

FARMACOTERÀPIA

Nanopartícules polimèriques d'epigalocatequina-3-galat, un enfocament nanotecnològic per tractar la malaltia d'Alzheimer

A. Cano, Departament de Farmàcia, Tecnologia Farmacèutica i Físicoquímica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona / Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN2UB), Barcelona / Centre de Xarxes d'Investigació Biomèdica en Malalties Neurodegeneratives (CIBERNED), Madrid

M. Etcheto, Centre de Xarxes d'Investigació Biomèdica en Malalties Neurodegeneratives (CIBERNED), Madrid / Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona / Unitat de Bioquímica i Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona

M. Espina, Departament de Farmàcia, Tecnologia Farmacèutica i Físicoquímica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona / Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN2UB), Barcelona

E. Sánchez-López, Departament de Farmàcia, Tecnologia Farmacèutica i Físicoquímica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona / Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN2UB), Barcelona / Centre de Xarxes d'Investigació Biomèdica en Malalties Neurodegeneratives (CIBERNED), Madrid

A.L. López, Departament de Farmàcia, Tecnologia Farmacèutica i Físicoquímica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona

A. Camins, Centre de Xarxes d'Investigació Biomèdica en Malalties Neurodegeneratives (CIBERNED), Madrid / Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona

M. L. García, Departament de Farmàcia, Tecnologia Farmacèutica i Físicoquímica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona / Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN2UB), Barcelona

Pòster guanyador de la 31 edició del Congrés Europeu d'Oficina de Farmàcia. INFARMA Barcelona 2019

Aquest treball ha comptat amb el suport del Ministeri de Ciència i Innovació (MAT 2014-59134-R, SAF2017-84283-R i PI2016/01), CB06/05/0024 (CIBERNED) i amb el del Fons Europeus de Desenvolupament Regional. AC, ME, ESL, ALL i MLG que corresponen al grup de recerca 2017SGR-1477. ME i AC que són del grup de recerca 2014SGR-525

Conflicte d'interessos

Aquest treball és part d'un article publicat a la revista científica Journal of Controlled Release, de l'editorial Elsevier. Per a més informació, disponible a: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365919301579?via%3Dihub>

La malaltia d'Alzheimer (MA) es caracteritza per un deteriorament progressiu de la memòria, la cognició i el comportament i en tot el món afecta prop de 24 milions de persones. Un dels fàrmacs més prometedors per tractar aquesta

malaltia és l'epigalocatequina-3-galat (EGCG). Amb una activitat antioxidant important, aquest fàrmac presenta molts processos d'instabilitat. Actualment, l'ús de la nanotecnologia és una de les estratègies més utilitzades però cal millorar-ne l'eficàcia. L'objectiu d'aquest treball va ser desenvolupar un nanosistema polimèric d'EGCG per avaluar-lo en ratolins transgènics APP/PS1, model de la MA. Els resultats suggereixen que aquestes partícules tenen característiques adequades per millorar la biodisponibilitat i l'eficàcia de l'EGCG i que són una forma farmacèutica propícia per al tractament de la MA i altres malalties neurodegeneratives.

La MA és la forma més comuna de demència a tot el món¹ i es caracteritza per un deteriorament cognitiu i, en la forma més avançada, per una incapacitat de desenvolupar les funcions bàsiques que provoca la mort del malalt. Segons

Figura 1. Esquema del procediment de preparació de les EGCG NP pel mètode de la doble emulsió

