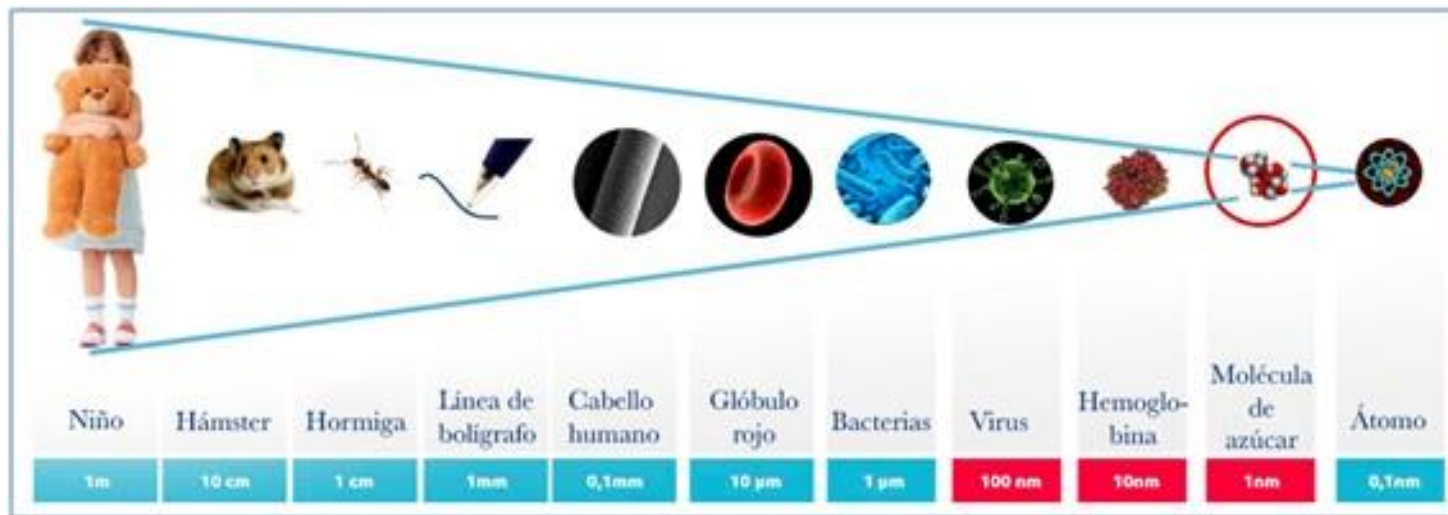
*Introducción*

*Materiales y métodos*

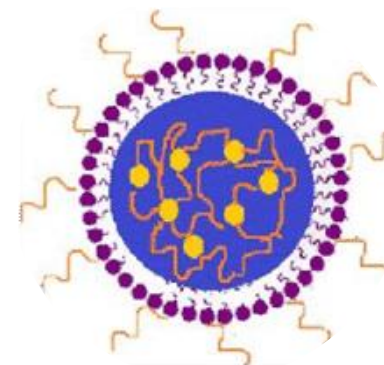
*Resultados*

*Conclusiones*

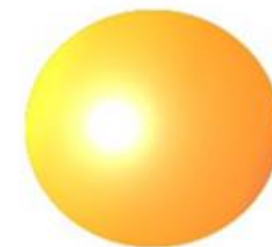
# SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS



Sistemas nanoestructurados de liberación controlada de fármacos (2017SGR1477)



NP's poliméricas



NP's lipídicas

Introducción

Materiales y métodos

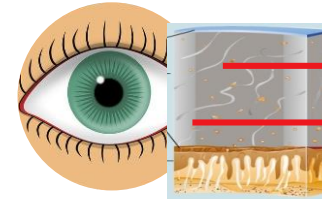
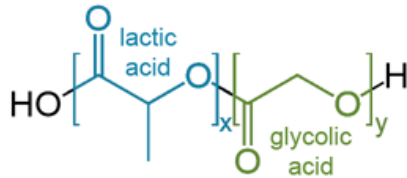
Resultados

Conclusiones

# SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS

## Ácido poli-(D,L)-láctico-co-glicólico (PLGA)

Biocompatible  
Biodegradable  
No tóxico

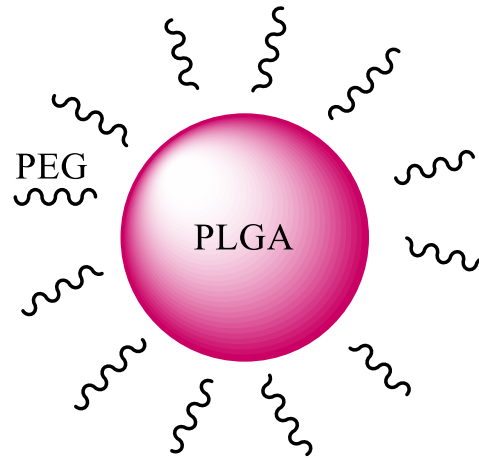


Proteínas

Enzimas

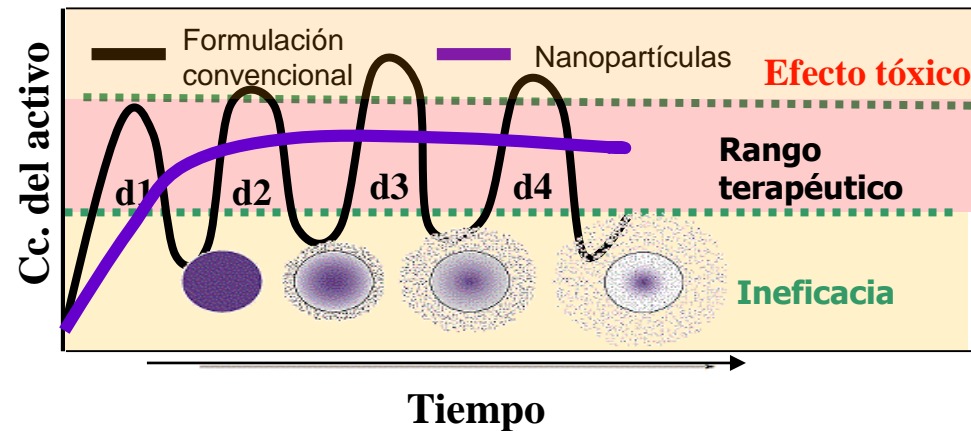
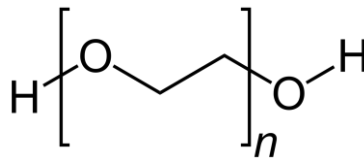
↓ Actividad farmacológica

↓ Biodisponibilidad



## Poly(ethylene glycol) (PEG)

Hidrofilicidad  
Mucoadhesividad  
Paso a través de la BHE y BHR



Introducción

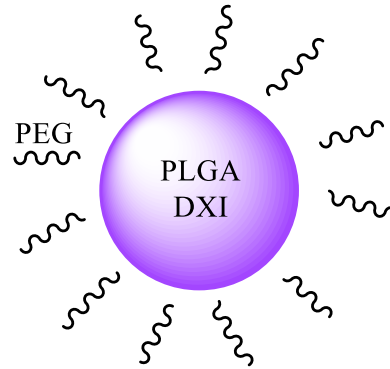
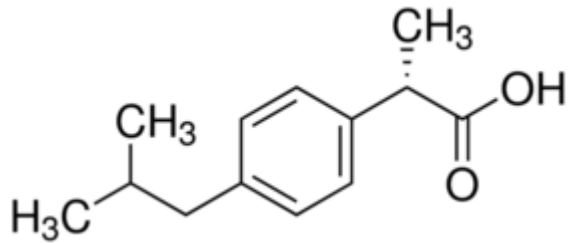
Materiales y métodos

Resultados

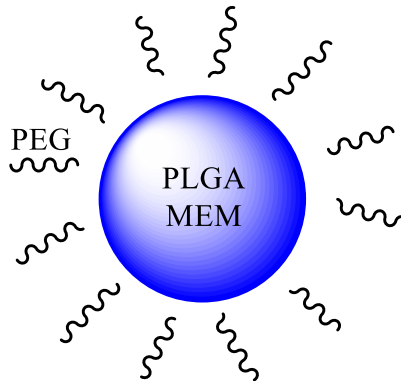
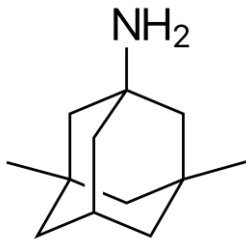
Conclusiones

# OBJETIVOS

## Dexibuprofen (DXI)



## Memantine (MEM)



Introducción

Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones

Elaboración

Eficacia *terapéutica*

Optimización

Citotoxicidad

Interacciones fármaco-  
polímero

Liofilización y  
esterilización

Comportamiento  
biofarmacéutico

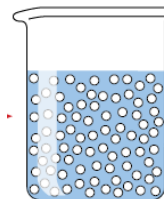
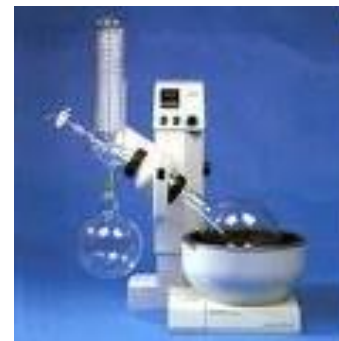
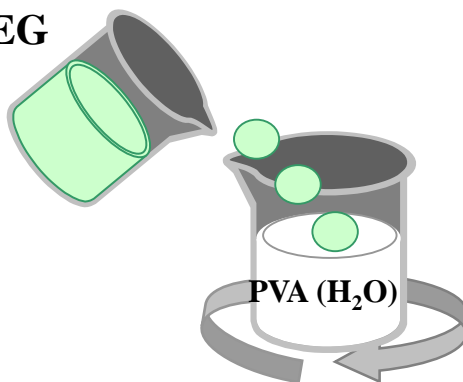
Estabilidad

# ELABORACIÓN DE NANOPARTICULAS

DXI

PLGA-PEG  
Acetona

Método de desplazamiento de solvente



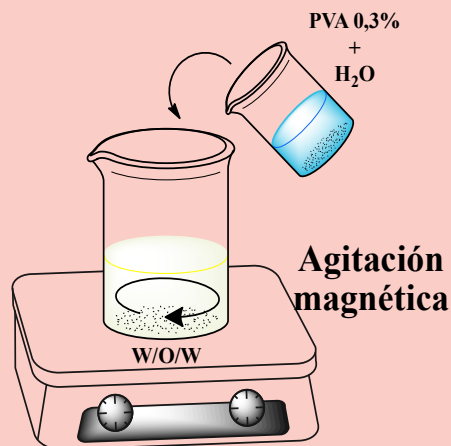
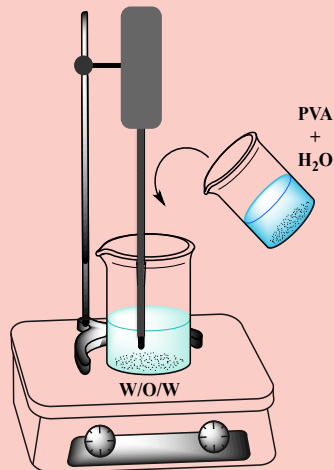
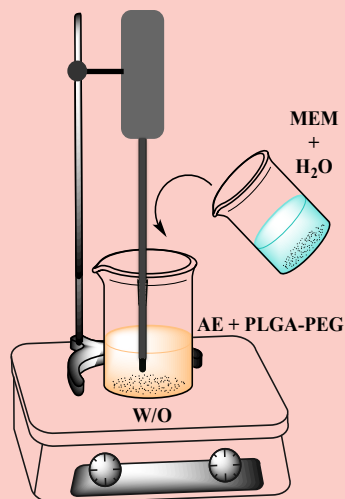
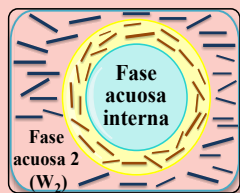
MEM

