

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
INFORMÁTICA

INGENIERÍA DE LA SALUD
MENCIÓN EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**Encapsulación de neuropéptidos mediante la técnica de
co-flujo**

Neuropeptide encapsulation by using co-flux technology

Realizado por

Marta Fernández Castillo

Tutorizado por

Belén Gago Calderón

Co-tutorizado por

Carmelo Millón Peñuela

Departamento

**Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana,
Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva**

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

MÁLAGA, JUNIO 2017

Fecha de defensa:

El Secretario del Tribunal

Agradecimientos

A mi familia por acompañarme en este viaje, como en tantos otros. Por estar ahí y animarme siempre.

A Yflow Sistemas y Desarrollos S.L. y al Departamento de Fisiología Humana por brindarme esta oportunidad.

A mis tutores Carmelo y Belén por su disposición y ayuda constante, haciéndome este camino mucho más fácil de recorrer.

Al equipo de Yflow Sistemas y Desarrollos S.L.: Miguel, Antonio, Antonia e Inma; por su ayuda y sus innumerables consejos, no necesariamente todos ellos profesionales.

A mis compañeros y amigos que de alguna u otra manera se han visto envueltos en esto. Por hacerme ver ese rayo de luz en los días más oscuros.

Y en especial a Adrián por tantísimos momentos compartidos, sufridos y disfrutados; y sin cuyo apoyo me habría sido mucho más duro llegar hasta aquí.

Resumen y palabras clave

Resumen

Muchas enfermedades del sistema nervioso central (SNC) pueden ser tratadas dirigiendo fármacos a esta zona del cuerpo. Sin embargo, el camino hacia el encéfalo se ve obstaculizado por una serie de factores, constituyendo la barrera hematoencefálica (BHE) el de mayor importancia y el más difícil de superar. La BHE presenta una estructura que en esencia conforma un gran muro ante el paso de numerosas sustancias. Se trata por tanto de una barrera de una permeabilidad altamente selectiva.

Se han desarrollado diversas líneas para penetrar la BHE, entre las cuales destaca la nanotecnología y más concretamente la creación de partículas de muy pequeño tamaño (ya que constituye uno de los principales requisitos a cumplir a la hora de superar la BHE). El objetivo de estas partículas es alojar el fármaco en su interior para así poder transportarlo y liberarlo en su destino correspondiente. Existen varias técnicas para realizar lo que se conoce como encapsulación, aunque en este caso se le prestará especial atención a la técnica del co-flujo. Se realizará una búsqueda bibliográfica previamente sobre el tema y se desarrollarán en laboratorio una serie de experimentos con la finalidad de crear cápsulas capaces de contener estos fármacos en su interior.

Abstract

Many central nervous system (CNS) diseases can be treated by delivering drugs to this part of the human body. However, the path to the brain is strongly hindered by diverse factors, conforming the blood-brain barrier (BBB) the most important and difficult one to evade. The BBB presents a structure that constitutes a huge wall against a great number of substances. It therefore can be considered as a high-selective permeability barrier.

Various ways of penetrating the BBB have been developed, among which nanotechnology and most precisely the creation of small-size particles (one of the main requirements in order to pass the BBB) should be highlighted. The aim of these particles resides in containing drug and delivering it to the corresponding target. There are many techniques so as to encapsulate, although in this case the principal one will be the co-flux. After a bibliographic research about this topic, some experiments will be developed in the

laboratory in order to create capsules capable of holding drugs inside.

Palabras Clave

Barrera hematoencefálica, neuropéptido Y, co-flujo, encapsulación, líquido cefalorraquídeo, SomosWatershed, etilenglicol, aceite, sistema nervioso central, nanomedicina, experimento, citotoxicidad, fármaco.

Keywords

Blood-brain barrier, neuropeptide Y, co-flux, encapsulation, cerebrospinal fluid, Somos-Watershed, ethylene glycol, oil, central nervous system, nanomedicine, experiment, cytotoxicity, drug.

Índice general

1. Estado del arte	13
1.1. Metodología	13
1.2. Revisión bibliográfica	14
1.2.1. Barrera hematoencefálica (BHE)	14
1.2.2. Neuropeptido Y. Influencia en desórdenes neuropsiquiátricos	17
1.2.3. Estrategias para la administración de fármacos en el SNC	18
1.2.4. La nanomedicina como medio para la administración de fármacos al SNC	22
1.2.5. Estudio de la técnica: co-flujo	27
1.2.6. Materiales para la creación de cápsulas mediante co-flujo	28
2. Trabajo en laboratorio	31
2.1. Metodología	31
2.1.1. Preparación de soluciones	32
2.1.2. Programas informáticos	32
2.1.3. Material de laboratorio	33
2.1.4. Procedimiento de trabajo	33
2.2. Resultados	36
2.2.1. Experimento 1	36
2.2.2. Experimento 2	38
2.2.3. Experimento 3	40
2.2.4. Detección de partículas	41
2.3. Discusión	41
3. Conclusiones y líneas futuras de trabajo	45
3.1. Conclusiones	45
3.2. Líneas futuras de trabajo	45
Anexo I. Código de Matlab para la detección de cápsulas	51

Introducción

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura que se encuentra entre la sangre y el sistema nervioso central (SNC). Su principal función es la protección del encéfalo de intrusiones indeseables, como pueden ser moléculas que superan un determinado tamaño y sustancias tóxicas. La BHE está formada principalmente por las células de los capilares (células endoteliales), que poseen una elaborada red de uniones estrechas. Dichas uniones restringen el acceso al SNC de numerosas sustancias, incluidos algunos fármacos. Con lo cual a día de hoy la presencia de la BHE constituye un desafío para la farmacoterapia dirigida al SNC. Muchos antibióticos y otros agentes no penetrarán a través de ella y deberán acoplarse a una molécula transportadora capaz de atravesarla, o bien deberán ser insertados intratecalmente, es decir, a través de espacios que rodean la médula espinal (Tam et al., 2016).

En los últimos años ha cobrado importancia la administración de fármacos a través de la BHE basada en la nanotecnología. Especialmente las técnicas basadas en la encapsulación han demostrado una alta eficiencia a la hora de atravesar la BHE. Se trata básicamente de la introducción del fármaco en una cápsula que lo proveerá de protección y estabilidad. Además, dicha cápsula se encargará de que el fármaco llegue a su destino y allí sea liberado correctamente. Sin embargo, para entender el nivel de optimización, estandarización y toxicidad de la encapsulación aún queda camino que recorrer (Bauer and Traweger, 2016). Esta técnica es capaz de aportar una fuente de moléculas terapéuticas sintetizadas de novo dirigidas hacia un objetivo, de modo que puedan ser distribuidas a lo largo de porciones significativas del cerebro (Wolburg and Lippoldt, 2002).

La alteración en la expresión de neurotransmisores, catecolaminas y neuropéptidos está relacionada con desórdenes y enfermedades neuropsiquiátricas. Un ejemplo es el neuropéptido Y (NPY). Se trata de un péptido que actúa como neurotransmisor y neuromodulador. Para comprender su importancia cabe destacar que entre otras funciones el NPY aporta numerosos beneficios frente a las enfermedades neurodegenerativas, entre los cuales se encuentra su comportamiento como agente neuroprotector o inhibidor de la neuroinflamación (Reichmann and Holzer, 2016). Sin embargo el NPY no atraviesa la BHE de forma eficaz.

Por todo lo anteriormente mencionado es interesante la idea de estudiar las posibilidades

que podría aportar una cápsula, creada haciendo uso de la tecnología de la que se dispone para favorecer la correcta administración del NPY y su llegada al SNC, y así poder ser usado como agente terapéutico.

Este trabajo se llevará a cabo en colaboración con la empresa Yflow Sistemas y Desarrollos S.L. bajo el marco del proyecto de innovación educativa financiado por la Universidad de Málaga: “Blogs como herramienta para la tutorización de trabajos de fin de grado: directores docentes y profesionales (PIE 15-17)”, que trata de potenciar el uso de las TIC para facilitar la comunicación entre alumnos, tutores académicos y tutores externos de una empresa.

Objetivos

Este trabajo de fin de grado (TFG) se centra en el diseño, creación y observación de cápsulas que puedan mejorar la distribución de fármacos a través de la BHE.

El TFG tiene dos partes bien diferenciadas. Para poder llegar al objetivo principal, se divide el proceso en:

1. Búsqueda bibliográfica sobre el estado del arte
 - Barrera hematoencefálica
 - Neuropeptido Y
 - Estrategias
 - Nanomedicina
 - Técnica empleada
 - Materiales
2. Trabajo en laboratorio para la generación de cápsulas
 - Pruebas con diferentes materiales
 - Encapsulación

Estructura de la memoria

En primer lugar se detalla el estado del arte en relación a la administración de fármacos en el SNC.

Posteriormente se realiza un trabajo en laboratorio teniendo en cuenta la información obtenida tras la búsqueda bibliográfica correspondiente. En concreto se han desarrollado 3 experimentos.

Por último se procede a mostrar y analizar el resultado de los diferentes experimentos realizados.

Capítulo 1

Estado del arte

1.1. Metodología

Se ha llevado a cabo primeramente una revisión bibliográfica de la literatura para conocer y estudiar todos aquellos elementos implicados en la administración de fármacos (NPY) mediante cápsulas al SNC. Las fuentes de información empleadas han sido las siguientes bases de datos:

1. La base de datos bibliográfica biomédica **PubMed**, donde se puede encontrar gran cantidad de literatura de temática científica. Haciendo uso del operador lógico AND y una serie de palabras clave se realizaron las siguientes búsquedas:
 - BBB
 - BBB AND permeability
 - NPY AND neurodegenerative diseases
 - NPY AND function
 - BBB AND tight junctions
 - BBB AND nanomedicine
 - BBB AND astrocytes
 - Microencapsulation
 - SomosWatershed AND toxicity
 - ethylene glycol AND toxicity
2. **Google Scholar**, que se ha empleado para búsquedas relacionadas con la tecnología empleada. Las búsquedas en este caso han sido:
 - co-flux
 - co-flux AND encapsulation
 - co-flux AND SomosWatershed

Los criterios de inclusión empleados para obtener la bibliografía han sido:

- Ensayos clínicos, revisiones y artículos científicos
- Textos que incluyan las palabras clave introducidas, bien en su título o en su resumen

En cuanto a los criterios de exclusión, se descartaron aquellos trabajos a cuyo texto en su totalidad no se pudo acceder, al igual que los que no se ajustaban a la temática del trabajo.

1.2. Revisión bibliográfica

1.2.1. Barrera hematoencefálica (BHE)

La función de la BHE es mantener el microambiente específico requerido por el cerebro para trabajar así como protegerlo de cualquier tipo de componentes neurotóxicos que puedan aparecer en la corriente sanguínea. Por ello está estructurada como una capa de células endoteliales rodeando la microvasculatura cerebral, formando una barrera basada en uniones firmes.

Estas uniones firmes se dan entre cada célula endotelial de los capilares de la BHE y evitan el paso de partículas entre las células. Como resultado, únicamente pequeños componentes lipófilos como el O_2 o las hormonas esteroideas se difunden con éxito a través de la BHE, gracias a su gradiente de concentración.