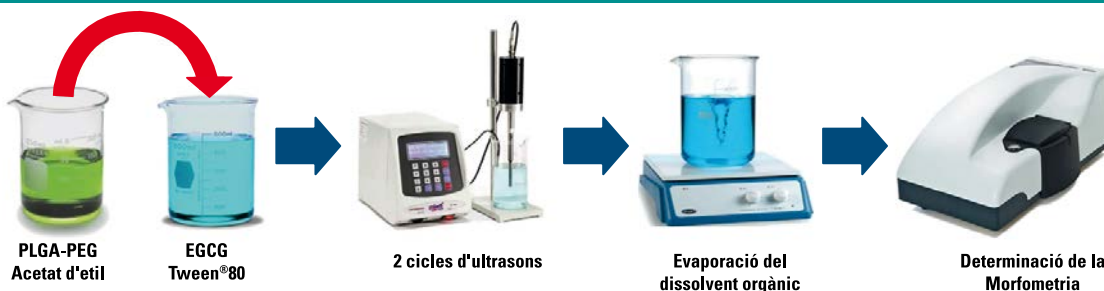


Figura 2. Morfologia de les EGCG NP per microscòpia electrònica de transmissió. Barra d'escala 200 nm

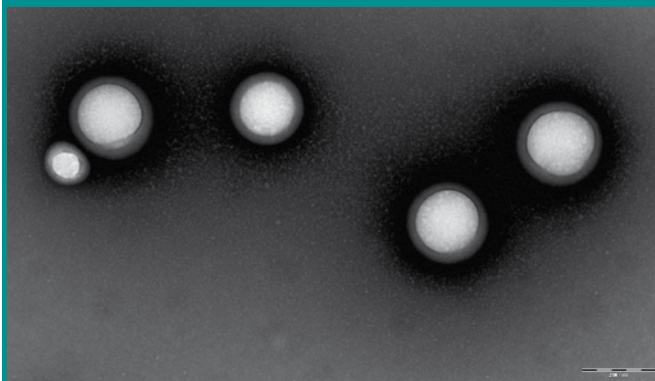
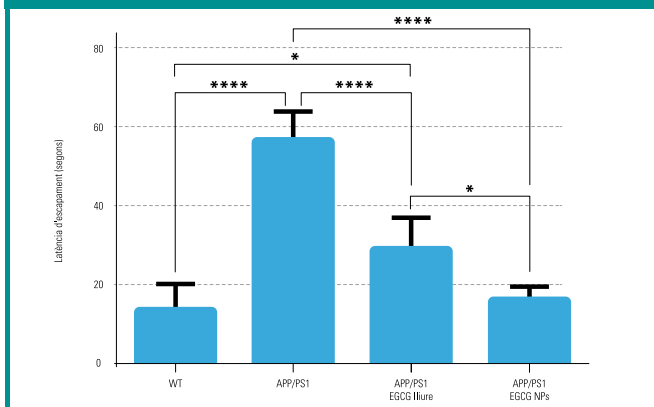


Figura 3. Resultats del test del laberint aquàtic de Morris. *P<0.05; **P<0.001**



el *World Alzheimer Report 2016*, l'any 2050 els casos diagnosticats d'Alzheimer arribaran, a tot el món, a 131 milions i aquest augment anirà acompanyat d'una gran càrrega econòmica que actualment se situa al voltant d'un bilió de dòlars².

A hores d'ara, els únics fàrmacs aprovats per tractar la malaltia són el donepezil, la galantamina, la rivastigmina i la memantina, i cap no en deté la progressió. Això significa que hi ha urgència per trobar enfocaments terapèutics nous per combatre la malaltia^{3,4}. Una de les molècules que més interès demostra és l'EGCG, el polifenol més abundant de la planta del te verd *Camellia sinensis*⁵. Aquest compost ha mostrat ser eficaç en diverses malalties com la síndrome de Down, el càncer o en una varietat de trastorns neurològics⁶. Tanmateix el fàrmac presenta molts inconvenients farmacocinètics com una inestabilitat alta i una mala absorció intestinal, factors que comporten una biodisponibilitat baixa i també influeixen en l'efectivitat⁷.