Método de doble emulsión

— PLGA-PEG

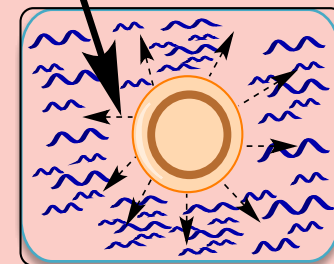


— PVA  
— PLGA-PEG



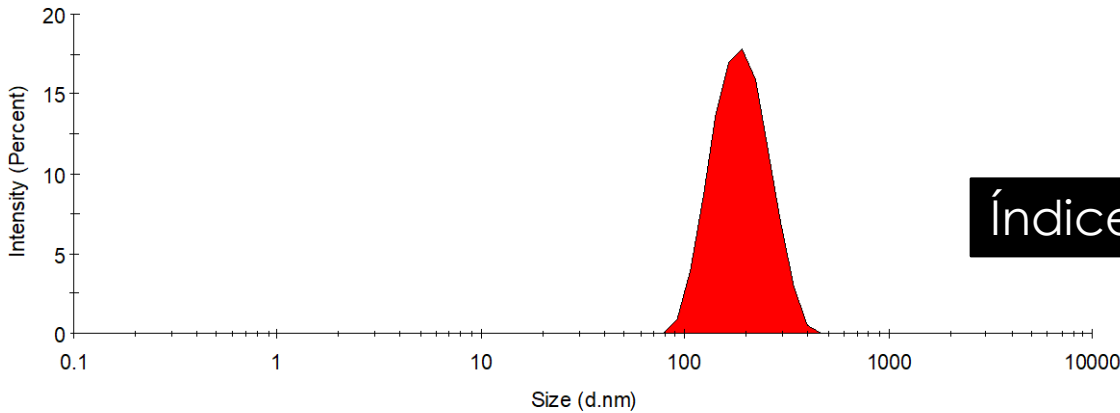
Difusión disolvente

— PVA  
- - - EA

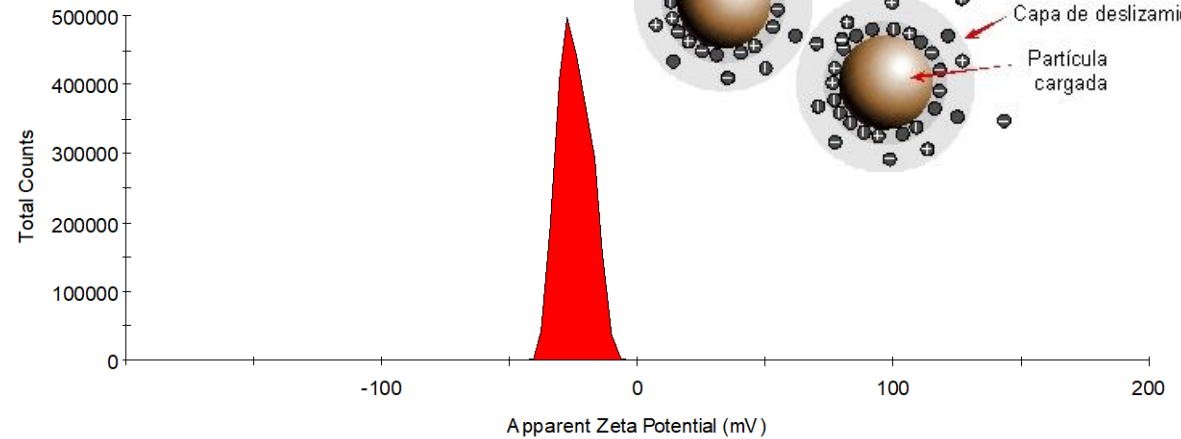


# TAMAÑO DE PARTÍCULA Y CARGA SUPERFICIAL

Tamaño promedio ( $Z_{av}$ )  $\leq 200$  nm



Índice de polidispersión (IP)  $\leq 0.1$



Carga superficial (potencial zeta, ZP)  $\approx -25$  mV

# EFICIENCIA DE ASOCIACIÓN



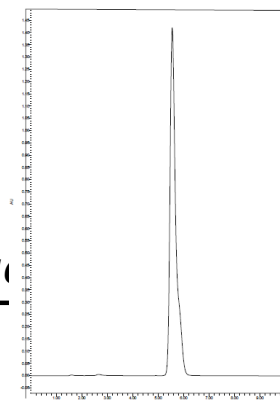
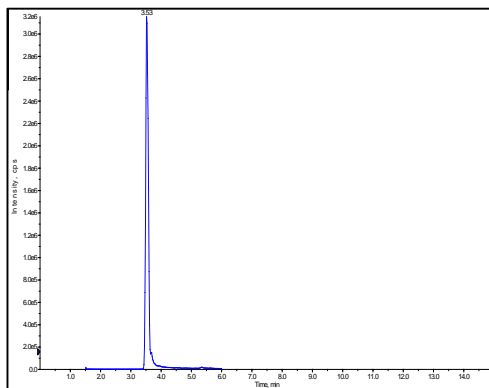
Fármaco libre

Memantina (MEM)

HPLC/MS/MS

Dexibuprofeno (DXI)

HPLC-UV/vis



$$\frac{\text{Cantidad total fármaco} - \text{Fármaco}}{\text{Cantidad total de fármaco}}$$



Elaboración

Eficacia *terapéutica*

Optimización

Citotoxicidad

Interacciones fármaco-  
polímero

Liofilización Y  
esterilización

Comportamiento  
biofarmacéutico

Estabilidad

# OPTIMIZACIÓN

**Diseño factorial (DoE)**  
**PARÁMETROS DE SONICACIÓN**

VARIABLES  
INDEPENDIENTES

Amplitud de onda (%)  
Tiempo 1a sonicación (s)  
Tiempo 2a sonicación (s)

VARIABLES  
DEPENDIENTES

Tamaño promedio (nm)  
Índice de polidispersión (PI)  
Carga superficial (ZP, mV)  
EE (%)

	<b>-1.68</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1.68</b>
<b>Amplitud de onda (%)</b>	21.6	25	30	35	38.4
<b>Tiempo 1a sonicación (s)</b>	13	20	30	40	47
<b>Tiempo 2a sonicación (s)</b>	79	120	180	240	281

Introducción

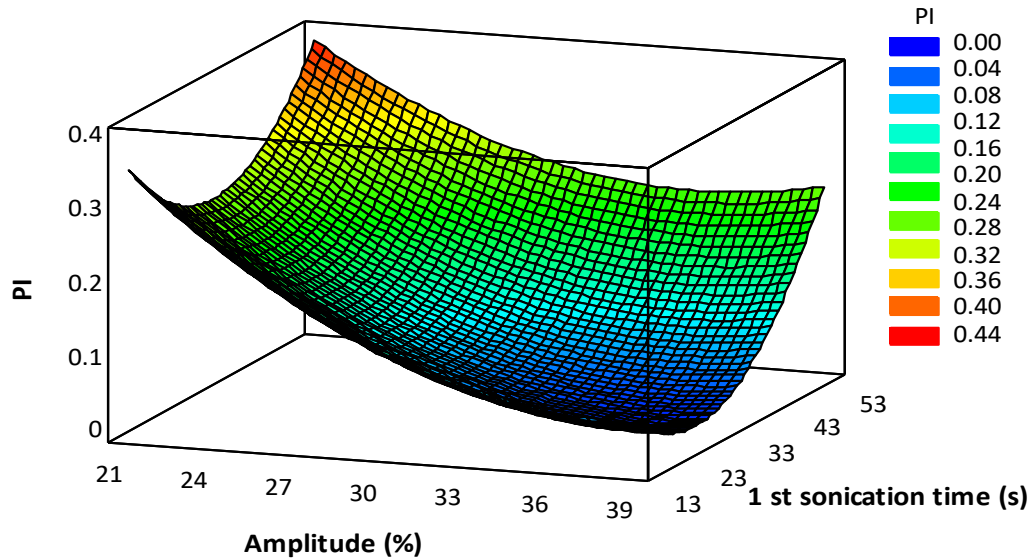
Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones

	Amplitud		Tiempo 1a sonic		Tiempo 2a sonic		Tamaño promedio (nm)	PI	ZP (mV)	EE (%)
	Coded level	(%)	Coded level	(s)	Coded level	(s)				
<b>Factorial points</b>										
F1	-1	25.0	-1	20.0	-1	120.0	390.4 ± 2.2	0.213 ± 0.039	-6.73 ± 0.04	3.46
F2	1	35.0	-1	20.0	-1	120.0	249.7 ± 4.7	0.069 ± 0.022	-6.33 ± 0.49	9.59
F3	-1	25.0	1	40.0	-1	120.0	184.6 ± 0.7	0.125 ± 0.023	-6.43 ± 0.45	42.57
F4	1	35.0	1	40.0	-1	120.0	227.0 ± 2.6	0.057 ± 0.019	-6.72 ± 0.33	36.89
F5	-1	25.0	-1	20.0	1	240.0	243.0 ± 0.9	0.194 ± 0.012	-6.72 ± 0.24	7.43
F6	1	35.0	-1	20.0	1	240.0	248.1 ± 1.9	0.053 ± 0.037	-6.48 ± 0.15	14.69
F7	-1	25.0	1	40.0	1	240.0	258.7 ± 4.5	0.198 ± 0.011	-6.35 ± 0.33	22.63
F8	1	35.0	1	40.0	1	240.0	206.4 ± 1.2	0.061 ± 0.045	-6.67 ± 0.30	2.88
<b>Axial points</b>										
<b>F9</b>	<b>1.68</b>	<b>38.4</b>	<b>0</b>	<b>30.0</b>	<b>0</b>	<b>180.0</b>	<b>222.4 ± 2.4</b>	<b>0.033 ± 0.011</b>	<b>-5.63 ± 0.37</b>	<b>39.12</b>
F10	-1.68	21.6	0	30.0	0	180.0	162.6 ± 0.4	0.262 ± 0.012	-6.83 ± 0.37	39.36
F11	0	30.0	1.68	47.0	0	180.0	226.7 ± 4.4	0.236 ± 0.011	-6.49 ± 0.25	19.94
F12	0	30.0	-1.68	13.0	0	180.0	196.8 ± 2.5	0.103 ± 0.056	-6.47 ± 0.55	43.10
F13	0	30.0	0	30.0	1.68	281.0	239.8 ± 0.7	0.056 ± 0.020	-5.77 ± 0.47	23.39
F14	0	30.0	0	30.0	-1.68	79.0	382.6 ± 5.2	0.221 ± 0.011	-5.93 ± 0.21	33.95
<b>Center points</b>										
F15	0	30.0	0	30.0	0	180.0	220.1 ± 5.6	0.059 ± 0.019	-5.36 ± 0.03	24.01
F16	0	30.0	0	30.0	0	180.0	222.1 ± 3.6	0.062 ± 0.021	-5.36 ± 0.11	23.23