Desgraciadamente esto implica grandes limitaciones terapéuticas. Muy pocos fármacos cruzan la BHE ya que o no son lipófilos o son mayores de 500Da, de modo que no se pueden difundir a través de la membrana. Esto significa que cualquier enfermedad cerebral en la que no sea posible realizar terapia por medio de moléculas que cumplan dichas características no puede ser tratada empleando los sistemas de administración de fármacos habituales. Incluso entre fármacos administrados en forma de pequeñas moléculas, más del 98 % no son transportados a través de la BHE (Tam et al., 2016).

Algunas áreas del encéfalo carecen de una BHE funcional debido a que sus capilares tienen un endotelio permeable (como la mayor parte del resto del cuerpo). Por ejemplo, en la hipófisis la función de las neuronas adyacentes depende de alguna forma del contacto directo con la sangre. Otra región que carece de BHE es el centro del vómito en el bulbo raquídeo. Estas neuronas monitorizan la sangre en busca de sustancias extrañas posiblemente tóxicas. Si encuentran algo nocivo, inician un reflejo. Los vómitos expulsan el contenido del sistema digestivo y eliminan las toxinas ingeridas.

Dentro de la estructura de la BHE, cabe destacar cuatro componentes: las uniones estrechas, la membrana basal, la microglía, los astrocitos y los pericitos.

En la figura 1.1 se puede observar la estructura de la BHE así como algunos de los componentes previamente mencionados, sobre los cuales se hablará a continuación.

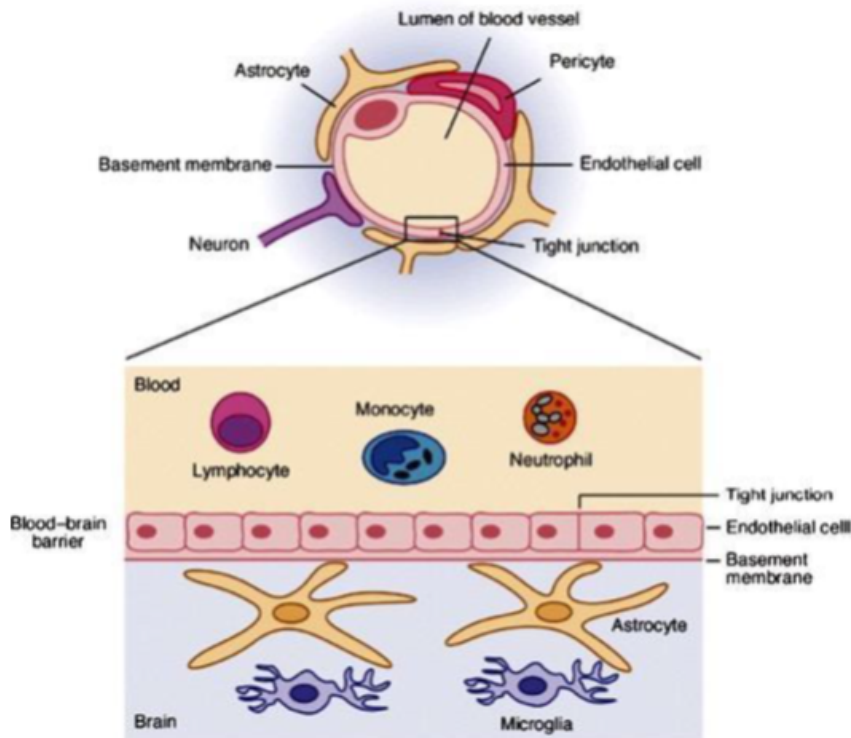


Figura 1.1: Estructura de la BHE con sus diversos componentes (Tam et al., 2016)

■ Uniones estrechas

La regulación del microambiente neuroparenquimal, esto es, el tejido esencial del sistema nervioso es vital para el correcto funcionamiento del mismo. El flujo de iones y solutos transportados vía sanguínea está restringido gracias a barreras de tejido especializado como la BHE. El endotelio (tipo de tejido epitelial característico de los vasos sanguíneos) cerebral que constituye la BHE representa la mayor interfaz entre la sangre y el cerebro. Las bases de la BHE son, junto a una elaborada maquinaria de transporte, las uniones estrechas, que no solamente crean una restricción de la difusión paracelular, sino que también habilitan el transporte vectorial a través de la monocapa endotelial.

Generalmente, las uniones estrechas no simplemente representan una estructura de adhesión célula-célula, sino que además integran varios caminos señalizados a través de grandes complejos de multiproteínas, impactando consecuentemente en procesos como la proliferación celular, reorganización citoesquelética, y control transcripcional (Bauer and Traweger, 2016).

La unión estrecha en las células epiteliales y endoteliales está constituida por dos tipos diferentes de proteínas integradoras de membrana (occludina y miembros de la familia proteica de la claudina). Además, moléculas citoplasmáticas que sirven como andamiaje de las uniones estrechas regulan diversos procesos fisiológicos como la proliferación, polaridad celular y difusión regulada (Förster, 2008).

Sin embargo, las uniones estrechas de las células endoteliales de la BHE difieren de uniones estrechas epiteliales. No únicamente por tener propiedades morfológicas y moleculares diferentes, sino también por el hecho de que las uniones estrechas endoteliales son más sensibles al microambiente que factores epiteliales (Wolburg and Lippoldt, 2002).

■ **Membrana basal**

La membrana basal se trata de una capa conformada por matriz extracelular y que se sitúa en la base de algunos tejidos. Esta membrana no actúa solamente como una barrera significativa ante la difusión de moléculas pequeñas, sino que presenta una función de anclaje que juega un importante papel en la integridad de la microvasculatura cerebral y consecuentemente en las propiedades de la BHE (Yurchenco and Patton, 2009), contribuyendo a la organización, estabilidad y diferenciación tanto celular como tisular (Kreutzberg, 1996).

■ **Microglía**

La microglía es una distintiva clase de células gliales que conforman las células cerebrales inmunocompetentes y por lo tanto se encuentran críticamente relacionadas con diversas lesiones y enfermedades.

La microglía se caracteriza por presentar dos formas principales de acuerdo a las condiciones cerebrales. En situación fisiológica, la microglía en reposo presenta un cuerpo pequeño y unas prolongaciones largas y finas, conocida como morfología ramificada. Dicha morfología se corresponde a la forma vigilante que permite reconocer rápidamente perturbaciones homeostáticas en el SNC. En el caso de patología, la microglía se activa y puede asumir una morfología fagocítica, caracterizada por una forma ameboide con cortas prolongaciones.

■ **Astrocitos**

Los astrocitos son células gliales (es decir, células del tejido nervioso) cuyo extremo final envuelve a la membrana basal en la superficie externa del endotelio de la BHE, cubriendo el 99 % del endotelio (Persidsky et al., 2006) y contribuyendo a las propiedades y el desarrollo de la BHE y al singular fenotipo endotelial. Al interactuar con

las células endoteliales, los astrocitos mejoran las uniones estrechas, reduciendo el espacio entre las células y por consiguiente demostrando que tienen un importante papel en la permeabilidad selectiva y en la integridad de la BHE. Las interacciones entre los astrocitos y las células endoteliales son también esenciales para regular el agua del cerebro y el metabolismo electrolítico en situaciones fisiológicas y patológicas (Zlokovic, 2008). Además de todo lo anteriormente comentado, los astrocitos son imprescindibles para un correcto funcionamiento neuronal. De hecho, los astrocitos pueden enviar señales a las células musculares de los vasos sanguíneos con el objetivo de regular el flujo sanguíneo cerebral como respuesta inmediata ante variaciones en la actividad neuronal local.

Cada vez se dan más evidencias de que las alteraciones de las interacciones de la neuroglía están asociadas con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Por ello, hoy en día los astrocitos no se ven como simples células gliales de soporte, sino como importantes actuadores en la homeostasis de la neurovasculatura.

■ Pericitos

Los pericitos son células no endoteliales adjuntas entre la membrana basal de los microcapilares. Estas células son conocidas actualmente como células perivasculares. Tienen actividades multifuncionales, particularmente en el mantenimiento de las propiedades de la BHE y en la homeostasis del SNC. El hecho de que los pericitos se sitúen en esa zona concreta favorece el desarrollo de las uniones estrechas y contribuye por consiguiente a la baja permeabilidad de la BHE (Dohgu et al., 2005).

Recientemente, una variedad de estudios asignan varias funciones a los pericitos. Éstas incluyen funciones contráctiles, inmunes y fagocíticas, así como funciones migratorias y angiogénicas (formación de vasos sanguíneos). Además, los pericitos tienen un papel regulatorio en la homeostasis cerebral y son una fuente de células troncales adultas pluripotentes (Dore-Duffy, 2008).

1.2.2. Neuropeptido Y. Influencia en desórdenes neuropsiquiátricos

El neuropeptido Y (NPY) es un péptido de 36 aminoácidos que pertenece a una familia de péptidos biológicamente activos, junto con el péptido YY y el polipéptido pancreático (PP). El NPY ha resultado ser uno de los neuropeptidos más abundantes en el cerebro. Es más, presenta un papel fundamental en muchas funciones fisiológicas tales como la toma de alimentos, homeostasis, ritmo cardíaco y cognición. Asimismo, el NPY parece ser un componente clave en la respuesta al estrés, teniendo propiedades ansiolíticas (Sajdyk et al., 2004).

A día de hoy se han descrito una serie de receptores diferentes del NPY (Y1-Y8) en

vertebrados, de los cuales 5 (Y1, Y2, Y4, Y5, Y6) están presentes en mamíferos. Mientras los receptores Y1, Y2, Y4 e Y5 son funcionales en mamíferos, el receptor Y6 no es funcional en diversos de ellos (incluyendo humanos), desapareciendo en ratas. El NPY muestra una especial afinidad por los receptores Y1, Y2 e Y5, mientras que el PP muestra preferencia por el receptor Y4. Al igual que el propio NPY los receptores Y1 e Y2 se distribuyen ampliamente a lo largo del cerebro. En contraste, la expresión del receptor Y4 está restringida solamente a unas pocas regiones cerebrales. Finalmente, el receptor Y5 aparece en diversas áreas cerebrales límbicas pero es menos abundante que el receptor Y1 o el Y2. Curiosamente, la expresión del receptor Y5 coincide en la mayoría de los casos con la expresión del receptor Y1, pero no viceversa (Parker and Herzog, 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, las acciones biológicas del NPY en mamíferos son mediadas por sus receptores. En cuanto al papel del NPY en la ansiedad, la estimulación del receptor Y1 es ansiolítica mientras que la del receptor Y2 es ansiogénica. Demostraciones recientes atribuyen al NPY un papel en la resistencia al estrés, es decir, la capacidad de lidiar con éste, existiendo una correlación negativa entre el comportamiento inducido por estrés y la expresión del NPY en modelos animales de desorden de estrés post-traumático. Además el NPY exógeno previene las consecuencias negativas del estrés, el cual es también un factor que tanto contribuye como resulta de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson o la enfermedad de Huntington, en la que el NPY parece desempeñar un importante papel neuroprotector. Esto último evidencia la implicación del NPY en patologías relacionadas con el estrés así como neurodegenerativas (Reichmann and Holzer, 2016).