Per solucionar aquest problema, en les últimes dècades s'ha recorregut a la nanotecnologia com a estratègia terapèu-

tica per orientar i alliberar fàrmacs⁸. Entre els diferents tipus de nanovehicles, les nanopartícules polimèriques (NPs) s'han aprofitat àmpliament per la seva versatilitat farmacèutica. Aquests nanosistemes mostren una gran capacitat de càrrega de fàrmacs d'un ventall de principis actius químicament diferents i la possibilitat d'adherir molècules a la superfície per orientar-se i, per això representen una alternativa òptima per administrar fàrmacs⁹. En aquest treball ens vam plantejar la hipòtesi que la càrrega d'EGCG en NPs resoluria la inestabilitat fisicoquímica i, per tant, milloraria l'eficàcia. L'objectiu ha estat desenvolupar i caracteritzar les NPs d'EGCG (EGCG NPs) i avaluar-ne l'efectivitat en un model de ratolins transgènics APP/PS1 com a nova estratègia per tractar la MA.

Materials i mètodes

Preparació i caracterització d'EGCG NPs

El mètode de preparació seleccionat va ser el de la doble emulsió¹⁰. Breument, l'EGCG es va dissoldre en la fase aquosa interna (W_1), el polímer PLGA-PEG en la fase oliosa (O) i el tensioactiu Tween®80 en la fase aquosa externa (W_2). Aquestes fases van ser sotmeses a dos cicles consecutius d'ultrasons que van portar a la formació de la doble emulsió ($W_1/O/W_2$). Finalment, aquesta formulació va estar en agitació durant 24 hores per evaporar tot el dissolvent orgànic (figura 1). La mida mitjana, l'índex de polidispersió i la càrrega superficial de les NP les vam mesurar amb l'equip Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) i la forma, mitjançant microscòpia electrònica de transmissió amb un equip Jeol 1010.

Avaluació de l'efectivitat

teràutica de les EGCG NPs

Els ratolins van ser tractats amb EGCG NPs i fàrmac lliure en l'aigua de beguda a una dosi de 40 mg/kg i durant tres mesos. Al cap de sis mesos, vam fer el test del laberint aquàtic de Morris per comprovar la memòria espacial d'aquests rosegadors¹¹. Aquest test està basat en el mesurament del temps que triguen els ratolins a trobar una plataforma submergida en una piscina després d'un període d'entrenament per orientar-los espacialment amb una sèrie de senyals situats al voltant d'aquesta piscina.

Anàlisi de les plaques senils

Les plaques senils són un dels principals marcadors de la MA i estan formades per cúmuls extracel·lulars del pèptid amiloide. La detecció d'aquests cúmuls es va fer

mitjançant la tinció amb tioflavina de talls coronals de 20 µm de gruix dels cervells de ratolins transgènics¹².

Resultats

Morfometria i morfologia de les EGCG NPs

Les NPs dissenyades van mostrar un mida mitjana pròxima als 130 nm, un índex de polidispersió inferior a 0,1 (que indica una població homogènia de partícules) i una càrrega superficial al voltant de -20 mV. L'anàlisi per microscòpia electrònica de transmissió va mostrar una forma esfèrica amb una de superficial llisa de les EGCG NPs (figura 2).

Avaluació de l'efectivitat terapèutica de les EGCG NPs

Els resultats obtinguts en la prova del laberint aquàtic de Morris van mostrar que els ratolins transgènics tractats amb EGCG NPs i amb fàrmac lliure havien millorat la memòria espacial, dada que evidenciava l'efectivitat intrínseca del fàrmac. També vam veure que els ratolins tractats amb NPs obtenien una puntuació millor estadísticament signifi-

cativa en comparar-los amb el grup de ratolins tractats amb el fàrmac lliure (figura 3).