# OPTIMIZACIÓN - QBD

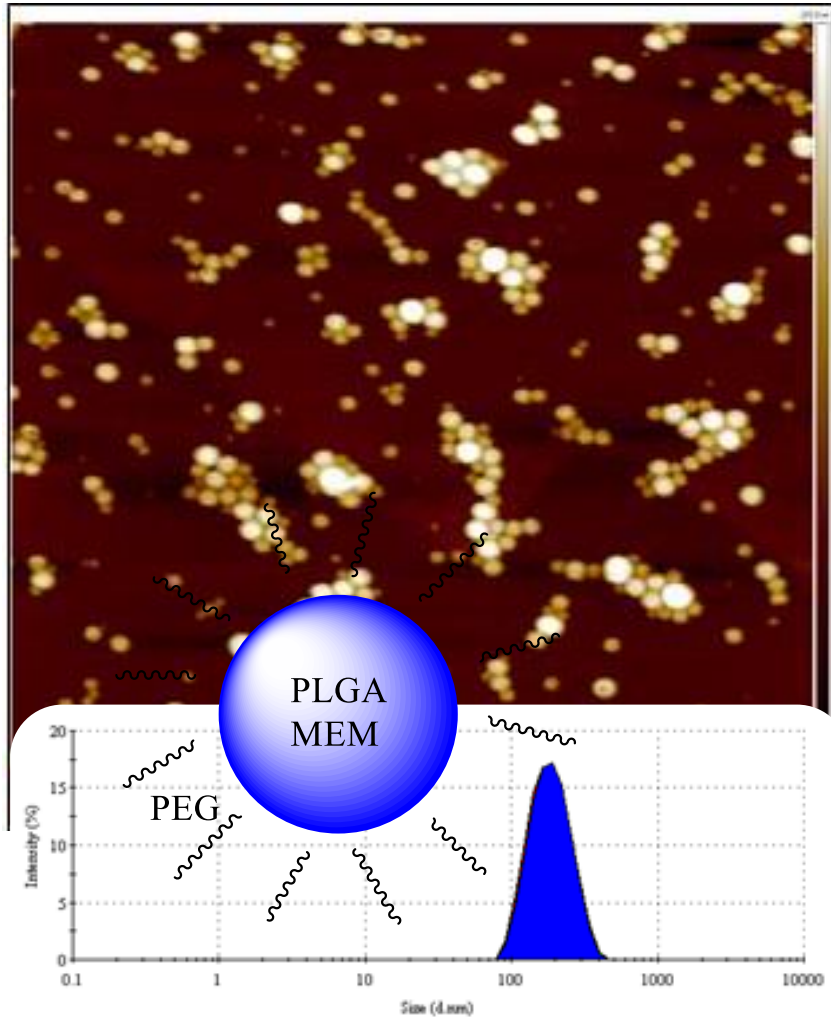


*Tiempo 2a sonicación: 180 s*

La interacción entre la 1a y 2a sonicación aumenta el tamaño promedio

**Son necesarias amplitudes altas ( $\geq 38\%$ ) para obtener NPs pequeñas y monodispersas**

# CARACTERIZACIÓN

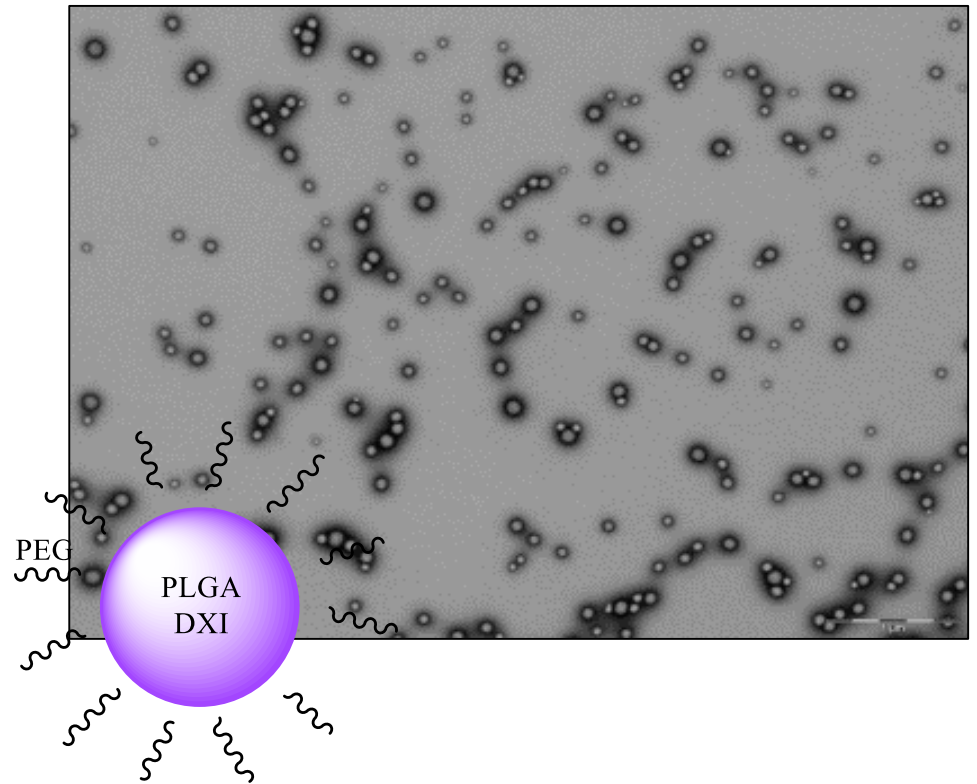


Tamaño promedio  $\leq 200$  nm

PI  $\leq 0.1$

ZP - 25 mV

EA 80-99%



Elaboración

Optimización

Interacciones fármaco-  
polímero

Comportamiento  
biofarmacéutico

Estabilidad

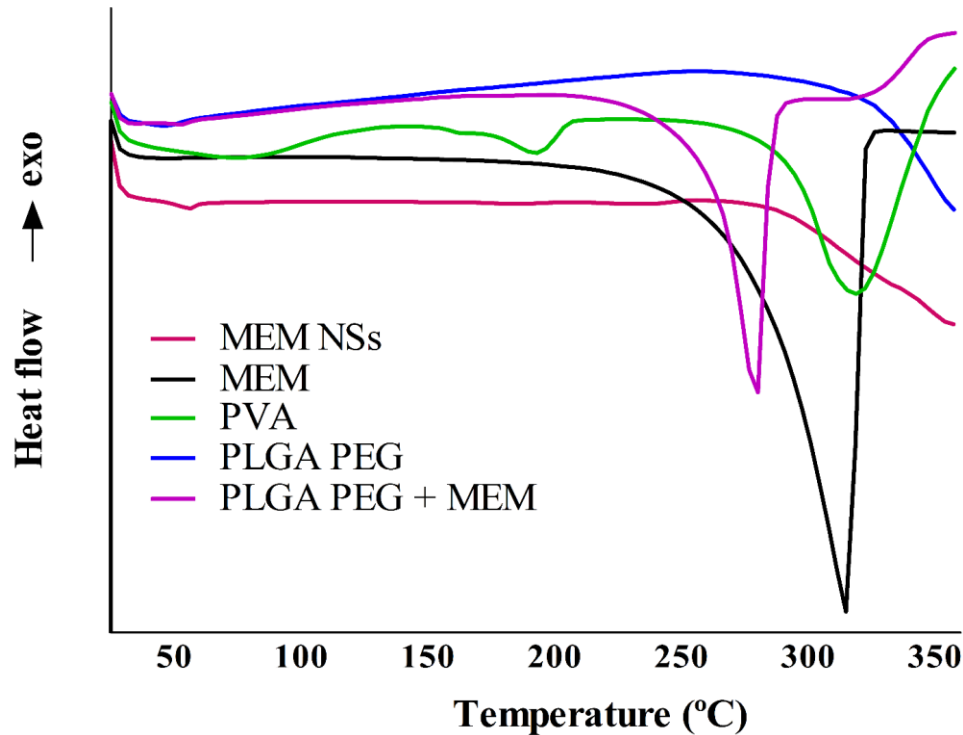
Liofilización Y  
esterilización

Citotoxicidad

Eficacia *terapéutica*

# INTERACCIONES FÁRMACO-POLÍMERO

DSC



MEM NPs

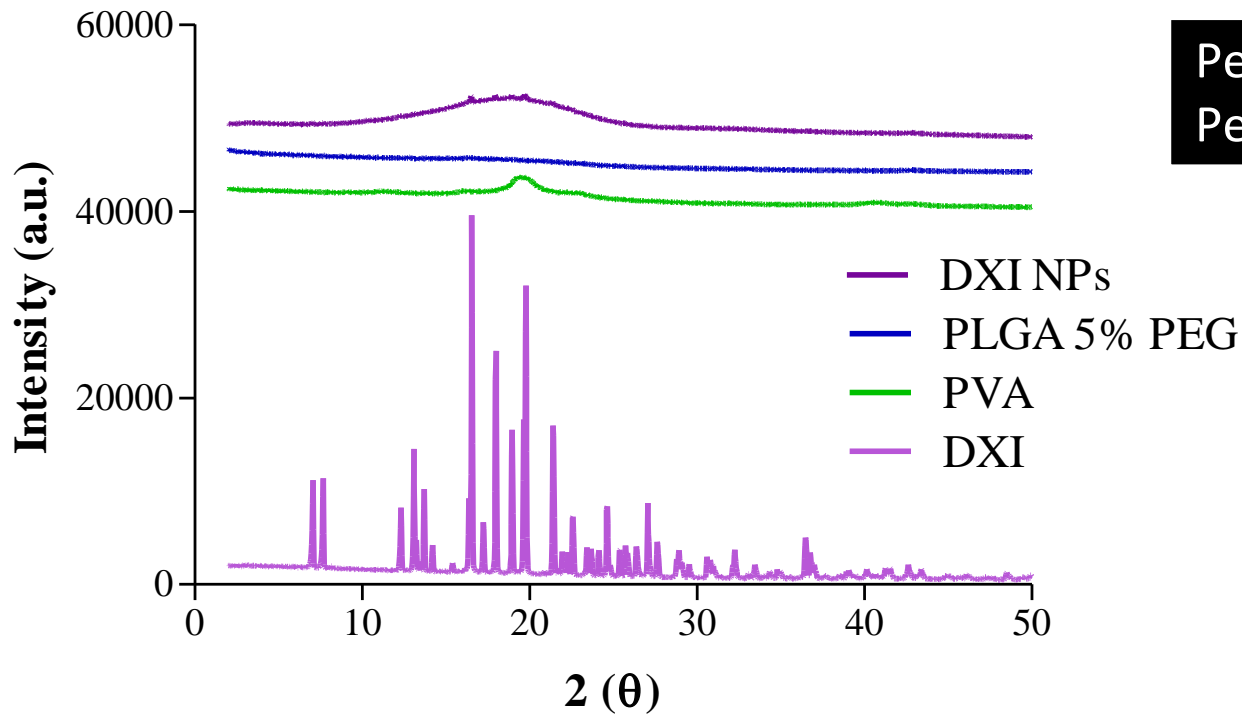
Aumenta la T<sub>g</sub> (T<sub>g</sub> PLGA-PEG 47.30 °C)  
No descomposición MEM

25-350 °C  
10 °C/min



# INTERACCIONES FÁRMACO-POLÍMERO

## XRD



## DXI NPs

Perfil similar al del polímero  
Pequeños picos de DXI





Elaboración

Eficacia *terapéutica*

Optimización

Citotoxicidad

Interacciones fármaco-  
polímero

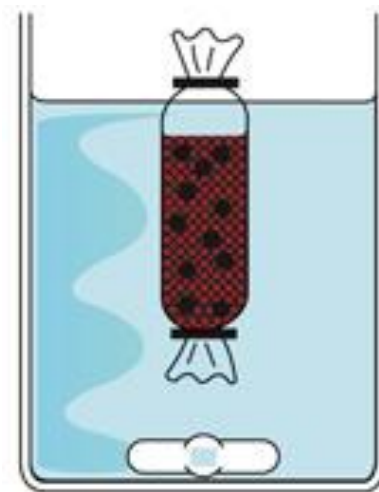
Liofilización Y  
esterilización

Comportamiento  
biofarmacéutico

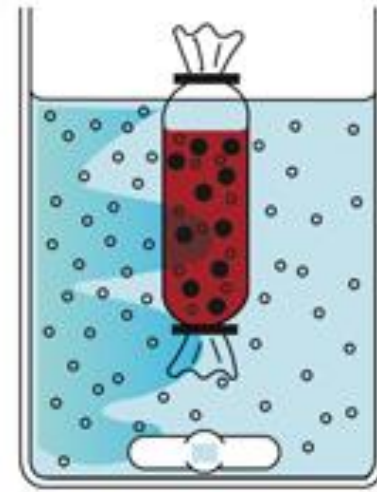
Estabilidad

# LIBERACIÓN IN VITRO

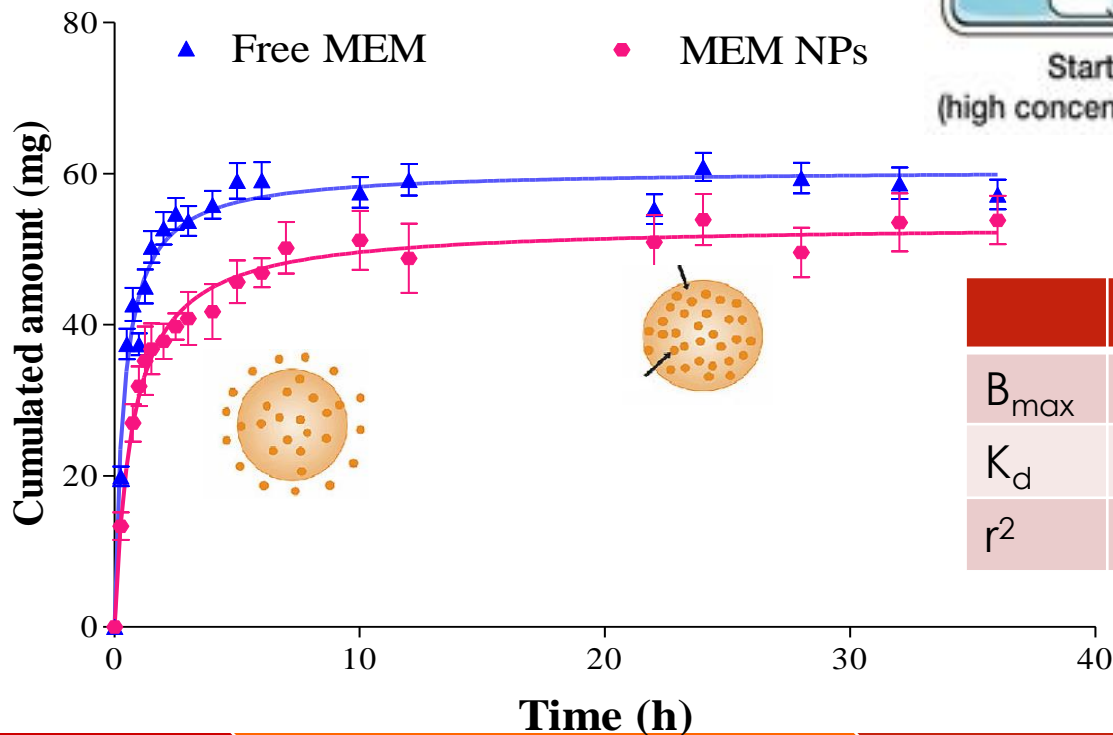
Diálisis directa



Start Dialysis  
(high concentration gradient)



End Dialysis  
(equilibrium)



	Free MEM	MEM NPs
$B_{max}$	$60,51 \pm 0,94$	$56,29 \pm 0,94$
$K_d$	$0,38 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,05$
$r^2$	0,9905	0,9957