1.2.3. Estrategias para la administración de fármacos en el SNC

Las estrategias actuales en desarrollo pueden ser divididas en dos ramas: invasiva y no invasiva. Los métodos invasivos implican o, bien quebrantar la BHE para permitir el paso de las moléculas o inyectar los fármacos directamente al tejido del SNC, mientras que los métodos no invasivos se basan en mecanismos celulares endógenos para facilitar el transporte de fármacos al SNC (Tam et al., 2016).

- **Estrategias invasivas**

1. **Disrupción de la BHE**

Con el objetivo de aumentar la permeabilidad de la BHE, se han desarrollado técnicas para irrumpir temporalmente las células endoteliales, permitiendo el paso de fármacos macromoleculares al SNC (Stockwell et al., 2014).

- Una técnica sería usar **choques osmóticos** para contraer las células endoteliales e interrumpir las uniones estrechas. En un estudio clínico, la

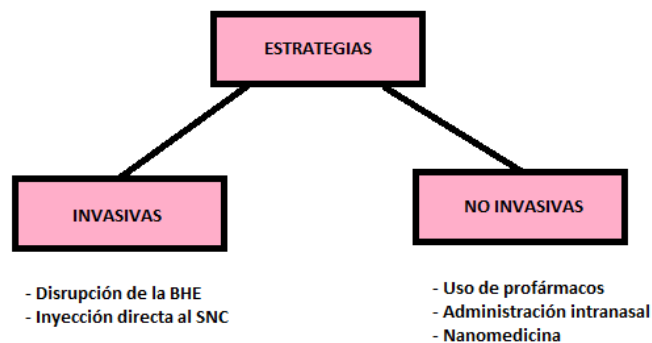


Figura 1.2: Estrategias para la administración fármacos al SNC

disrupción seguida por la subsecuente administración de agentes quimioterapéuticos permite que suficientes moléculas farmacéuticas crucen la BHE con el objetivo de producir un efecto terapéutico en pacientes con cáncer cerebral (Fortin et al., 2007).

- Más recientemente, la administración de fármacos mediada por **ultrasonidos** (USMD por sus siglas en inglés) que emplea microburbujas de entre 1 y 10 micras de diámetro para irrumpir mecánicamente las uniones estrechas, está mostrando potencial para el tratamiento mediante quimioterapia especialmente cuando se requiere una alta especificidad, pues las ondas de ultrasonidos pueden ser dirigidas dentro de un área de unos pocos milímetros (Hynynen, 2008).
- Otra técnica sería el caso de las **moléculas vasoactivas** tales como la bradiquinina, que pueden incrementar selectivamente la permeabilidad de los capilares en tumores cerebrales pero no la de aquellos que están sanos, pudiéndose aprovechar este hecho para administrar selectivamente el fármaco correspondiente en la zona correcta.

2. Inyecciones intracraneales

Estas inyecciones, ya sean intracerebralmente o intracerebroventricularmente, ofrecen la administración más directa del fármaco a la zona objetivo, reduciendo consecuentemente posibles efectos negativos en el tejido periférico sano. Esta técnica depende del transporte por difusión del fármaco al parénquima cerebral. Sin embargo, debido a que el transporte por difusión en el cerebro decrece exponencialmente con la distancia, esta tecnología tiene una limitación significativa y requiere un mapeo muy preciso del lugar de inyección para conseguir una máxima precisión a la hora de dirigir el fármaco (Gabathuler,

2010).

- **Principales problemas de la administración invasiva**

Desafortunadamente, al igual que con cualquier técnica invasiva, estos métodos están acompañados por un elevado coste neuroquirúrgico y riesgo incrementado de infección ya que elementos indeseables pueden entrar en el cerebro cuando la BHE está expuesta. El cerebro podría igualmente sufrir de diversas lesiones traumáticas debido a la naturaleza mecánica de estas aproximaciones incluyendo trombosis de las venas o herniación cerebral. En consecuencia, mientras que las estrategias altamente invasivas pueden ser empleadas en tumores bien definidos, son indeseables en el caso de enfermedades menos localizadas como el Alzheimer, la esclerosis múltiple o enfermedades neuropsiquiátricas (Barbu et al., 2009).

- **Estrategias no invasivas**

Se han investigado diversos caminos alternativos para atravesar la BHE de forma no invasiva. Algunos de estos caminos corresponden con determinadas rutas de transporte celulares. Aparte de las rutas transcelulares lipofílicas (seguida en el caso de moléculas pequeñas y lipofílicas), otras rutas de transporte son: la ruta acuosa paracelular para agentes hidrosolubles; transporte mediado por portador, que lleva glucosa y aminoácidos esenciales al cerebro; transporte mediado por receptores, que se basa en receptores para moléculas endógenas de gran tamaño tales como la insulina; y transporte mediado por absorción, que permite el paso de sustancias policationicas como la albúmina cationizada para adherirse a la membrana plasmática cargada negativamente (Barbu et al., 2009).

Mecanismos de transporte tales como el mediado por portador o el mediado por receptor han sido explotados con un mayor grado de éxito que la difusión pasiva en el tráfico de fármacos a través de la BHE.

Además de estas rutas, existe una serie de técnicas a la hora de proceder a la administración de forma no invasiva de un medicamento, las cuales pasarán a describirse a continuación.

1. **Administración intranasal**

Se trata de una técnica que sobrepasa la BHE a través de los nervios olfatorios.

Un ejemplo de esto sería la administración de NPY. Las inyecciones de este péptido al cerebro de un roedor son ansiolíticas. Se ha demostrado que la administración intranasal de NPY en ratas antes o inmediatamente después de una exposición a estrés prolongado [en un modelo de desorden de estrés

postraumático (PTSD)], evitaba el desarrollo de muchos síntomas bioquímicos y de comportamiento, manifestando de este modo su potencial (Serova et al., 2014).

La facilidad y la seguridad de la administración la convierte en una opción atractiva para la administración de fármacos al SNC; sin embargo el número de moléculas que tienen la capacidad de difundirse a través del epitelio olfatorio es muy bajo, constituyendo por tanto una importante limitación (Stockwell et al., 2014).

2. Modificación química de fármacos

Los fármacos que son capaces de atravesar la BHE mediante difusión pasiva tienen características comunes: pequeño tamaño molecular (de menos de 500 Da), alta lipofilicidad y falta de ionización a pH fisiológico. Consecuentemente, existe un importante esfuerzo que se realiza en torno a convertir fármacos hidrosolubles en liposolubles reduciendo el número de sus grupos polares o uniéndolo a un resto lipídico, esto es modificándolos químicamente de modo que su actividad varía.

Sin embargo este reto de la química es significativo, pues hasta ahora ningún fármaco modificado de esta forma ha sido capaz de atravesar la BHE en cantidades farmacológicamente significativas (Pardridge, 2003).

3. Nanomedicina

En los años recientes, la nanomedicina ha recibido especial atención con respecto al tratamiento de enfermedades del SNC tales como gliomas, Alzheimer y Parkinson, debido a su potencial para la administración de fármacos dirigida con alta especificidad. La administración de agentes terapéuticos actualmente consiste en la incorporación de éstos a la corriente sanguínea. Ello deriva en la distribución del fármaco por todo el organismo. En consecuencia este sistema conforma una forma ineficiente de administración, ya que realmente poca cantidad del fármaco consigue sobrepasar la BHE. Además deriva en efectos colaterales dañinos en tejidos de áreas no afectadas (Chapman et al., 2013).

Algunos nanoportadores como los liposomas y las nanopartículas tienen la capacidad de atravesar la BHE y administrar grandes cantidades de agentes terapéuticos a zonas concretas, haciendo uso de restos tumorales específicos en su superficie. Esto permite reducir la toxicidad en los tejidos cercanos. Se trata de una ciencia que avanza rápidamente y cuya evolución ha permitido evitar la aglutinación con proteínas plasmáticas en la sangre, así como desarrollar partículas funcionales capaces de optimizar la carga y la cinética de liberación de los fármacos (Winer et al., 2011).

Con estas ventajas (tamaño controlado, funcionalización superficial y propiedades químicas en diversos entornos), los nanoportadores constituyen un método no invasivo que mejora no sólo la administración de fármacos y la precisión de la zona donde deben actuar, sino que además intensifican la solubilidad y protección del fármaco a través de la BHE.

Los requerimientos de diseño de las nanopartículas empleadas en el SNC son:

- Biodegradabilidad
- No toxicidad
- Diámetro de partícula de menos de 100 nm
- Prolongado tiempo de circulación en sangre sin que se produzca agregación
- Capacidades de carga y liberación
- Especificidad ante restos de la BHE

Existen numerosos tipos de nanoportadores teniendo en cuenta su naturaleza (liposómico, polimérico, magnético y nanopartículas sólido-lipídicas) y el mecanismo de direccionamiento (es decir, cómo son dirigidas estas partículas) hacia la BHE a través de cuatro diferentes rutas.

En cuanto al presente TFG respecta se profundizará en este apartado, pues se trabajará en el laboratorio con el objetivo de desarrollar nanopartículas.

1.2.4. La nanomedicina como medio para la administración de fármacos al SNC

▪ Tipos de nanoportadores

1. Liposomas

Los liposomas son vesículas de pequeño tamaño caracterizadas por la presencia de una o más bicapas fosfolipídicas. De este modo, en el interior de la estructura se aloja un espacio acuoso.

Es posible manipular una serie de sus parámetros, tales como la carga superficial, composición lipídica, contenido en colesterol o tamaño, de modo que se controle así la administración de fármacos y la absorción tisular; por lo tanto, además de su baja toxicidad y de su capacidad para administrar componentes tanto hidrofílicos como lipofílicos, los liposomas son probablemente el tipo de nanoportadores más profundamente estudiado y clínicamente reconocido (Wong et al., 2012).

Es posible dirigir los liposomas hacia la BHE mediante diferentes mecanismos.