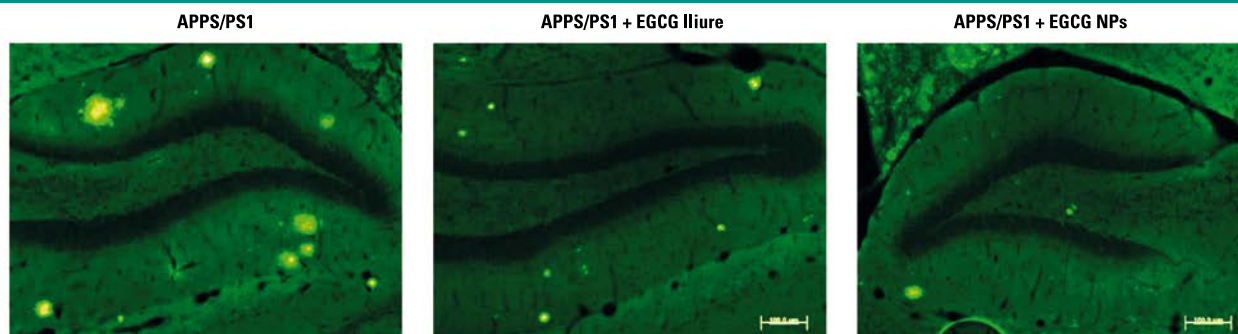
Anàlisi dels nivells de plaques β-amiloide

Després de la tinció de les seccions cerebrals amb tioflavina, els resultats van evidenciar una reducció del nombre i de l'àrea dels dipòsits de β-amiloide dels grups tractats amb relació al grup control. Aquesta reducció va ser molt més pronunciada en els ratolins que havien rebut tractament amb EGCG NP (figura 4).

Discussió i conclusions

En resum, aquest treball demostra la millora de l'eficàcia del EGCG quan es carrega en NPs polimèriques. Les EGCG NPs redueixen la càrrega de les plaques β-amiloide i milloren la memòria espacial. Aquests factors van contribuir a obtenir una reducció significativa del deteriorament cognitiu en ratolins APP/PS1. A partir d'aquestes dades, la proposta és EGCG NPs com a alternativa terapèutica nova, segura i adequada per tractar la MA.

Figura 4. Dipòsits de plaques β-amiloide dins de l'àrea de l'hipocamp (gir dentat). Talls coronals de 20 µm de gruix



BIBLIOGRAFIA

- Cummings JL, Isaacson RS, Schmitt FA, Veltling DM. A practical algorithm for managing Alzheimer's disease: what, when, and why? *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2015;2(3):307–23.
- Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. *World Alzheimer Report 2016: Improving healthcare for people living with dementia*. 2016.
- Cummings J, Lee G, Mortsdorf T, Ritter A, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2017;3(3):367–84.
- Kumar K, Kumar A, Keegan RM, Deshmukh R. Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;98:297–307.
- Schmidt HL, Garcia A, Martins A, Mello-carpes PB, Carpes FP. Green tea supplementation produces better neuroprotective effects than red and black tea in Alzheimer-like rat model. *Food Research International*. 2017;100:442–8.
- Chowdhury A, Sarkar J, Chakraborti T, Pramanik PK, Chakraborti S. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016;78:50–9.
- Krupkova O, Ferguson SJ, Wuertz-Kozak K. Stability of (-)-epigallocatechin gallate and its activity in liquid formulations and delivery systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016;37:1–12.
- Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood – brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*. 2016;235:34–47.
- El-say KM, El-sawy HS. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;528(1–2):675–91.
- Cano A, Etcheto M, Chang JH, Barroso E, Espina M, Kühne BA et al. Dual-drug loaded nanoparticles of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)/Ascorbic acid enhance therapeutic efficacy of EGCG in a APPswe/PS1dE9 Alzheimer's disease mice model. *Journal of Controlled Release*. 2019; 301: 62–75.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982; 297: 681–683.
- Porquet D, Camins A, Ferrer I, Canudas AM, del Valle J. Amyloid and tau pathology of familial Alzheimer's disease APP/PS1 mouse model in a senescence phenotype background. *Am. Aging Assoc*. 2015; 37: 1–17.