Introducción

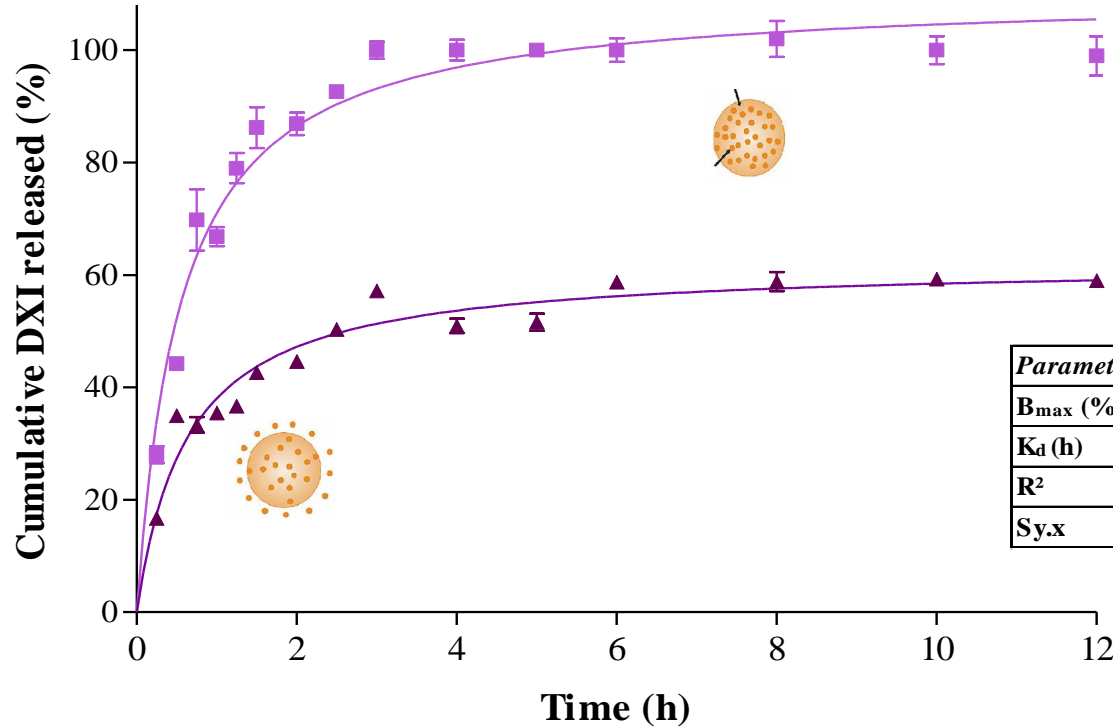
Materiales y métodos

Resultados

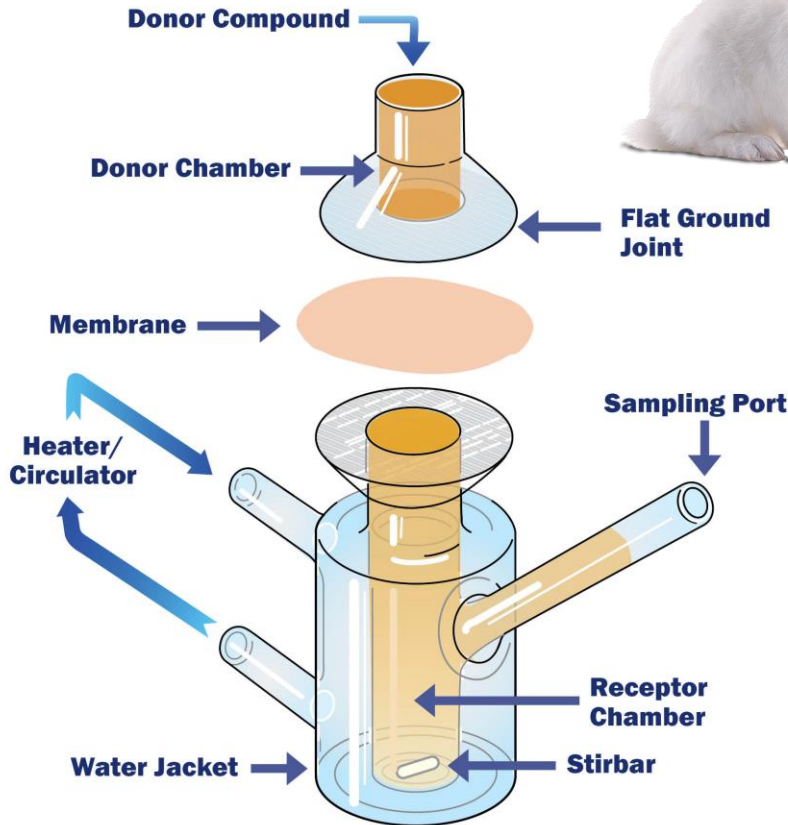
Conclusiones

# LIBERACIÓN IN VITRO

Diálisis inversa

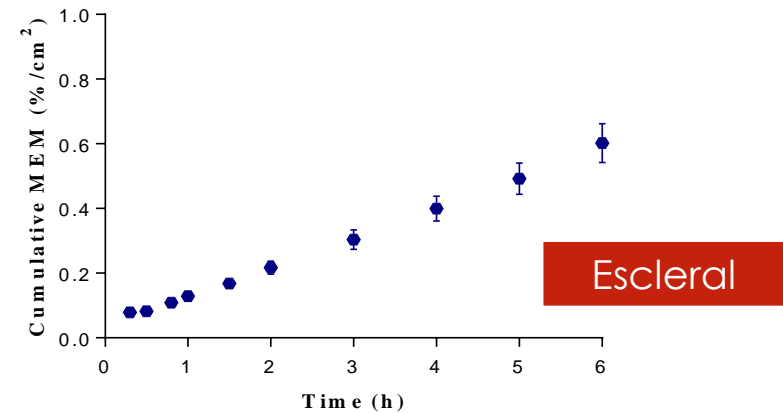
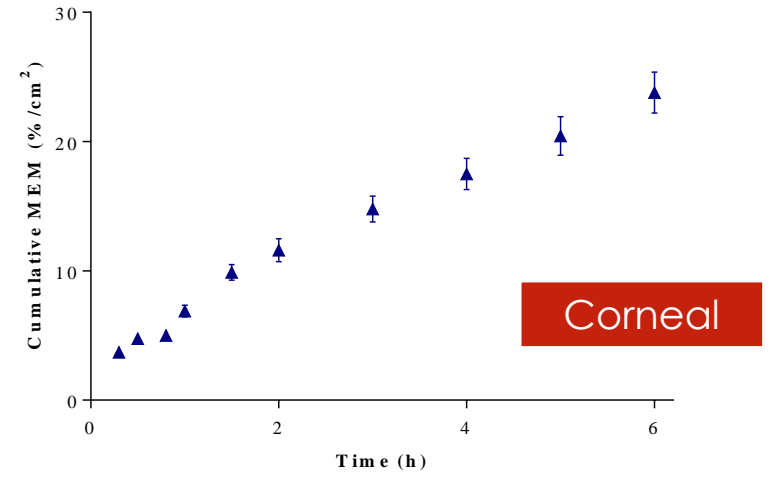


# PERMACIÓN CORNEAL Y ESCLERAL



<http://permeagear.com/franz-cells/>

Células de difusión de Franz



Elaboración

Optimización

Interacciones fármaco-  
polímero

Comportamiento  
biofarmacéutico

Estabilidad

Liofilización Y  
esterilización

Citotoxicidad

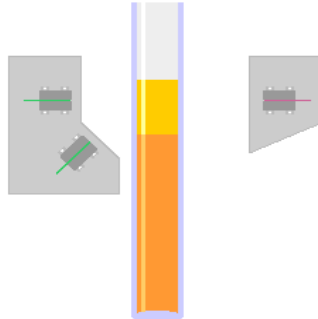
Eficacia *terapéutica*

# ESTUDIOS DE ESTABILIDAD



TurbiscanLab®

1/ Positionning  
Positionnement



Luz emitida



Transmisión (T)  
 $\theta = 180^\circ$

Luz emitida

Retrodispersión (BS)  
 $\theta = 135^\circ$

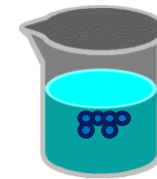
## Fenómenos de Inestabilidad

Cambios Velocidad Migración

Modificación del Tamaño



Sedimentación



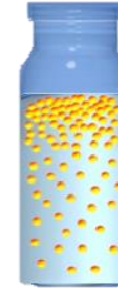
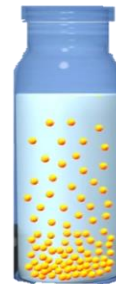
Creaming



Floculación  
(reversible con  
agitación)

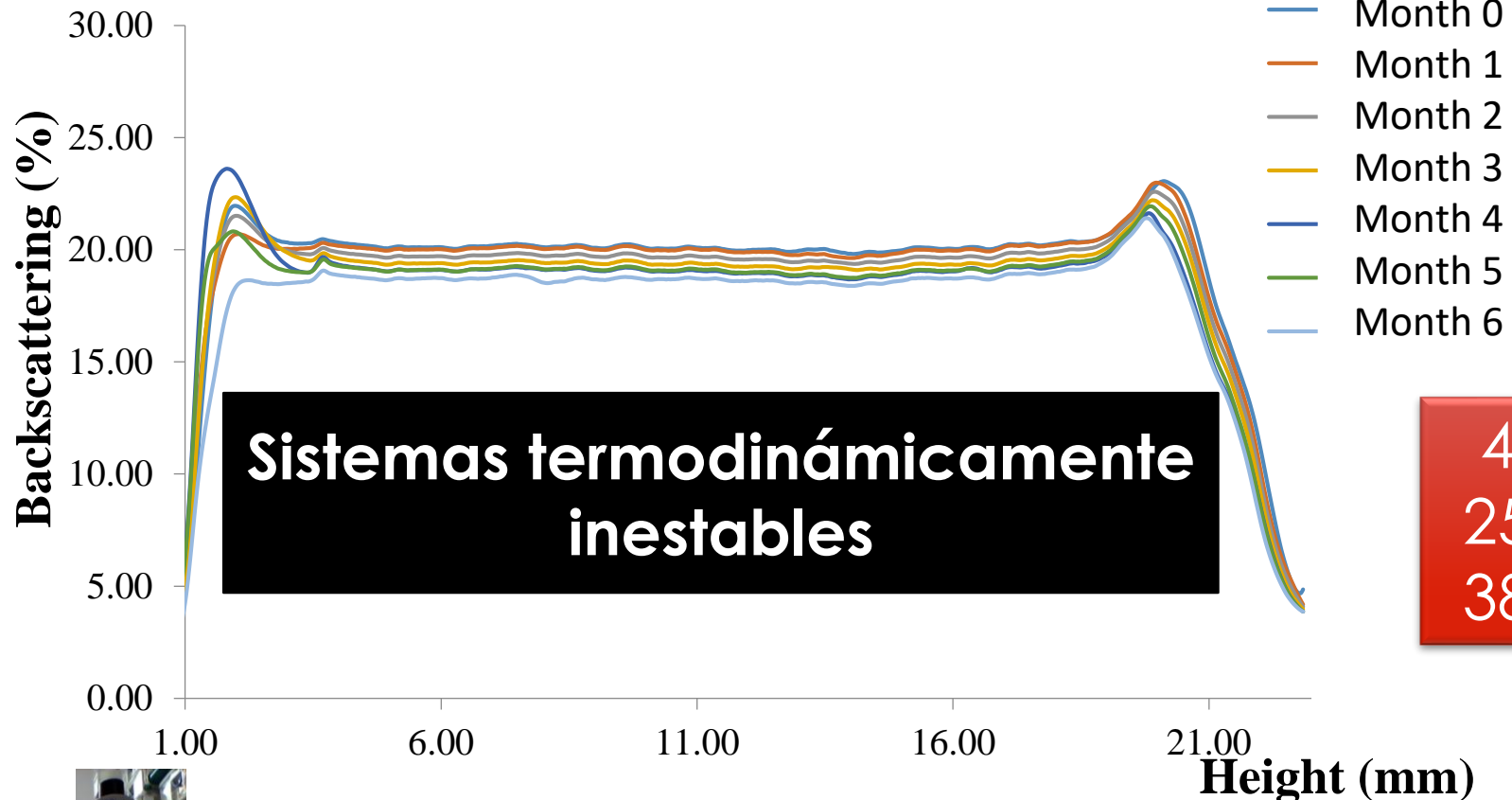


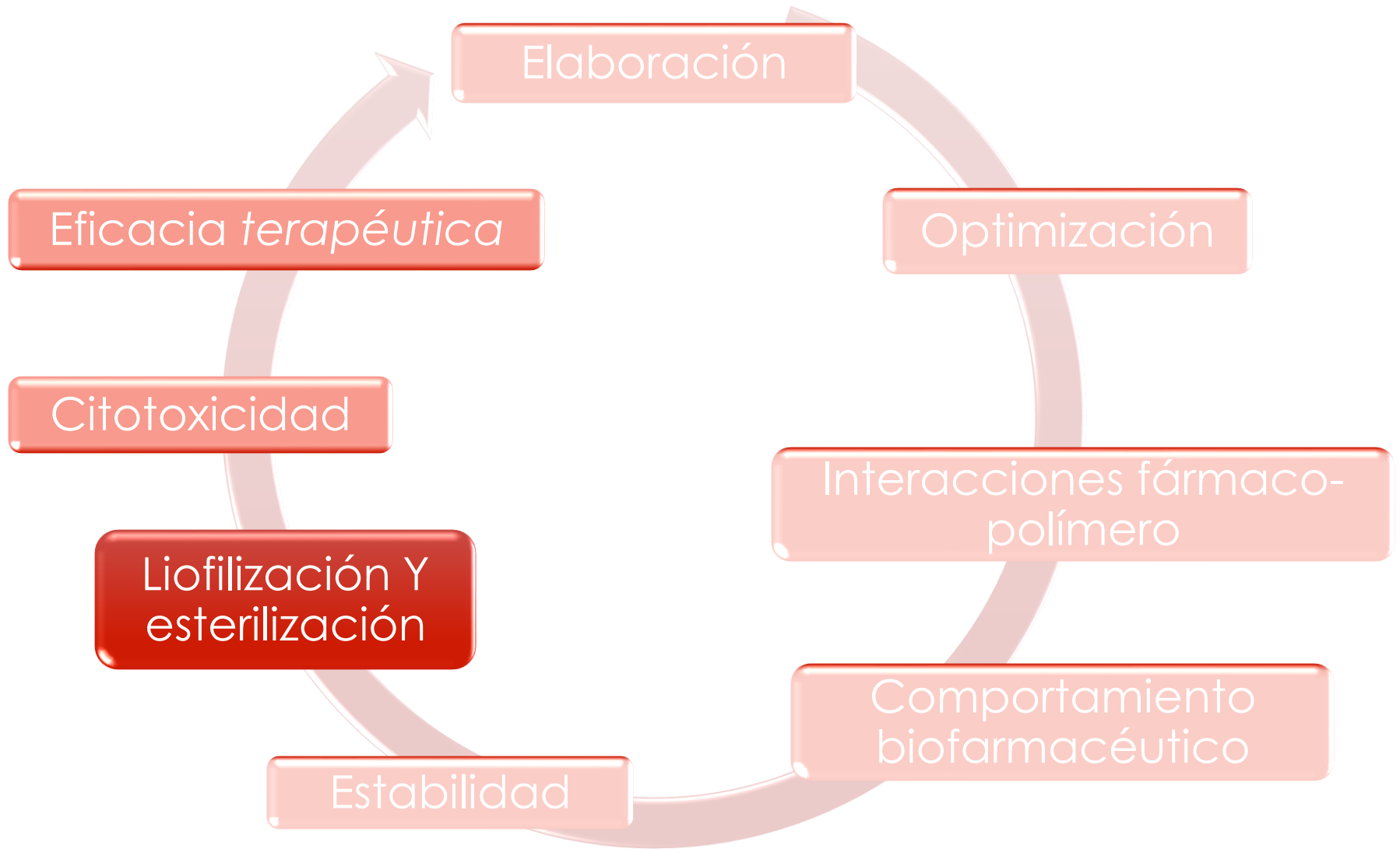
Coalescencia  
(irreversible)



# ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

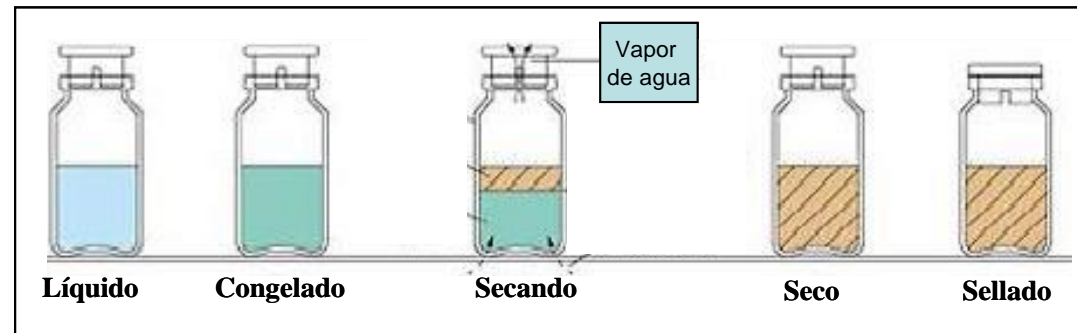
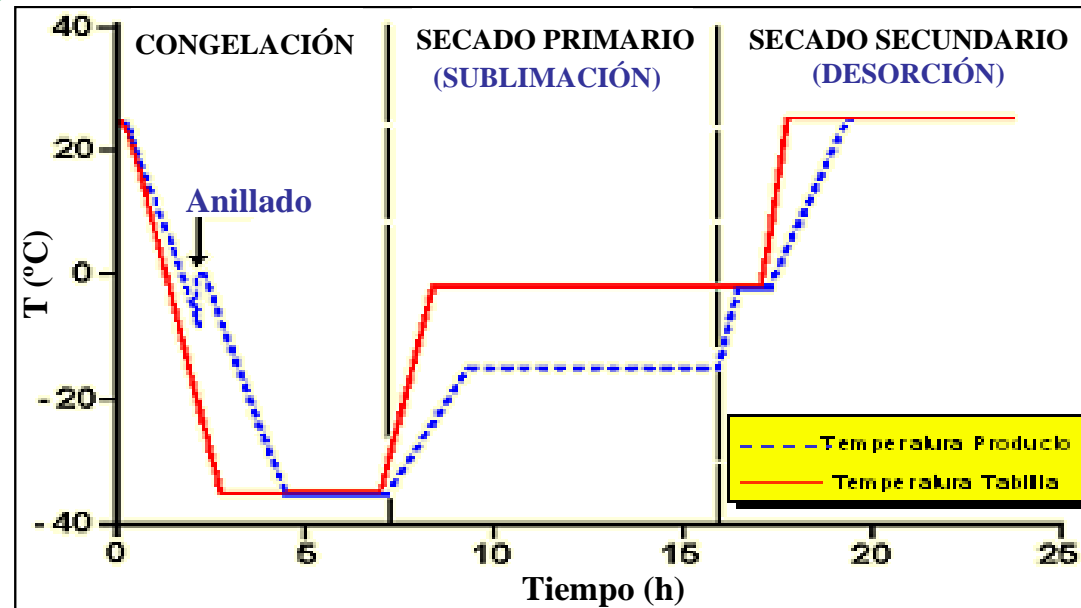
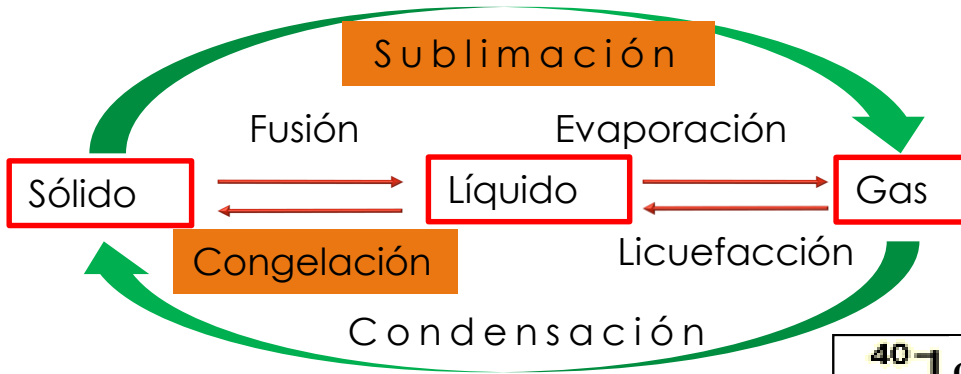
Estables a 4 °C, 25 °C







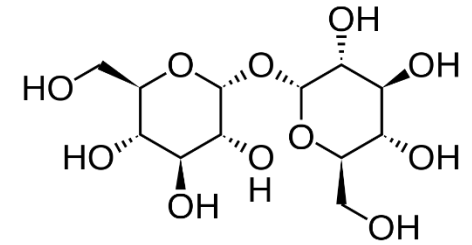
# ESTUDIOS DE LIOFILIZACIÓN



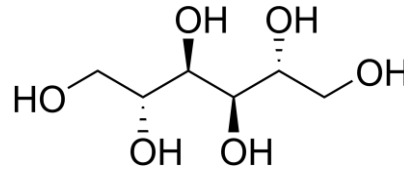
# ESTUDIOS DE LIOFILIZACIÓN

Crioprotector	%
Mannitol	5,5
Fructosa	6,0
Sacarosa	10,5
Trehalosa	11,8

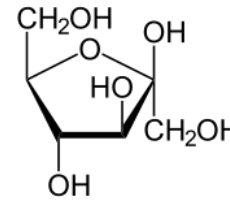
Osmolaridad  
280 mOsm/l



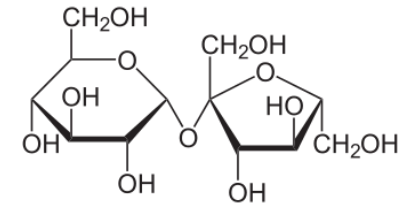
Trehalosa



Mannitol



Fructosa



Sacarosa

Etapas	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Tiempo (h)
Congelación	-50	1	4 h
Secado primario	-34	354	16 h
Secado secundario	25	354	2 h

# ESTUDIOS DE LIOFILIZACIÓN

## DXI NPs

Crioprotector	RATIO ANTES /DESPUÉS LIOFILIZAR		
	Tamaño (nm)	PI	ZP (mV)
Mannitol	0.52	0.37	1.18
Sacarosa	<b>0.98</b>	<b>1.11</b>	<b>0.97</b>
Trehalosa	<b>0.96</b>	<b>0.65</b>	<b>0.78</b>
-	0.04	0.20	1.69

## MEM NPs

Crioprotector	RATIO ANTES /DESPUÉS LIOFILIZAR		
	Tamaño (nm)	PI	ZP (mV)
Manitol	0.20	0.04	0.95
Sacarosa	0.97	0.74	0.90
Trehalosa	<b>0.96</b>	<b>0.80</b>	<b>0.98</b>
-	0.03	0.06	1.16

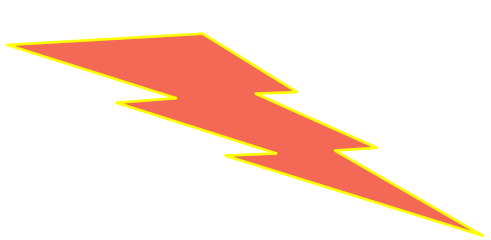


# ESTERILIZACIÓN



PLGA-PEG 5% termosensible -----> ~~Calor y óxido de etileno~~

<sup>60</sup>Co irradiation source  
25 kGy (Eur. Ph. Pharmaceutical products)



- ✓ Alto poder de penetración
- ✓ Baja reactividad química
- ✓ Bajos niveles de residuos

No varían las propiedades fisicoquímicas

**Tamaño, PI, ZP, EE**

Elaboración

Optimización

Interacciones fármaco-  
polímero

Comportamiento  
biofarmacéutico

Estabilidad

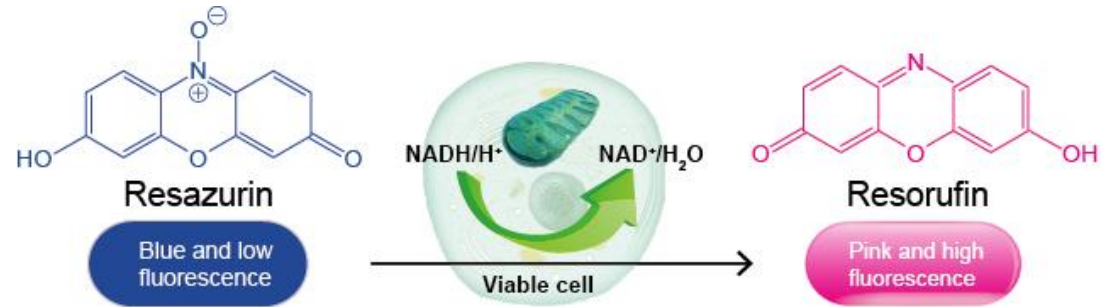
Liofilización Y  
esterilización

Citotoxicidad

Eficacia *terapéutica*

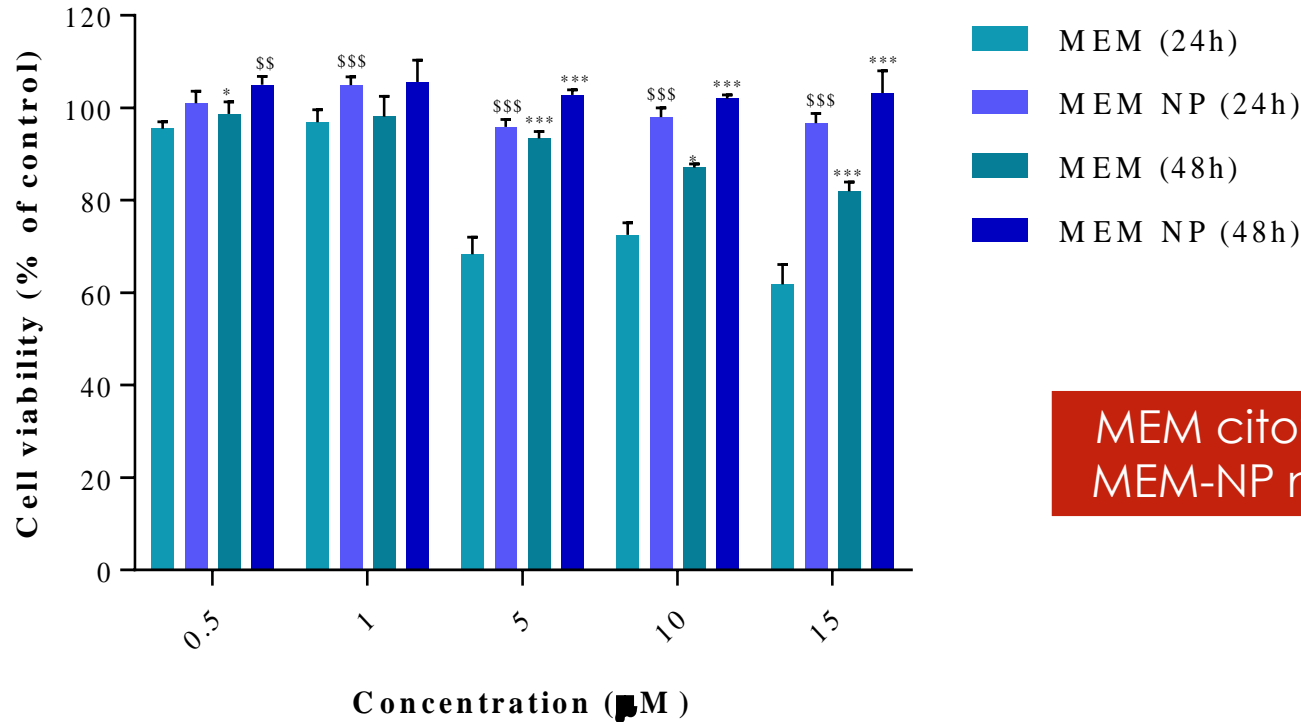
# ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