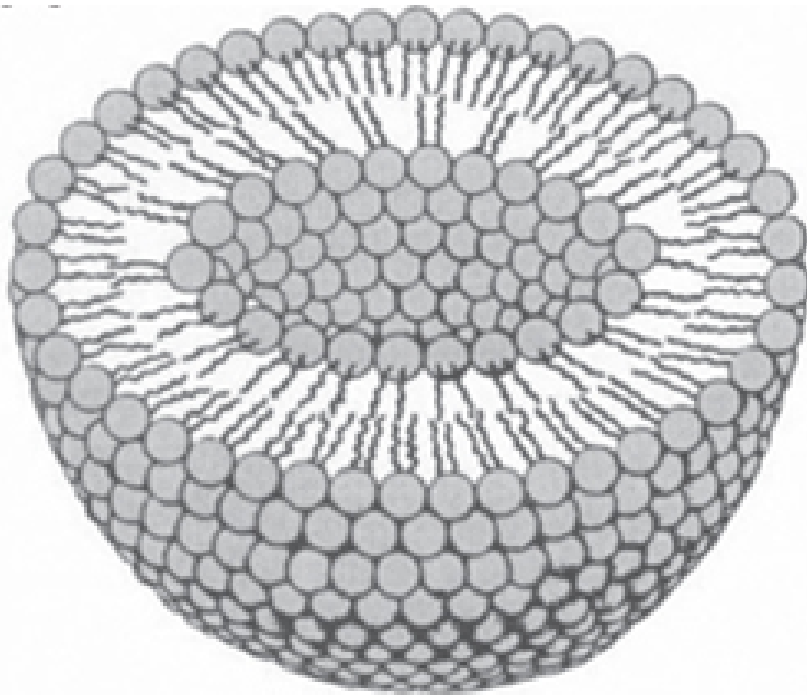


Figura 1.3: Estructura de un liposoma (Matthäus et al., 2008)

- PEGilación

Consiste en disponer polietilenglicol (PEG) a lo largo de la superficie del liposoma. Ello aumenta el tiempo de circulación sanguínea debido a que evita el sistema reticuloendotelial (RES), constituido por células cuya principal función es la fagocitosis, esto es, destrucción de partículas extrañas. En otras palabras, un liposoma sin PEG presenta una alta probabilidad de intercambiar materiales con membranas celulares o de ser digerido por fagocitos. Consecuentemente el recubrimiento con PEG proporciona al liposoma un margen de tiempo extra para penetrar la BHE (Lipinski et al., 1997).

- Cationización

El endotelio cerebral está cargado negativamente. Se cree entonces que al dotar a los liposomas de carga positiva y teniendo en cuenta su reducido tamaño (20 nm) es posible transportarlos a través de la barrera mediante fagocitosis o difusión pasiva. Sin embargo, este mecanismo no ha llegado a ser totalmente comprendido (Zhao et al., 2012).

- Mediante inmunoliposomas

Consiste en inducir una endocitosis mediada por receptor, añadiendo para ello un anticuerpo o ligando de modo que sea reconocido por un receptor

de la BHE (Huwyler et al., 1996).

En resumen, los liposomas muestran potencial; sin embargo sus limitaciones incluyen una rápida eliminación sistémica, posible inestabilidad después de un almacenamiento prolongado, y escaso control sobre la liberación del fármaco (Wong et al., 2012).

2. Nanopartículas poliméricas

Los polímeros hoy en día más empleados en la administración de fármacos al SNC son el ácido poli-láctico (PLA), el ácido poli-glicólico (PGA) y el poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), debido a su historia segura en medicina (Béduneau et al., 2007).

Estos polímeros biodegradables se descomponen en ácido láctico y glicólico, que alimentan el ciclo de Krebs. Al igual que en el caso de las nanopartículas lipídicas, el PEG está comúnmente injertado en la superficie de la partícula para evitar la acción de despeje del RES y proporcionar unas propiedades circulatorias más duraderas (Jin et al., 2014). Estudios han demostrado que partículas con una alta densidad de recubrimiento con PEG y un pequeño tamaño tienen una mayor eficiencia en la administración.

El quitosano se presenta como un interesante material alternativo, pues se trata de un polisacárido que se da de forma natural, biodegradable y biocompatible. Puede emplearse como polímero de elección así como mezclarse con otros polímeros (Parveen and Sahoo, 2011) para restringir efectos fagocíticos y mejorar la longevidad.

3. Nanopartículas sólido-lipídicas (SLNs)

Las SLNs consisten en un núcleo sólido hidrofóbico de lípidos. Presentan la capacidad de liberar el fármaco de manera controlada durante un periodo que puede abarcar varias semanas, además de poder localizar el destino correspondiente gracias al uso de ligandos (moléculas reconocidas por otras de modo que se provoque una respuesta biológica). Son moléculas útiles para fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, capaces de alojar una cantidad elevada de fármaco, estables y biodegradables en condiciones fisiológicas. Consecuentemente se trata de una alternativa atractiva a los liposomas o a los nanoportadores poliméricos (HUANG et al., 2008).

4. Nanopartículas magnéticas (MPs)

Se ha dirigido mucha atención en los últimos años hacia las nanopartículas magnéticas (MPs) al manifestar un elevado potencial en terapia e imagen, especialmente las llamadas SPIONS, siglas correspondientes a nanopartículas

superparamagnéticas de óxido de hierro (Wang et al., 2012). Se trata de partículas que con varias modificaciones en su superficie pueden ser dirigidas a zonas específicas. Además también son procesadas por la ruta metabólica del hierro de una célula (Tam et al., 2016).

■ Tipos de mecanismos de transporte

Una parte fundamental del sistema nanoportador es la conjugación del mecanismo apropiado de transporte hacia la BHE. La mayoría de las partículas nanoportadoras de fármacos requieren el uso de una de las rutas nativas hacia la BHE para macromoléculas. Los agentes hidrosolubles se disuelven a través de las uniones estrechas a través de una ruta paracelular acuosa mientras los agentes liposolubles se disuelven transcelularmente a través de la membrana plasmática lipídica. Sin embargo para casi todas las demás sustancias se requieren otras rutas. Esas rutas son: el sistema de transporte mediado por portador (CMT), el mediado por receptor (RMT), y el mediado por absorbente (AMT). A través de estas rutas, la BHE permite el transporte de componentes metabólicos como la insulina o la lipoproteína de baja densidad (LDL) a través de la membrana. Una vez modificadas, las nanopartículas pueden aprovecharse de estos sistemas para administrar de manera no invasiva fármacos neuroactivos al SNC (Gabathuler, 2010). Puesto que el PEG es altamente recomendado para el injerto en la superficie con el objetivo de aportar estabilización estérica y disminuir la tasa de eliminación en sangre, los ligandos pueden adherirse al nanoportador a través de la cadena de PEG para un transporte más preciso (Chen and Liu, 2012).

1. Transporte mediado por portador (CMT)

Se basa en el cambio conformacional de las proteínas de las membranas de transporte para mover solutos tales como la glucosa y aminoácidos a lo largo de su gradiente de concentración.

Nutrientes como la glucosa, la lactosa y aminoácidos neutrales necesarios para la supervivencia son llevados al cerebro empleando proteínas transportadoras de membrana que se expresan en la superficie de la BHE. Una de dichas proteínas altamente expresadas es el transportador de la glucosa (GLUT1) que promueve la toma de D-glucosa y análogos de la glucosa desde la sangre al cerebro (Béduneau et al., 2007). En este sentido existen dos posibilidades: los mismos fármacos pueden ser químicamente alterados para parecerse a estos nutrientes como en el caso de la L-DOPA, o los sustratos de los transportadores podrían ser conjugados con nanoportadores cargados con fármaco (Mora et al., 2002). Las aplicaciones de estos métodos son sin embargo limitadas, pues el fármaco/ligando debe ser de muy pequeño tamaño y ha de presentar una estructura similar al nutriente. Es más, puesto que la proteína portadora se

localiza en la membrana, el fármaco debe ser aún movido mediante difusión a través de las membranas celulares de la BHE para penetrar en el cerebro (Gabathuler, 2010).

2. Transporte mediado por receptor (RMT)

Se produce por una interacción ligando-receptor la cual induce la endocitosis de la molécula hacia el cerebro.

A diferencia del CMT, el mecanismo del RMT existe para la entrada de moléculas de mayor tamaño tales como la insulina o la transferina. El contacto de cualquiera de las formas de los ligandos naturales o artificiales (anticuerpos) con la membrana del receptor induce la endocitosis de la macromolécula. Se empaqueta en una vesícula de transporte, la cual puede entonces cruzar el revestimiento del endotelio de la BHE para ser liberada en el cerebro. El receptor de la transferina (TfR) ha sido el sistema RMT más ampliamente caracterizado para la administración de fármacos, debido a que ha demostrado ser una ruta celular eficiente para la recepción de fármacos anticancerígenos, y además se ve sobreexpresado en muchos tumores (Chang et al., 2009).

En consecuencia, muchas de las investigaciones se han centrado bien en adherir transferina o anticuerpos contra la transferina a uno de los nanoportadores previamente mencionados para facilitar el transporte de moléculas de fármaco de gran tamaño (Chen and Liu, 2012).

La mayor desventaja de conjugar proteínas como la transferina o sus derivados a la superficie de partículas es la consecuente competición con la transferina endógena para la unión del receptor. Ello deriva bien en la inhibición del consumo natural de transferina del cerebro o bien desacreditando la efectividad de la partícula (Georgieva et al., 2014).

La alternativa a la transferina endógena es el anticuerpo que se une a un epítipo (esto es, a una zona concreta de una molécula reconocida por el sistema inmune) localizado separado del receptor de la transferina. La nanopartícula experimentaría entonces menos competencia de la transferina endógena para la unión de los sitios del receptor y además no interferiría con el mecanismo natural de consumo cerebral de transferina. Estos epítopos específicos de receptor son comúnmente conocidos como “Caballos de Troya” moleculares ya que permiten introducir grandes moléculas a través de la BHE.

A día de hoy, el RMT ha mostrado resultados prometedores para la correcta administración de componentes anticancerígenos a tumores cerebrales.

3. Transporte mediado por absorción (AMT)

La última de las rutas de transporte exploradas para la administración de fármacos a través de la BHE es el sistema AMT, el cual depende de la interacción electrostática entre un resto positivamente cargado y el endotelio negativamente cargado de la membrana celular.

Originalmente, su aplicación fue empleada únicamente para catonizar nanopartículas de albúmina y se demostró que dichas partículas eran capaces de administrar fármacos y péptidos al parénquima cerebral (Lu et al., 2007).

Más adelante, se desarrolló el concepto de péptidos penetradores celulares (CPPs). Se trata de péptidos cargados positivamente de una longitud menor de 30 aminoácidos capaces de penetrar membranas celulares a través del AMT (Chen and Liu, 2012).

Sin embargo, puesto que el AMT se basa únicamente en la atracción electrostática, la falta de la especificidad tisular presenta un obstáculo tanto para la limitación de la concentración del fármaco en órganos no dirigidos como para alcanzar el nivel deseado de fármaco en el cerebro (Allhenn et al., 2012).

1.2.5. Estudio de la técnica: co-flujo

Para la formación de las cápsulas se hará uso de la técnica de co-flujo. Dicha técnica consiste en la inyección de un fluido a velocidad V a través de un agujero de diámetro D en un fluido anfitrión (fase continua), inmiscible con el inyectado, que se mueve a una velocidad V_0 y que forma un ángulo α con V . Generalmente, el agujero es la punta de una aguja micrométrica inmersa en el fluido anfitrión. Esta configuración exhibe una amplia diversidad de modos de generación de gotas dependiendo de los valores de α , los números de Weber, capilar y el de Reynolds del flujo anfitrión. Los modos se clasifican en dos grandes grupos denominados modos de goteo o modos de chorro.

La formación de chorros o gotas (o burbujas) a la salida del tubo y la transición entre ambos tipos de modos ha sido objeto de numerosas investigaciones. Las gotas producidas en el modo goteo son en general más monodispersas (mismo diámetro) que aquellas producidas en modo chorro. Sin embargo, para reducir el riesgo de obstrucción de la aguja cuando se producen las gotas micrométricas, el co-flujo es generalmente empleado en chorro. El chorro generado desde la boquilla se desliza y adelgaza debido al arrastre ejercido por el flujo exterior. Se estableció en 2009 la ley de escalado del diámetro de la gota para este régimen en donde el chorro o bien se adelgaza o se ensancha. Para un flujo externo dado, el diámetro de gota mínimo que puede obtenerse estaría dado por la tasa de flujo mínima del líquido interno compatible con el modo chorro. Esta condición, junto con el requisito de que el número de capilaridad del fluido exterior sea del orden de la unidad

para que el chorro se genere, conduce a tamaños de gotas que pueden ser sub-micrónicas para líquidos de baja viscosidad como el agua.

1.2.6. Materiales para la creación de cápsulas mediante co-flujo

- Posibles materiales

La variedad de materiales que pueden emplearse se va ampliando gradualmente a medida que surgen nuevos biomateriales y se perfilan nuevas aplicaciones. De un modo general, los materiales capaces de constituirse en micropartículas se clasifican en tres categorías: grasas, proteínas y polímeros.

Los biomateriales están destinados a la fabricación de componentes, piezas o aparatos y sistemas médicos para su aplicación en seres vivos. Deben ser biocompatibles: pueden ser bioinertes si tienen una influencia nula o muy pequeña en los tejidos vivos que los rodean, mientras que pueden ser bioactivos si pueden enlazarse a los tejidos óseos vivos. Los biomateriales pueden ser de origen artificial, (polímeros, metales, cerámicas) o biológico (colágeno, quitina, etc.). Atendiendo a la naturaleza del material artificial, se puede establecer una clasificación en materiales cerámicos, metálicos, poliméricos o materiales compuestos.

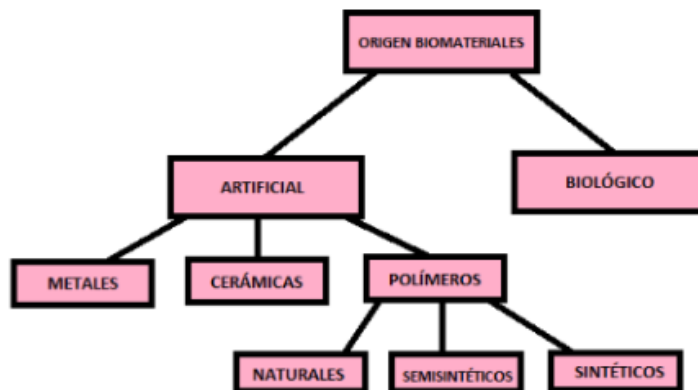


Figura 1.4: Tipos de biomateriales

Los biomateriales poliméricos son ampliamente utilizados en clínicas, en implantes quirúrgicos, como en membranas protectoras, en sistemas de dosificación de fármacos o en cementos óseos acrílicos. Debido a su gran versatilidad, ésta es la familia de materiales más utilizada en microencapsulación. Dentro de esta gran familia podemos distinguir entre polímeros naturales, semisintéticos y sintéticos. Dentro de estos últimos los más destacables son los derivados acrílicos y los poliésteres. Los poliésteres son polímeros de carácter biodegradable, lo que permite su administración por una vía parenteral (realizando una punción sobre la piel, de modo que la medicación pase al torrente sanguíneo directamente o a través de los diferentes tejidos donde

se administra). Dentro de ellos los más conocidos son la poliepsilon-caprolactona, el poli(ácido láctico), y los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico. Estos polímeros son hidrofóbicos, mientras que sus productos de degradación, el ácido láctico y el ácido glicólico son hidrofílicos y fácilmente eliminables del organismo por filtración glomerular (esto es, la depuración de la sangre en los riñones). La velocidad de liberación del principio activo encapsulado puede controlarse en virtud de la selección del polímero que presente una adecuada velocidad de degradación.

Se consideran además otros materiales. De acuerdo con experimentos previos realizados por Yflow Sistemas y Desarrollos S.L., se obtuvieron resultados positivos (esto es, partículas) mediante la técnica de co-flujo haciendo uso de materiales que no han aparecido durante la fase de búsqueda bibliográfica. De ahí que ambos sean tenidos en cuenta. Estos materiales son el etilenglicol y el SomosWatershed.

- **Etilenglicol**

Es un compuesto químico que a pesar de ser citotóxico funciona de manera exitosa para la técnica del co-flujo, constituyendo entonces un importante candidato a considerar, en especial a la hora de tener el primer contacto con ella.

- **SomosWatershed**

Se trata de una resina polimérica transparente sensible a la luz ultravioleta. Ello provoca que cuando esta sustancia se somete a tal tipo de radiación deje de ser líquida y pase a estado sólido. A este fenómeno se le conoce como curación y es propio para encerrar otra sustancia en el seno de este material.

En los experimentos de la empresa tanto el etilenglicol como el SomosWatershed fueron empleados en la técnica del co-flujo como fluidos interiores, siendo el fluido exterior un aceite de silicona de viscosidad alta en ambos casos, como se explica en el apartado 1.2.5.

- **Selección de materiales**

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, la opción más viable en cuanto a este TFG respecta es hacer uso de los materiales con los que la empresa previamente ha trabajado. No únicamente porque dicha opción ha mostrado buenos resultados, sino que además son recursos a los que se puede acceder fácilmente.

- **Citotoxicidad**

Desgraciadamente, los materiales empleados presentan un grado de citotoxicidad que deriva en efectos negativos para el organismo. De hecho, resinas fotocurables

como el SomosWatershed inducen una inhibición del crecimiento celular de más de un 90 % (Zhu et al., 2015a). Además, la mayoría de resinas de este tipo no son diseñadas para aplicaciones en medios acuosos, mostrando un aumento considerable de tamaño en contacto con el agua y pudiendo ser tóxicas (Zhu et al., 2015b).

Capítulo 2

Trabajo en laboratorio

El trabajo en el laboratorio se inicia con una primera toma de contacto. Se comienza a emplear el equipo y se realizan una serie de pruebas básicas para aprender a manejar el instrumental de laboratorio, así como conocer la técnica empleada para la formación de partículas. Tras esta primera etapa se procederá a trabajar con el objetivo de generar partículas apoyadas en la información obtenida en la búsqueda bibliográfica.

Inicialmente se hará uso de etilenglicol y aceite como se menciona en el capítulo de materiales. Aunque no sea la definitiva para el fin deseado, es conveniente trabajar con estos fluidos debido a los buenos resultados que han manifestado mostrar ambos anteriormente. Por lo tanto constituyen un par de líquidos ideales para conocer y comprender la técnica del co-flujo (esto se detalla en el experimento 1 descrito a continuación).

Tras esto se procederá a formar partículas empleando SomosWatershed y aceite, ya que el carácter fotosensible del primero permite solidificar las partículas resultantes. El hecho de crear una partícula sólida permite alojar una sustancia en su interior, lo cual será clave para el trabajo que se realizará más adelante empleando el LCRA (experimento 2).

En ambos casos se le aplicará una tinción al líquido interior haciendo uso de un colorante, para que sea más sencillo diferenciar los fluidos debido al carácter transparente de éstos.

Finalmente y una vez han sido creadas las partículas sólidas de SomosWatershed de manera exitosa, se pasa a introducir a través del inyector (que ya deja de ser simple y pasa a ser coaxial) el LCRA en el que se alojaría el péptido (experimento 3).

2.1. Metodología

Se establece para los siguientes experimentos que $Q_e = \text{caudal exterior}$, $Q_m = \text{caudal medio}$ (únicamente en el caso del experimento 3) y $Q_i = \text{caudal interior}$.

2.1.1. Preparación de soluciones

■ LCRa

El microambiente en el que se aloja el NPY es el líquido cefalorraquídeo (LCR). Este líquido baña el encéfalo y la médula espinal. A la hora de administrar el NPY, es importante que éste se encuentre en un ambiente lo más parecido posible al LCR, con lo cual es interesante la idea de crear una solución similar. Existe la posibilidad de producir LCR artificial (LCRa) haciendo uso de una serie de componentes mezclados de acuerdo a unas proporciones concretas. Puesto que en términos de coste esto último resulta más sencillo, se procederá en su momento a emplear LCRa para alojar en un futuro al NPY. Se toma 1 ml de cada una de las disoluciones madre que figuran en la tabla 2.1 y se vierten en un recipiente. Una vez realizada la mezcla, se comprueba que el pH final del LCRa sea de un valor de 7'4 y se almacena a +4°C.

El LCRa consta de los siguientes compuestos químicos en las concentraciones mostradas:

Tabla 2.1: Componentes del LCRa y sus proporciones

Disoluciones madre	Gramos en 50 ml de agua desionizada	Peso molecular (gr/mol)
ClNa2	2'88	81'43
NaCO3H	0'788	84'01
KCl	0'0725	74'56
KH2PO4	0'1099	136'09
CaCl2 • 2H2O	0'0648	147'02
MgCl2 • 6H2O	0'0676	203'3
Na2SO4	0'0284	142'04
Glucosa	0'424	180'16

■ Tinciones

En el caso de los experimentos 1 y 2 se ha realizado una tinción empleando paprika sobre el etilenglicol y el SomosWatershed para discernir ambos del aceite que los rodea.

Además para observar mejor el LCRa se ha teñido con azul de metileno.

2.1.2. Programas informáticos

Para trabajar con las imágenes de las partículas obtenidas se emplearán dos herramientas software: ImageJ y Matlab.

- **ImageJ**

Se trata de un programa que permite, entre otras funciones, realizar medidas sobre imágenes. Consecuentemente constituye una herramienta útil para medir los diámetros de las partículas obtenidas o la sección del chorro, por ejemplo.

- **Matlab**

Se ha empleado un código Matlab que detecta circunferencias con la finalidad de cuantificar la cantidad de partículas que aparecen en una imagen. Dicho código se detalla en el Anexo I.

2.1.3. Material de laboratorio

El instrumental empleado para el trabajo de laboratorio ha sido el siguiente:

- **Bomba de impulsión** (Harvard Apparatus pump 11 élite) con un caudal mínimo en caso de emplear una jeringuilla de $0'5\mu\text{l}$, de $1'28\text{ pL}/\text{min}$ y caudal máximo de $88'28\text{ ml}$ para el uso de una jeringuilla de 60 ml . Su finalidad es impulsar un fluido alojado en una jeringa a través de un capilar a un caudal determinado que se programa previamente.
- **Jeringuillas** modelo BD plastic.
- **Microscopio óptico** modelo Motic BA400.
- **Inyector simple** que consiste en un tipo de jeringa a la que llegan un par de fluidos. Ambos son expulsados por el extremo del inyector, a través de unos capilares dispuestos en el mismo eje. Este inyector lo desarrolla y suministra la empresa de Yflow Sistemas y Desarrollos S.L.
- **Inyector coaxial**. Es igual al inyector simple a excepción de que en este caso son tres los fluidos que llegan al mismo. También lo provee Yflow Sistemas y Desarrollos S.L.
- **Fuente de luz ultravioleta** modelo DELOLUX 04, marca DELO. Dicha fuente de luz ultravioleta junto con sus sondas correspondientes solidificarían las partículas procedentes del inyector en el caso de los experimentos 2 y 3.
- **Disolventes y materiales poliméricos** proceden de Sigma Aldrich.