## Alamar Blue



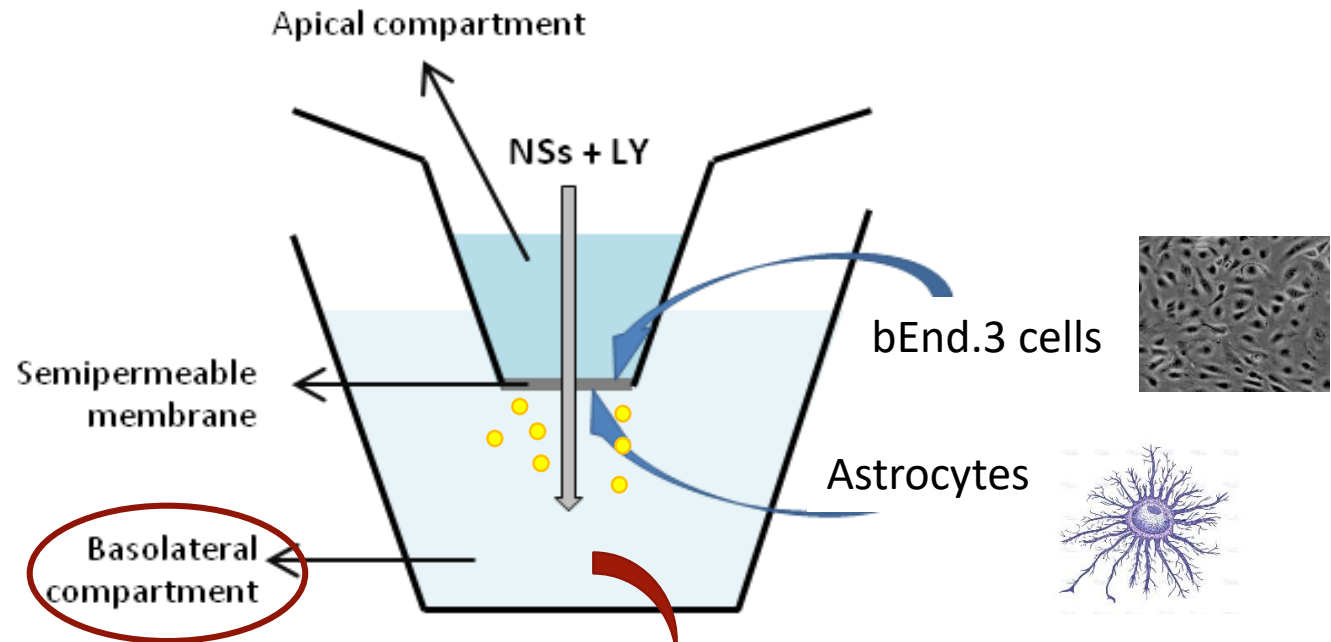
<http://www.abpbio.com/product/cell-quant-alamarblue-cell-viability-reagent/>

### Células Y-79 (retinoblastoma)



MEM citotóxica  $\geq 5 \mu\text{M}$   
MEM-NP no citotóxicas

# TRANSPORTE IN VITRO A TRAVÉS DE LA BHE



1 hora

45% en la barrera

No causan  
disrupción de la BHE



Elaboración

Eficacia terapéutica

Optimización

Citotoxicidad

Interacciones fármaco-  
polímero

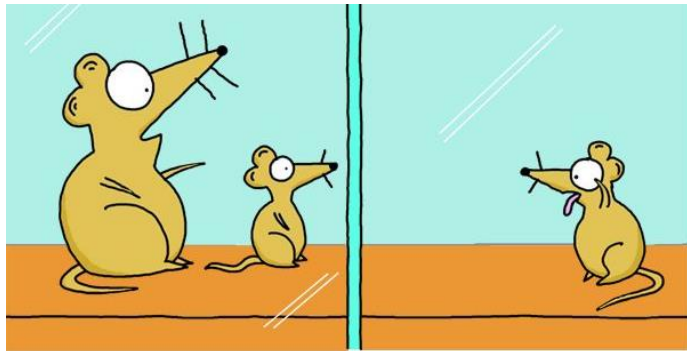
Liofilización Y  
esterilización

Comportamiento  
biofarmacéutico

Estabilidad



# MODELO DE RATÓN PARA LA EA

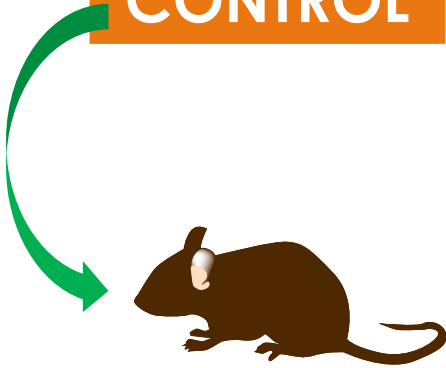


"Don't play with him, he is Wild Type."

Ratones transgénicos **APP/PS1**

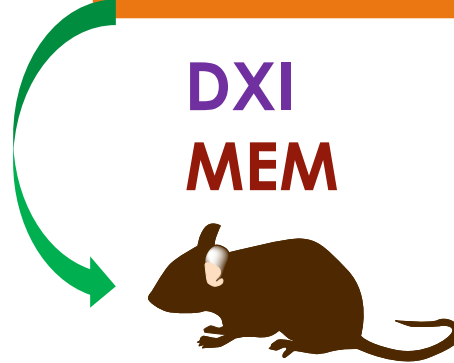
Ratones salvajes **WT (C57Bl6)**

**CONTROL**



**FÁRMACO LIBRE**

**DXI**  
**MEM**



**PLGA-PEG NPs**

**NPs DXI**  
**NPs MEM**



*8 h tratamiento*  
*40 h no tratadas*

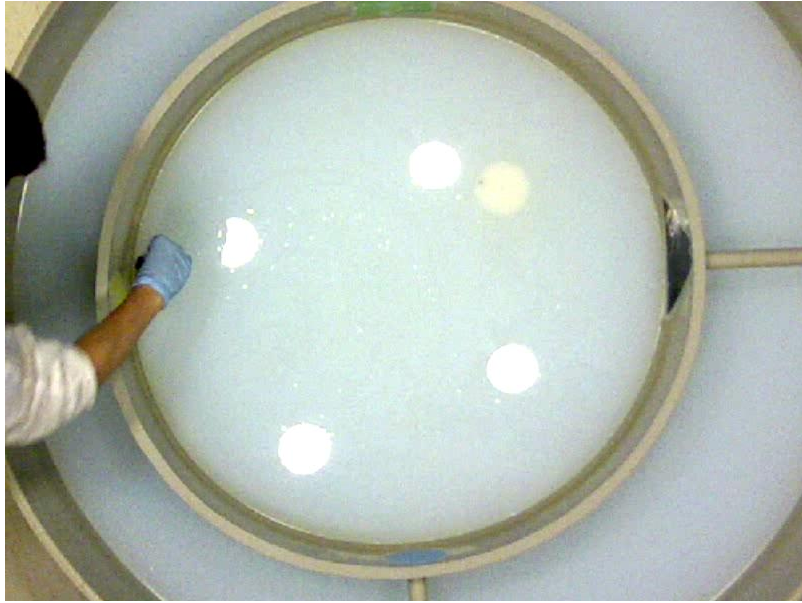
Introducción

Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones

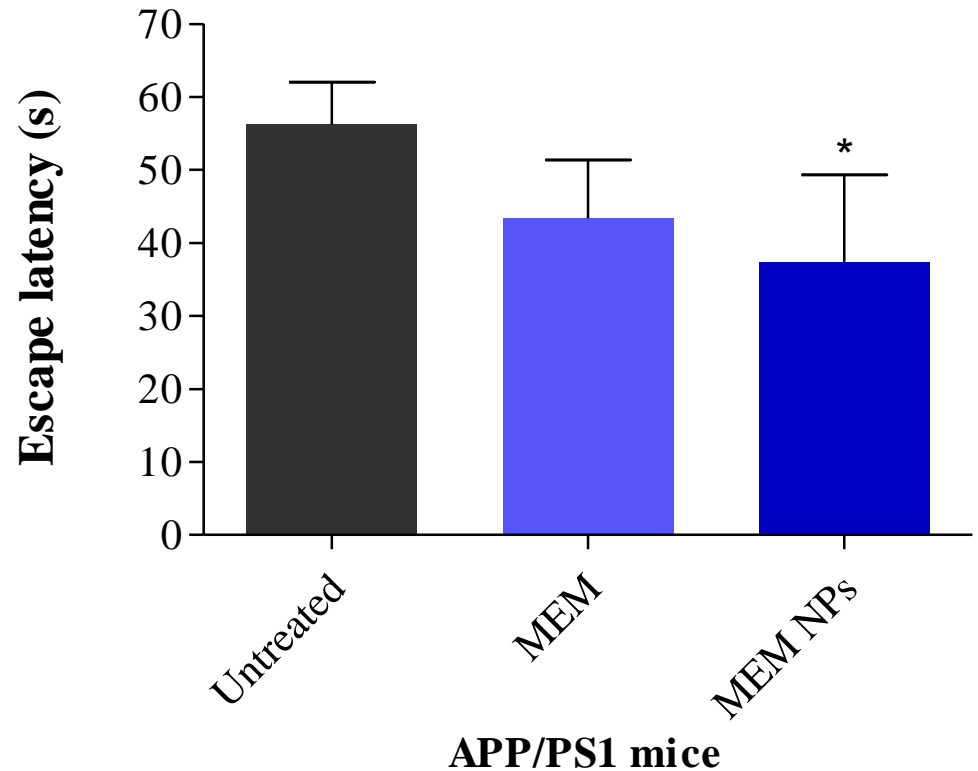
# MORRIS WATER MAZE



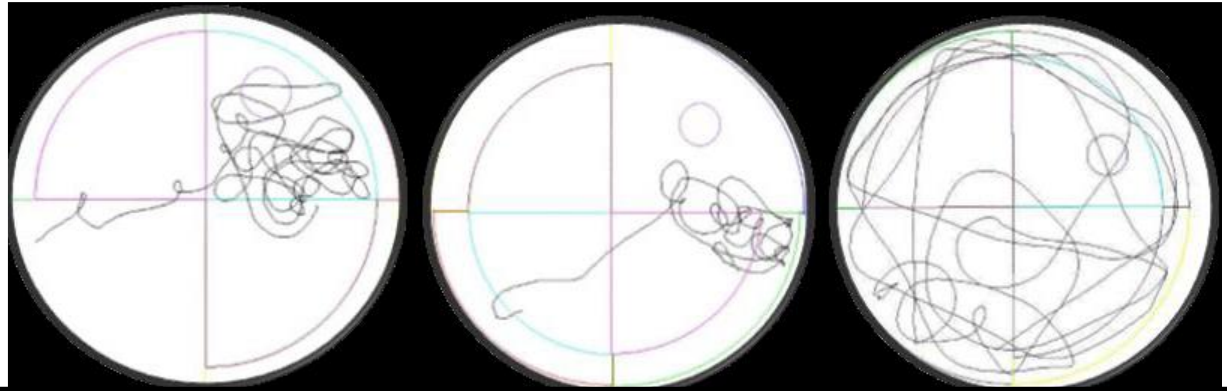
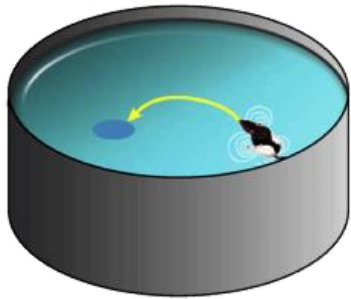
6 días de entrenamiento

Séptimo día: test

**APP/PS1 MEM NPs: < 40s**



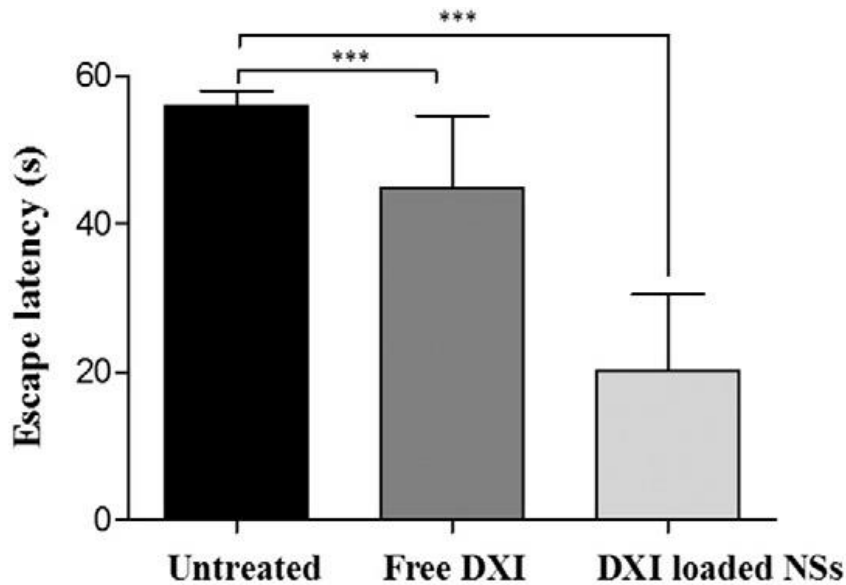
# MODELO DE RATÓN PARA LA EA



PLGA-PEG NPs

FÁrmaco libre

No tratados



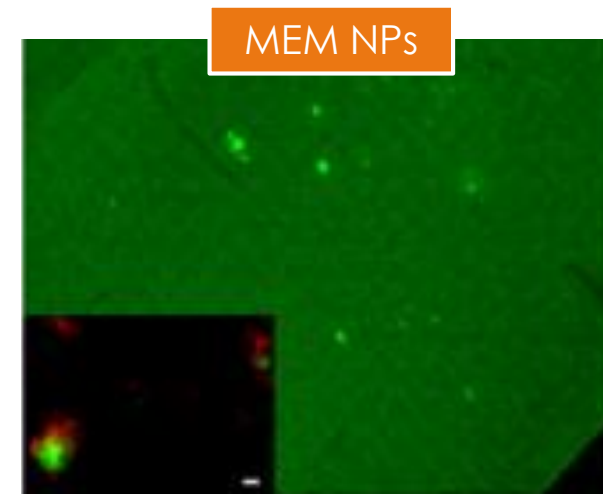
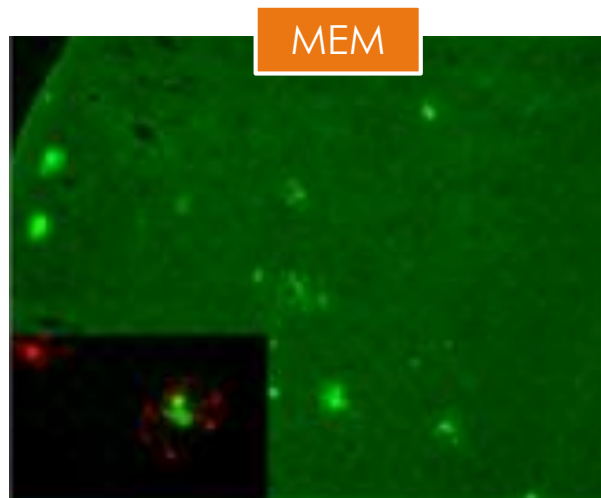
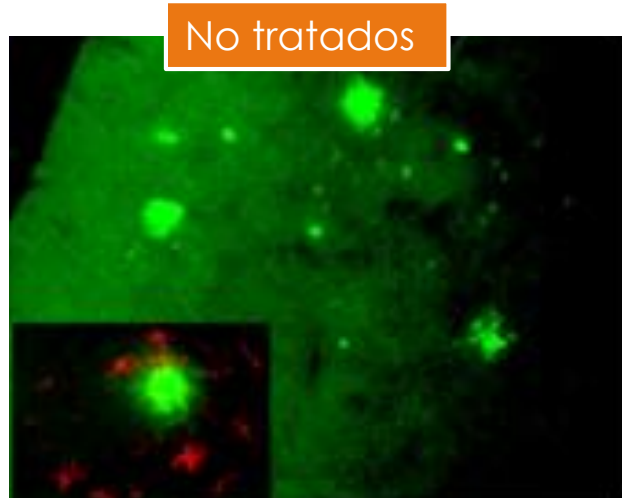
Introducción