2.1.4. Procedimiento de trabajo

- **Experimento 1**

La pareja de fluidos escogida para estas pruebas será la conformada por etilenglicol y aceite.

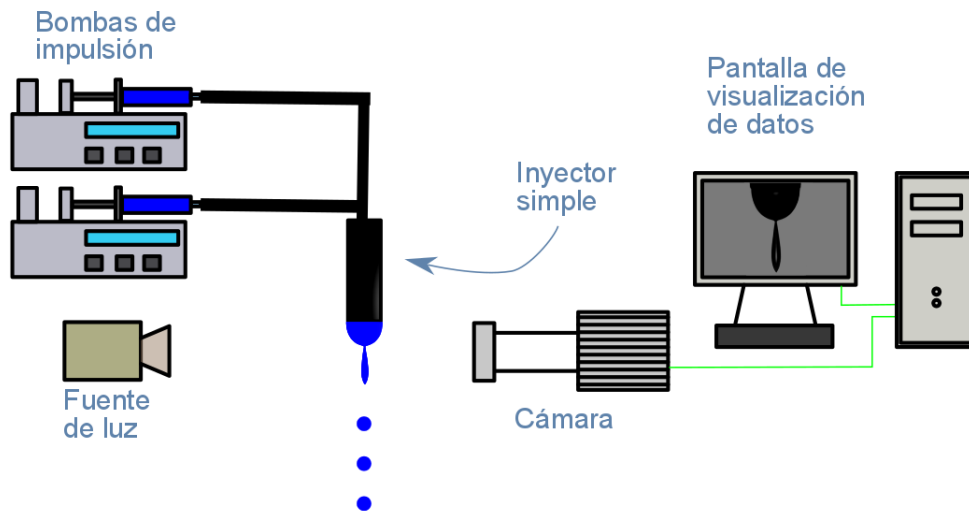


Figura 2.1: Montaje del equipo de laboratorio para el experimento número 1

Lo que se busca realizando estos experimentos es observar cómo afectan los caudales a la formación de partículas. Al introducir en las bombas de impulsión los valores de los caudales se origina un chorro a la salida del inyector. Las partículas se producen cuando dicho chorro rompe. También dependiendo de los caudales el chorro romperá a una mayor o menor altura. Sin embargo en este caso no tiene mucha relevancia, pues el interés principal radica en la creación de partículas independientemente de la altura a la que se produzca esta formación.

En todos los casos del presente experimento se mantiene un caudal exterior de 200 ml/h, siendo el caudal interior el que varía. El rango de caudales empleado en estas pruebas se indica en la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Pruebas correspondientes al experimento 1

Prueba No.	Caudal interior (ml/h)
1	0'1
2	0'5
3	1
4	4
5	7
6	10
7	12
8	15
9	17
10	20

■ Experimento 2

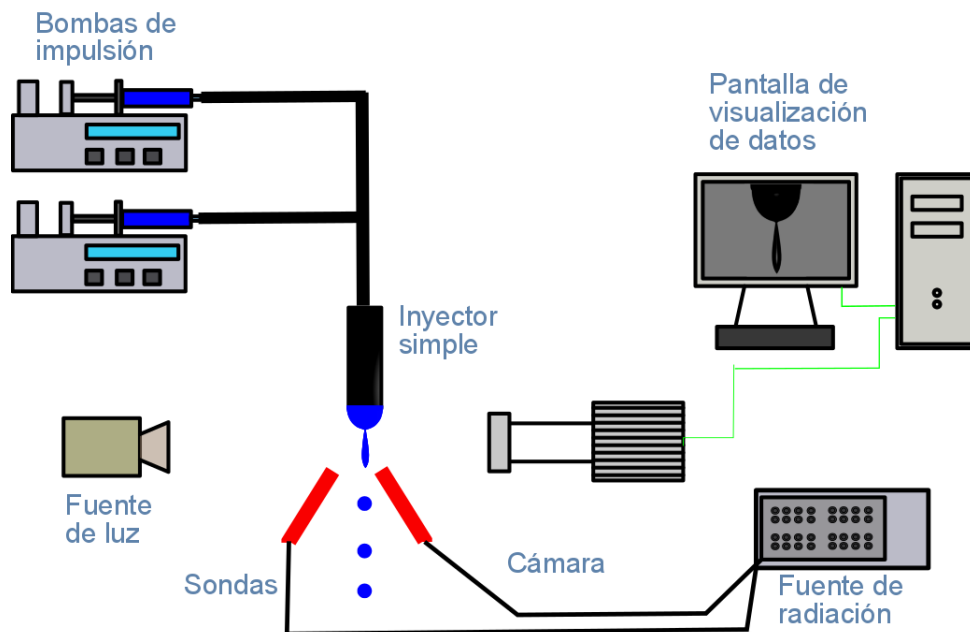


Figura 2.2: Montaje del equipo de laboratorio para el experimento número 2

En este experimento se trabaja con SomosWatershed y aceite con la finalidad de obtener partículas que permanezcan en estado sólido (ya que el comportamiento fotosensible del SomosWatershed posibilita este fenómeno, de acuerdo con lo comentado al inicio del presente capítulo).

Los caudales empleados durante este experimento se detallan en la tabla 2.3. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el experimento 1 se ha optado por elegir un número bajo de pruebas, pero que eran óptimas para la creación de partículas.

Tabla 2.3: Pruebas correspondientes al experimento 2

Prueba No.	Caudal interior (ml/h)	Caudal exterior (ml/h)
1	1	50
2	0'3	50
3	0'08	50

Aprovechando el carácter fotosensible del SomosWatershed se procedió a curar, esto es, a solidificar las partículas obtenidas para estos valores de caudales. Para realizar el proceso de curación se empleó una fuente de radiación ultravioleta. A la fuente se conectan dos sondas que se encargarán de proyectar la radiación sobre una zona concreta del tubo por el que pasarán las partículas formadas.

■ Experimento 3

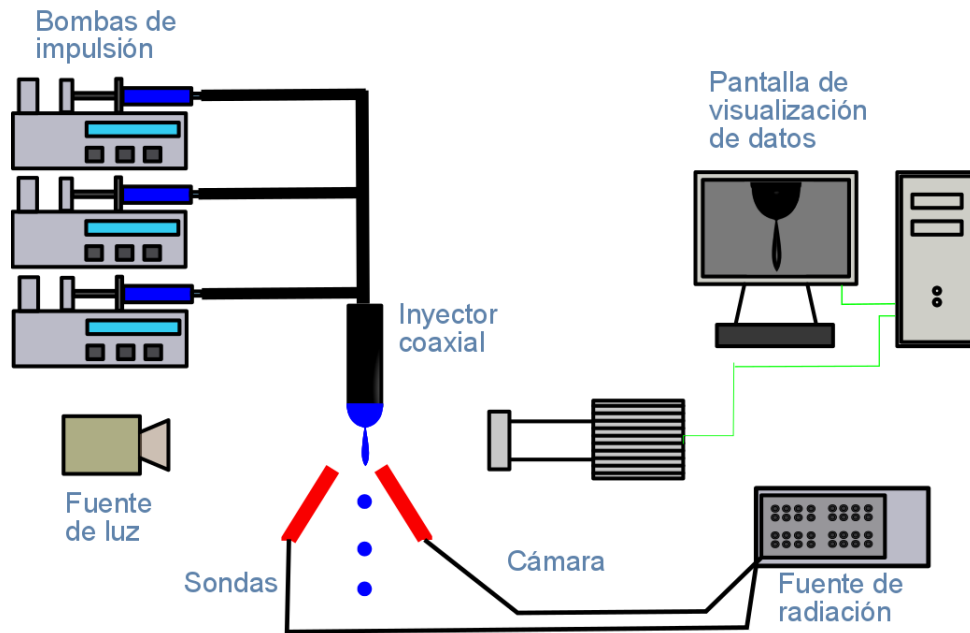


Figura 2.3: Montaje del equipo de laboratorio para el experimento número 3

En este experimento se emplea un inyector coaxial que permita introducir un tercer fluido al sistema. Ese líquido es el LCRa tintado con azul de metileno, ya que este será el vehículo en el que se podrían disolver los neuropéptidos.

2.2. Resultados

2.2.1. Experimento 1

Con el objetivo de estudiar la formación del chorro con respecto a la variación de caudales en la técnica del co-flujo, se realiza el experimento 1.