Materiales y métodos

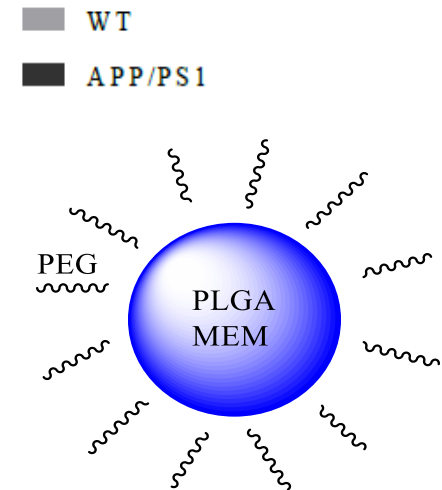
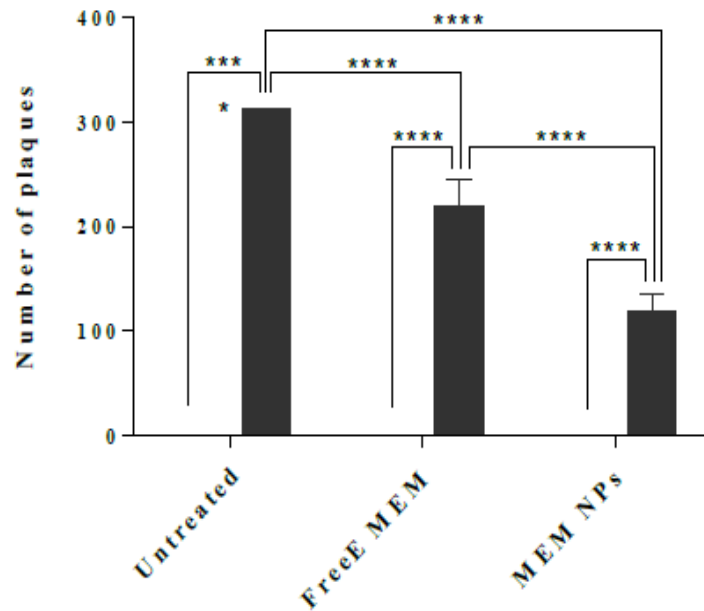
Resultados

Conclusiones

# IMMUNOHISTOQUÍMICA

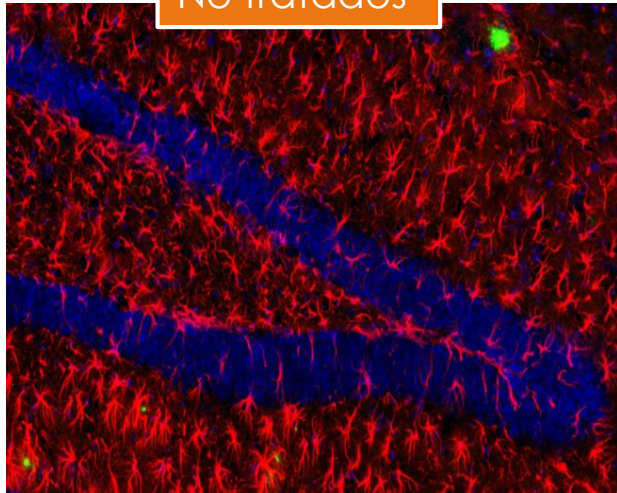


APP/PS1

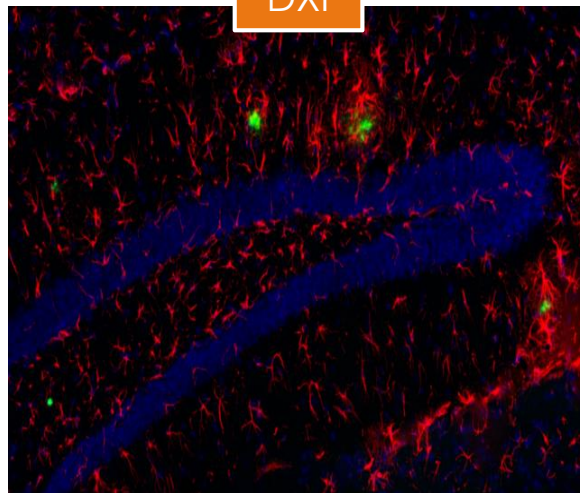


# IMMUNOHISTOQUÍMICA

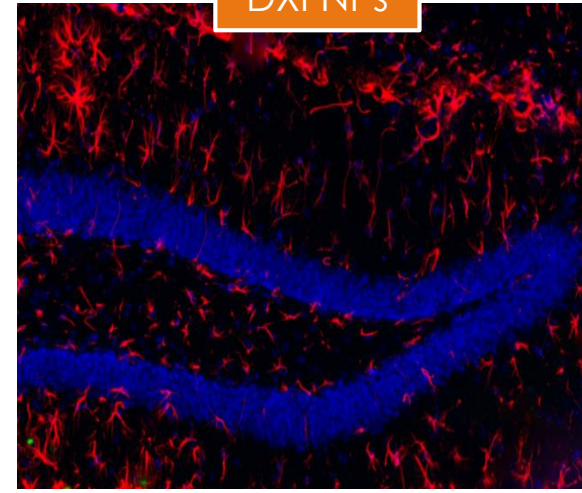
No tratados



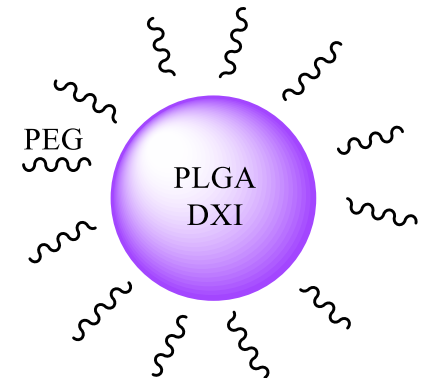
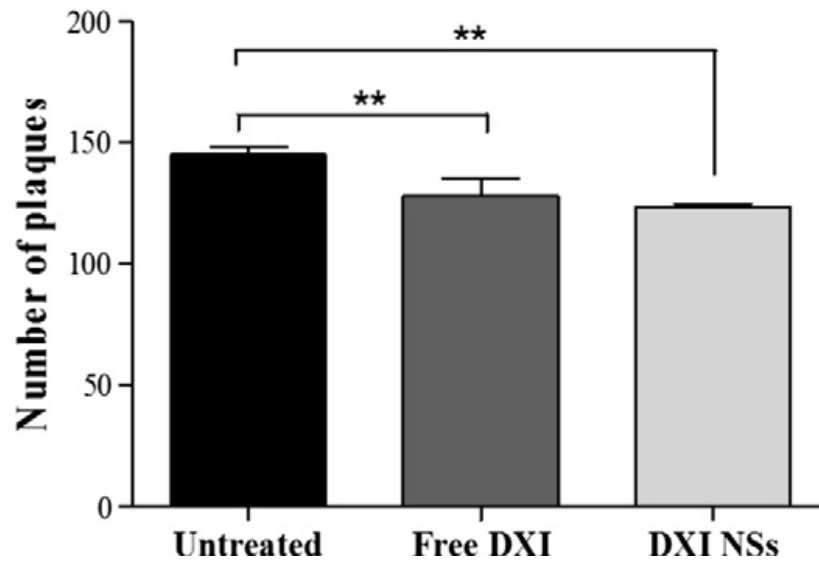
DXI



DXI NPs

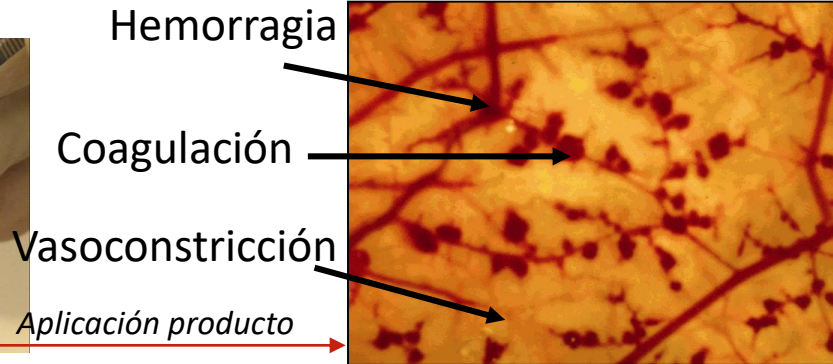


APP/PS1



# TOLERANCIA OCULAR

## HET-CAM test



## Draize test

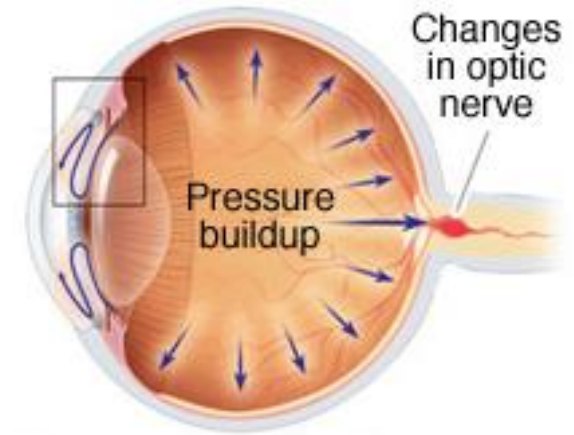


Product	Assay	OII	Classification
MEM	HET-CAM	$1.85 \pm 0.15$	Ligeramente irritante
	Draize	$4.00 \pm 1.00$	
MEM NP	HET-CAM	$0.13 \pm 0.01$	No irritante
	Draize	$0.00 \pm 0.00$	
DXI DXI NP	Draize	$0.00 \pm 0.00$	No irritante
	HET-CAM	$0.00 \pm 0.00$	

# MODELO ANIMAL DE GLAUCOMA

## Modelo OHT

Inyección Suero salino hipertónico  
(venas episclerales)



10 ratas /grupo

Control negativo

OHT unilateral

Suero fisiológico

NPs MEM



Introducción

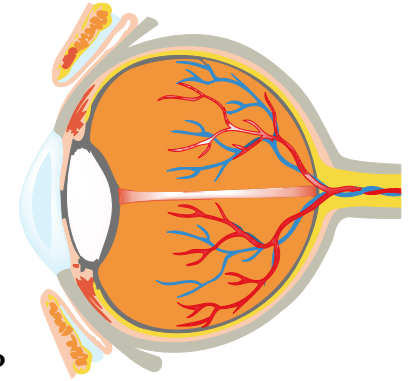
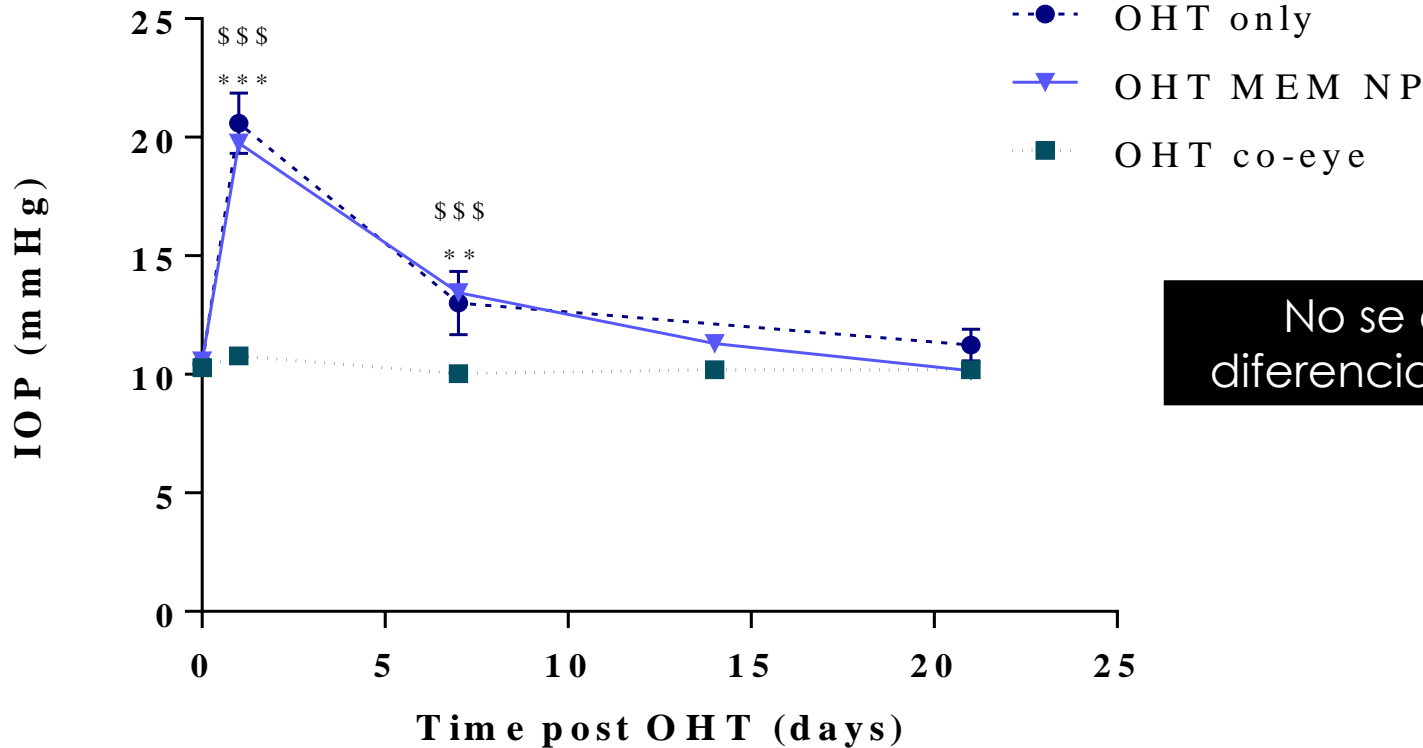
Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones

# EFICACIA TERAPÉUTICA EN EL GLAUCOMA

Presión intraocular (IOP)



No se observaron diferencias significativas

Introducción

Materiales y métodos

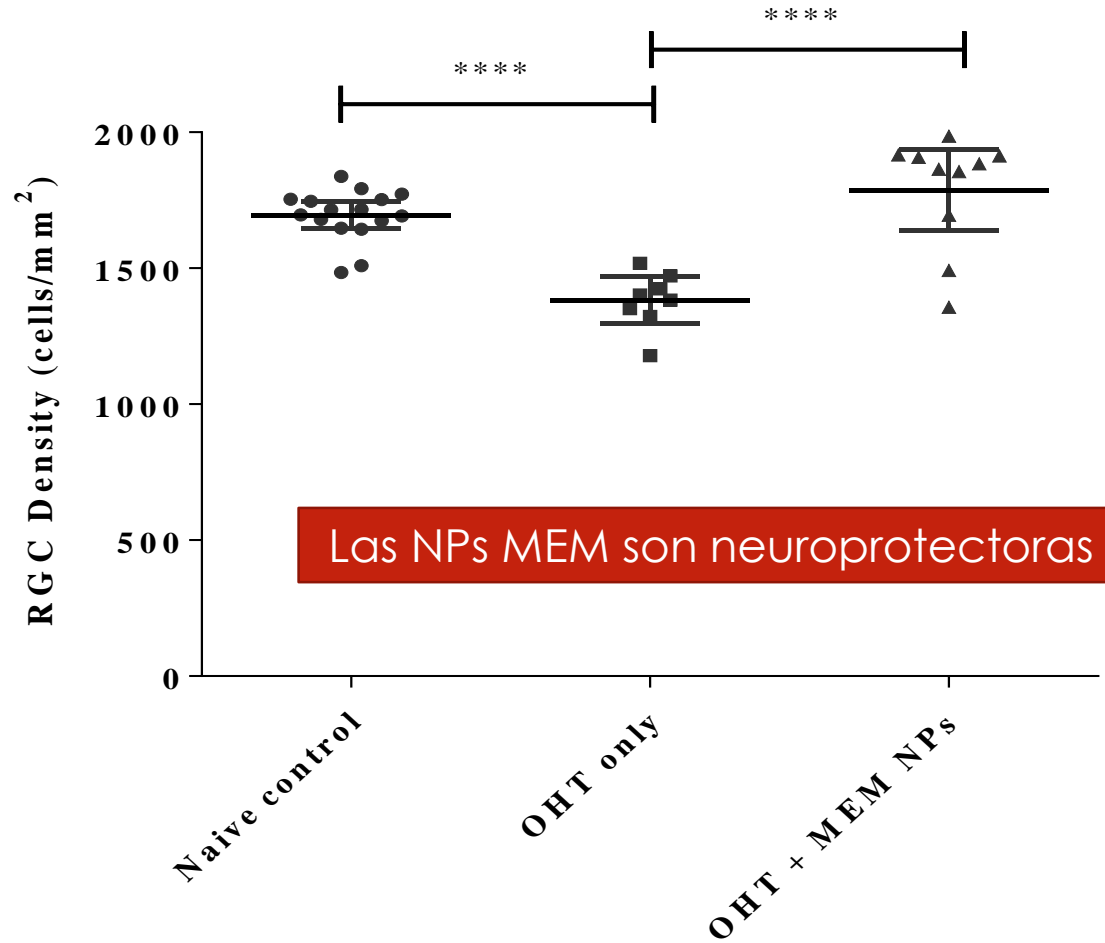
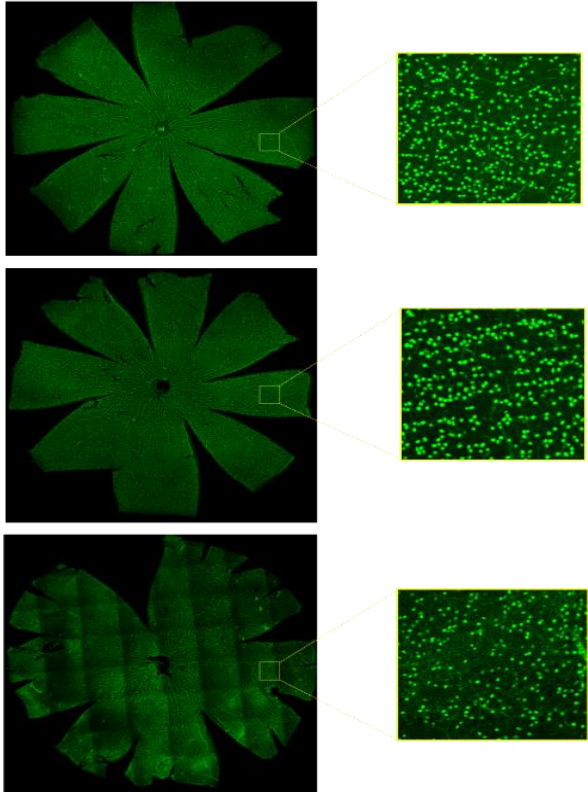
Resultados

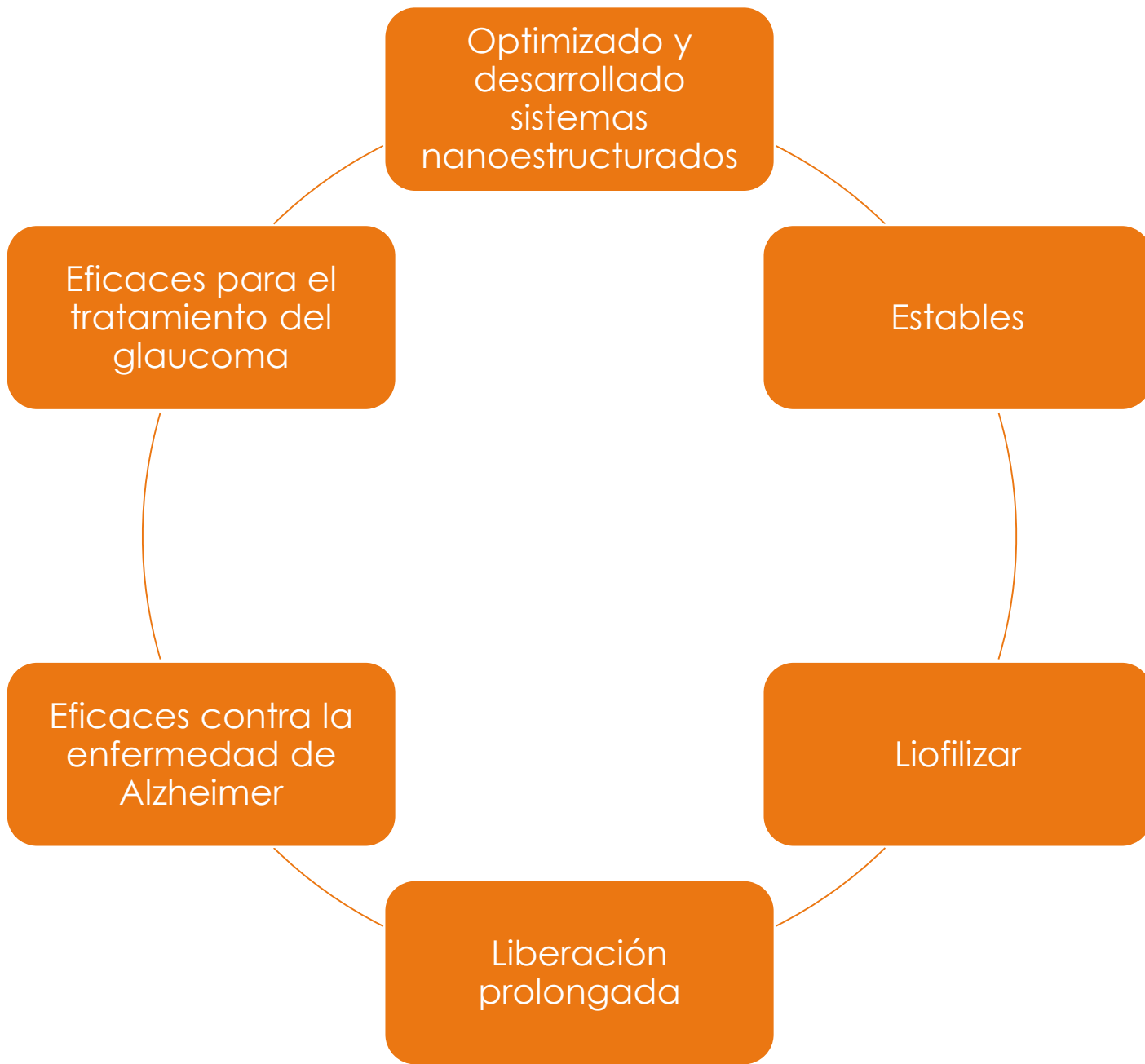
Conclusiones



# EFICACIA TERAPÉUTICA EN EL GLAUCOMA

RGC marcados con Brn3a  
(RGC specific nuclear-localized transcription factor)





*Introducción*

*Materiales y métodos*

*Resultados*

*Conclusiones*



Sistemas nanoestructurados de liberación controlada de fármacos  
Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, UB.



Departamento de Farmacología, Toxicología y Química terapéutica.  
Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, UB.



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. Portugal



Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Portugal



Institute of ophthalmology, University College of London, United Kingdom.

# PUBLICACIONES RELACIONADAS

## FULL PAPER

Nanoparticles

NANO  
**small**  
MICRO  
www.small-journal.com

## Memantine-Loaded PEGylated Biodegradable Nanoparticles for the Treatment of Glaucoma

Elena Sánchez-López, Maria Antonia Egea, Benjamin Michael Davis, Li Guo, Marta Espina, Amelia Maria Silva, Ana Cristina Calpena, Eliana Maria Barbosa Souto, Nivedita Ravindran, Miren Ettcheto, Antonio Camins, Maria Luisa García, and Maria Francesca Cordeiro\*





Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine

Available online 14 December 2016

In Press, Accepted Manuscript — Note to users



## New Potential Strategies for Alzheimer's Disease Prevention: Pegylated Biodegradable Dexibuprofen Nanospheres Administration to APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>

E. Sánchez-López<sup>a, b</sup>, M. Ettcheto<sup>c, d</sup>, M.A. Egea<sup>a, b</sup>, M. Espina<sup>a, b</sup>, A.C. Calpena<sup>a, b</sup>, J. Folch<sup>d, e</sup>, A. Camins<sup>c, d</sup>, M.L. García<sup>a, b</sup>  

 [Show more](#)

<http://dx.doi.org/sire.ub.edu/10.1016/j.nano.2016.12.003>

[Get rights and content](#)

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 145 (2016) 241–250

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/colsurfb](http://www.elsevier.com/locate/colsurfb)



PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen—*in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization



E. Sánchez-López<sup>a, b</sup>, M.A. Egea<sup>a, b</sup>, A. Cano<sup>a</sup>, M. Espina<sup>a, b</sup>, A.C. Calpena<sup>b, c</sup>, M. Ettcheto<sup>d, e</sup>, A. Camins<sup>d, e</sup>, E.B. Souto<sup>f, g</sup>, A.M. Silva<sup>h, i</sup>, M.L. García<sup>a, b, \*</sup>

Sánchez-López *et al.* / *J Nanobiotechnol* (2018) 16:32  
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0356-z>

Journal of Nanobiotechnology

RESEARCH

Open Access



## Memantine loaded PLGA PEGylated nanoparticles for Alzheimer's disease: *in vitro* and *in vivo* characterization

Elena Sánchez-López<sup>1,2,3\*</sup>, Miren Ettcheto<sup>3,4</sup>, Maria Antonia Egea<sup>1,2</sup>, Marta Espina<sup>1,2</sup>, Amanda Cano<sup>1,2,3</sup>, Ana Cristina Calpena<sup>1,2</sup>, Antoni Camins<sup>3,4</sup>, Nuria Carmona<sup>1</sup>, Amélia M. Silva<sup>5,6</sup>, Eliana B. Souto<sup>7,8</sup> and Maria Luisa García<sup>1,2</sup>

# GRACIAS POR SU ATENCIÓN