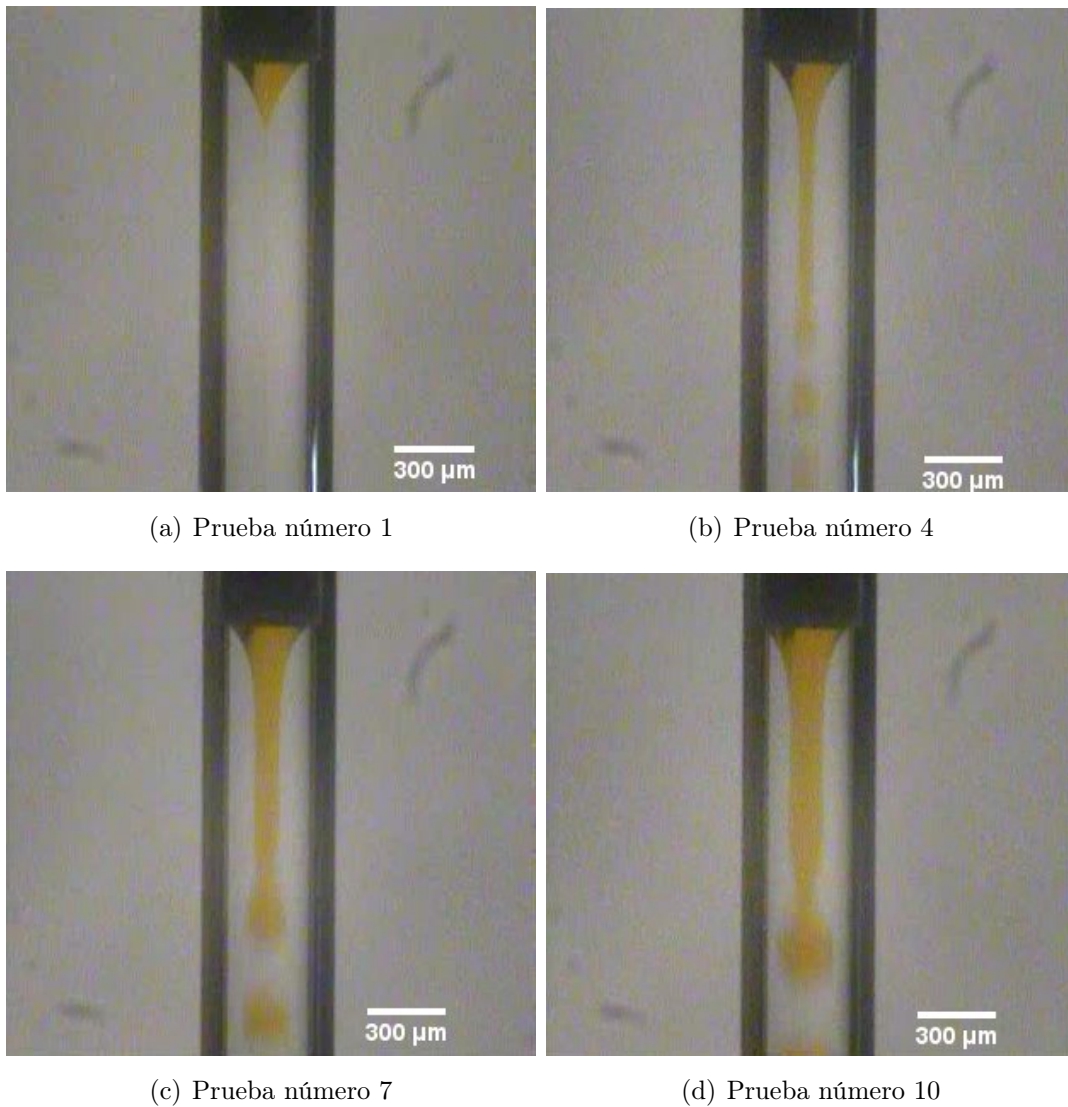


Figura 2.4: Evolución del chorro al variar los caudales en el experimento 1

En la figura 2.4 se muestra el chorro observado para las variaciones de caudal indicadas en la tabla 2.4. Es posible observar la formación de partículas en los apartados (b), (c) y (d), que corresponden a los caudales interiores de 0'1, 4, 12 y 20 ml/h, respectivamente. En estos casos se ven claras las fases de chorro y de goteo, cuando ya aparecen las partículas. Se aprecia que a medida que se va aumentando el caudal también lo hace el grosor del chorro, alcanzando éste un máximo de **114'130** micras como se puede observar en el apartado (d).

Tabla 2.4: Grosor del chorro para las pruebas seleccionadas

Caudal interior (ml/h)	Grosor del chorro (micras)
0'1	6'330
4	54'645
12	87'432
20	114'130

Se representa en la figura 2.5 la relación de radios capilar-chorro (siendo b el radio del capilar y a el radio del chorro) frente a la relación de caudales Q_e/Q_i durante los experimentos.

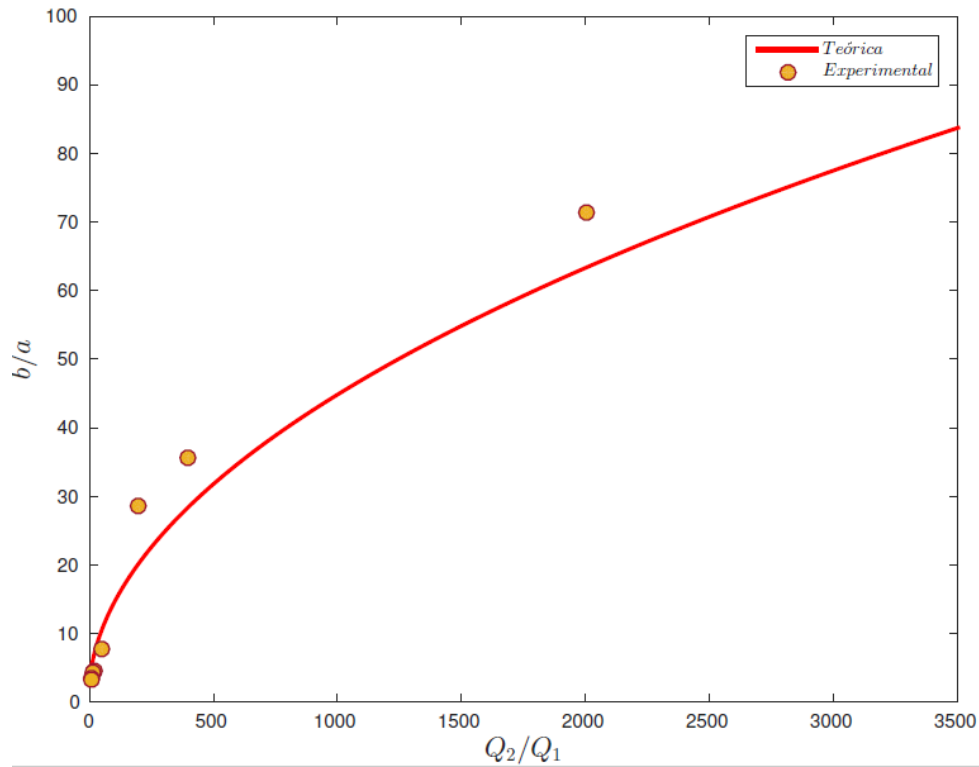
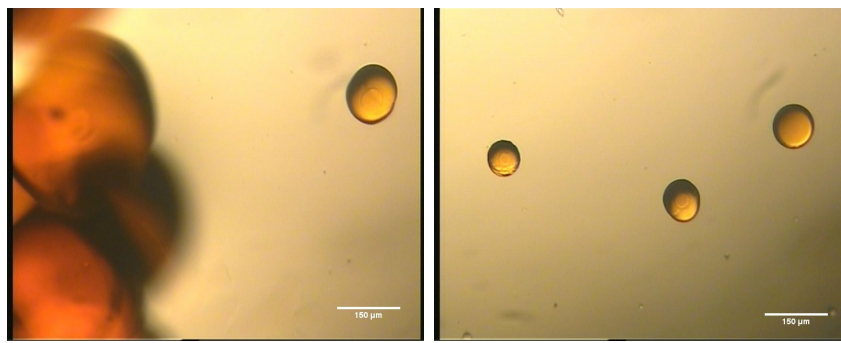


Figura 2.5: Relación de radios frente a relación de caudales. Curvas teórica y experimental.

2.2.2. Experimento 2

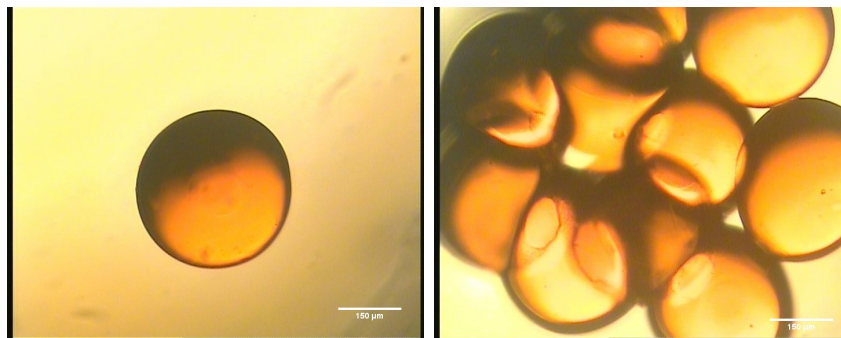
Los resultados que se observan del experimento 2 tras el proceso de curación se muestran en la figura 2.6.

Se realizan tres pruebas (tabla 2.3). En la **prueba 1**, en la que se usaba un caudal interior de 1 ml/h y un caudal exterior de 50 ml/h, se ha observado una gran variedad de partículas conviviendo en una misma placa de muestra. Existen partículas de mayor y menor tamaño (el contraste se puede apreciar en el apartado (a) de la figura 2.6). Del mismo modo, las partículas pueden aparecer aisladas o asociadas, como se observa en los apartados (c) y (d), respectivamente. El tamaño mínimo de partícula obtenido en esta prueba ha sido de **74'142 micras**.



(a) Imagen 1 (10 aumentos)

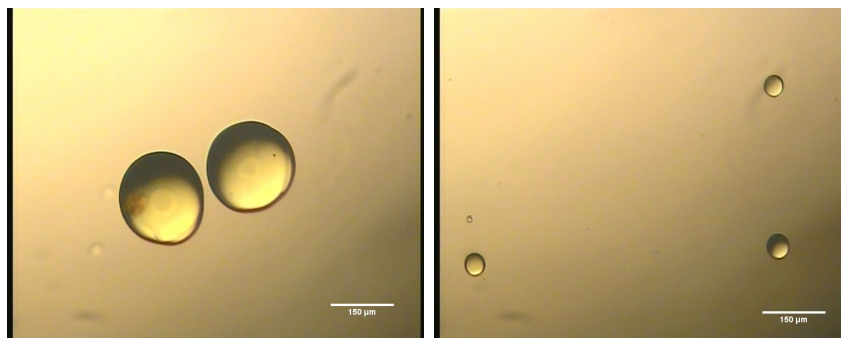
(b) Imagen 2 (10 aumentos)



(c) Imagen 3 (10 aumentos)

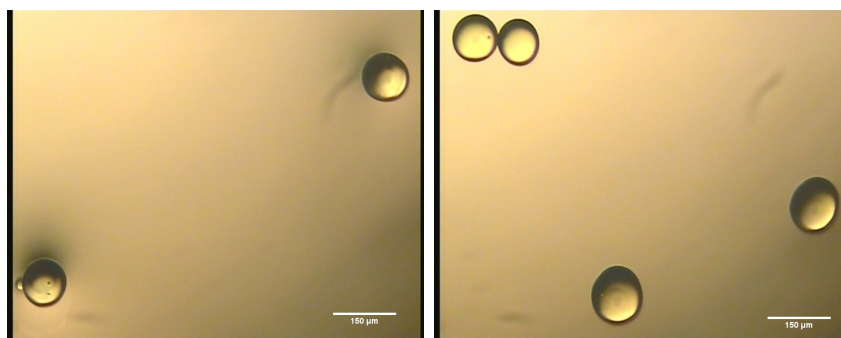
(d) Imagen 4 (10 aumentos)

Figura 2.6: Diferentes partículas obtenidas al realizar la prueba 1



(a) Imagen 1 (10 aumentos)

(b) Imagen 2 (10 aumentos)



(c) Imagen 3 (10 aumentos)

(d) Imagen 4 (10 aumentos)

Figura 2.7: Diferentes partículas obtenidas al realizar las pruebas 2 y 3

Las partículas más óptimas, las que eran más monodispersas y más pequeñas, se obtuvieron en las pruebas 2 y 3 (caudales interiores de 0'3 y 0'08 ml/h de manera respectiva y mismo caudal exterior de 50 ml/h), con un tamaño de partícula de **32 micras** (figura 2.7, apartado *b*).

2.2.3. Experimento 3

En el experimento 3, se usa un inyector coaxial para la introducción de un tercer fluido (LCRa). Los resultados de este experimento se muestran en la figura 2.8. Los apartados *a*, *b* y *c* se corresponden a los caudales interior, medio y exterior de $Q_e = 350$, $Q_m = 1$ y $Q_i = 1$ ml/h, respectivamente; mientras que el apartado *d* es el resultado de aplicar los caudales $Q_e = 320$, $Q_m = 1$ y $Q_i = 1$ ml/h. Se observa en todas las imágenes el LCRa encapsulado en las partículas, con su tono azulado debido al efecto colorante del azul de metileno (donde mejor se aprecia es en el apartado (*d*)). Las partículas más monodispersas son las mostradas en el apartado (*b*).

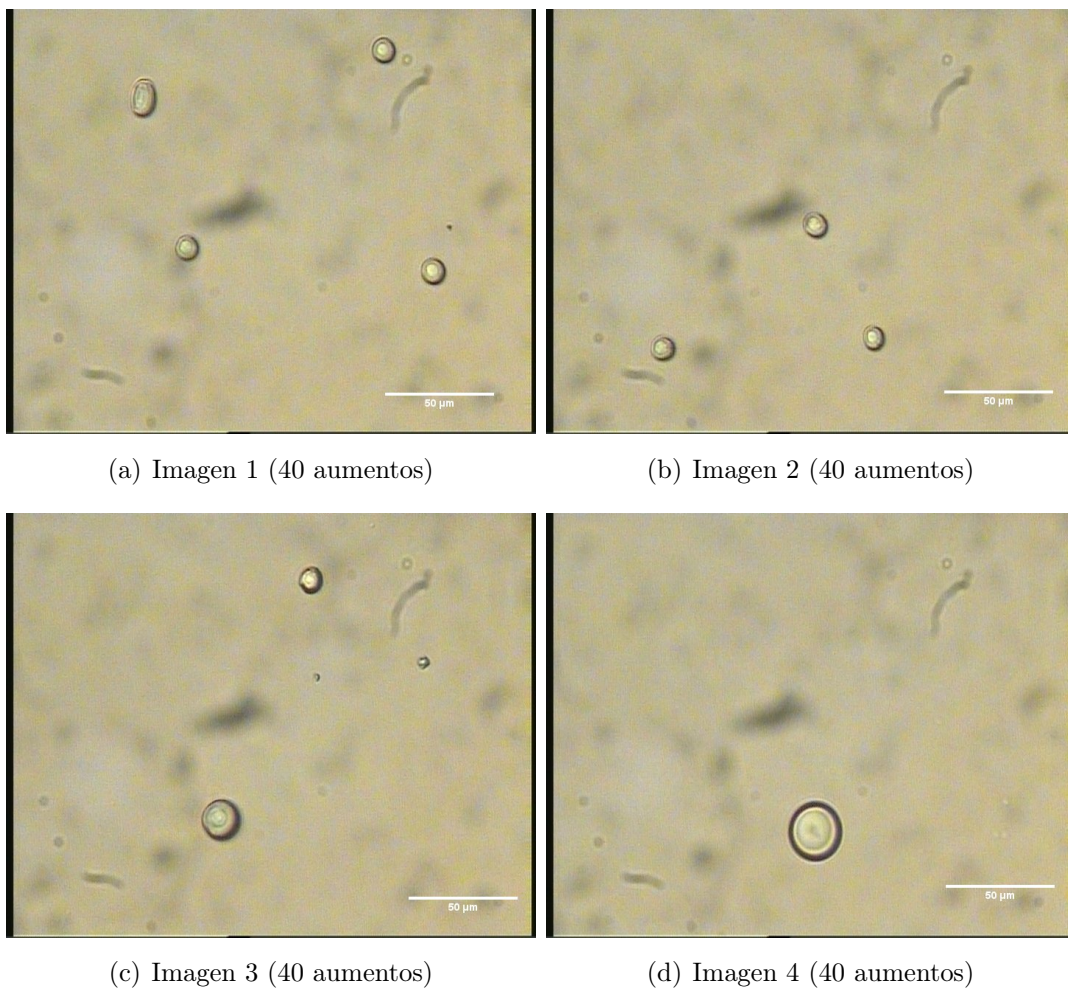


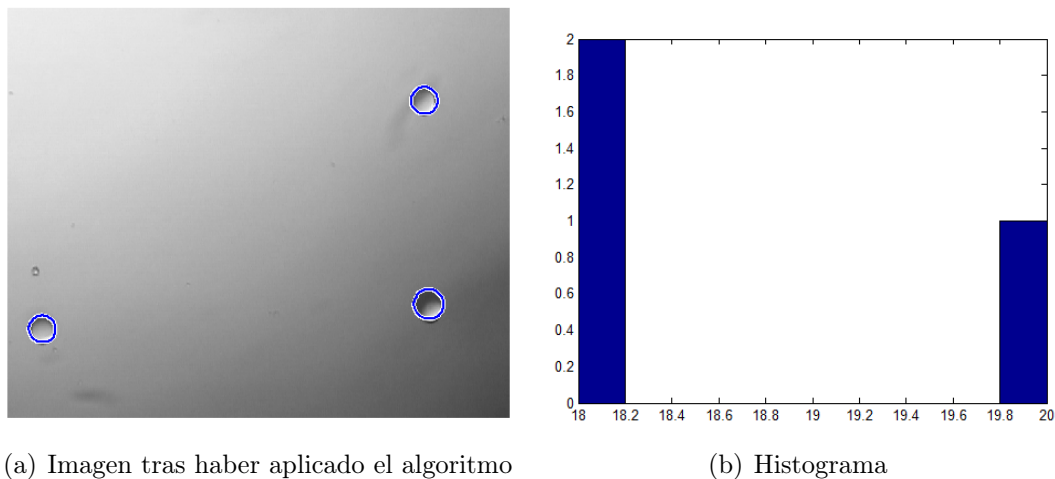
Figura 2.8: Partículas encapsuladas conteniendo LCRa tras realizar el experimento 3

La figura 2.8 muestra cómo en el interior de la partícula (constituida por SomosWatershed) se aloja el LCRa, ligeramente azul con respecto al fotopolímero. El tamaño mínimo

obtenido en este experimento ha sido el menor que se ha conseguido hasta el momento, siendo el mismo de **10'787 micras**.

2.2.4. Detección de partículas

Para la caracterización de las partículas obtenidas en los diferentes experimentos podemos aplicar un algoritmo de detección de circunferencias. Tras su aplicación se traza, en la propia imagen, una línea que delimita el contorno de la partícula, y por otro lado, se genera un histograma en el que el eje de abscisas representa el radio de la partículas y el eje de ordenadas el número de partículas. para indicar la frecuencia de partículas del mismo tamaño, como se muestra en la figura 2.9, en la cual se ha aplicado este algoritmo sobre el apartado *b* de la figura 2.7.



(a) Imagen tras haber aplicado el algoritmo

(b) Histograma

Figura 2.9: Resultados del algoritmo *circleDet*

2.3. Discusión

Tras haber realizado los diferentes experimentos se ha observado que lo ideal es que el caudal interior sea lo más pequeño posible, pero lo suficientemente grande como para que se produzca la formación del chorro. De un modo similar, es conveniente que el caudal exterior (o el caudal de arrastre) sea elevado para que estire el líquido interior lo máximo permitido. Así, teniendo en cuenta esto, se favorece la creación de un chorro (y consecuentemente de partículas) de pequeño grosor.

En el caso del **experimento 1** se ha optado por elegir las pruebas de caudales interiores 0'1, 4, 12 y 20 ml/h, siendo las pruebas más óptimas para la creación de partículas, debido a que el resto de pruebas no mostraban una correcta formación de las cápsulas. En cuanto a la comparación de las curvas teórica y experimental del mismo experimento cabe destacar que ambas curvas son relativamente similares, lo cual nos lleva a la conclusión de que las pruebas han reflejado el resultado esperado, lo que confirma que el procedimiento

seguido es el adecuado.

El **experimento 2** consistió en la realización de 3 pruebas haciendo uso de SomosWatershed y aceite. La prueba 1, en la que los caudales interior y exterior empleados fueron de 1 y de 50 ml/h, respectivamente resultó en la obtención de partículas, pero de tamaño muy heterogéneo. Esto puede ser debido a que el caudal interior empleado era demasiado alto, favoreciendo no solamente esta diferencia de tamaño, sino también la formación de complejos de partículas. Por otro lado, en este experimento fue necesario tintar más SomosWatershed para continuar realizando pruebas, pero el color del tinte varía a un tono más amarillento debido a que no se empleó la misma concentración del mismo que en el caso anterior. De ahí la diferencia de color entre las imágenes de las figuras 2.6 y 2.7.

Por último, con el objetivo final de generar cápsulas que puedan contener en su interior LCRA, ya que este es el Vehículo en el que se disuelven los neuropéptidos para su administración, en el **experimento 3** se introdujo un tubo de menor diámetro a la salida del inyector. De este modo, el LCRA se alojará en el seno del SomosWatershed. Se trata además de las pruebas realizadas con mayor éxito, ya que se obtuvieron partículas monodispersas que contenían en su núcleo LCRA, siendo además las de menor tamaño hasta el momento, 10'787 micras, aunque este tamaño sigue estando muy alejado del tamaño necesario para ser compatible con la dispersión del fármaco a través de a BHE. En este experimento se optó por establecer un caudal exterior lo más alto posible (llegando prácticamente al límite permitido por la bomba) para así arrastrar más el chorro y consecuentemente provocar el estrechamiento del mismo. También cabe destacar que las partículas son más monodispersas en los apartados (a) y (b).

Cuanto menor es el caudal interior, más monodispersas y de menor tamaño son las partículas resultantes. Consecuentemente si el caudal interior es muy elevado se favorece la formación de aglomeraciones y partículas de muy distintos tamaños, hecho que por ello procura evitarse.

El estado sólido de las partículas obtenidas se obtiene debido al comportamiento fotosensible del SomosWatershed, que posibilita este fenómeno. Además, el hecho de crear una partícula sólida permite alojar una sustancia en su interior, lo cual constituye un factor clave para encapsular sustancias como el LCRA.

Cabe destacar que los materiales empleados en los diferentes experimentos son citotóxicos, ya que inducen una inhibición del crecimiento de las células del orden del 90%. A pesar de ello, se trata de materiales que favorecen en gran medida la formación de partículas mediante co-flujo, y además el SomosWatershed permite la solidificación de las partículas obtenidas. Es por todo esto que se optara por la utilización de dichos materiales en estos experimentos.

En cuanto a la caracterización de las partículas generadas, se ha optado por aplicar un algoritmo de tamaños, donde se puede observar que al aplicar dicho algoritmo se destacan las cápsulas de la imagen correspondiente, así como su histograma, que muestra la frecuencia con la que aparecen partículas del mismo radio. En este caso no es necesario usarlo ya que aparecen en la imagen un bajo número de partículas. No obstante, se trata de una herramienta que podría ser de gran utilidad si la cantidad de cápsulas fuera muy alta. Es más, no solamente contabiliza el número de partículas, sino que además al hacer el histograma las agrupa por tamaños.

Tras todas las pruebas realizadas, se ha demostrado la capacidad de la técnica del co-flujo para la generación de partículas capaces de contener en su interior LCRA, lo cual constituye un primer avance para la formación de cápsulas que puedan albergar fármacos y así tratar de superar la BHE como mecanismo para tratar el elevado número de enfermedades que afectan al SNC. En el próximo apartado de líneas futuras de trabajo se proponen algunas ideas que podrían optimizar la generación de partículas, con lo cual este trabajo debe continuar desarrollándose para poder solventar problemas aún pendientes para alcanzar este objetivo.

Capítulo 3

Conclusiones y líneas futuras de trabajo

3.1. Conclusiones

Se ha demostrado la capacidad del etilenglicol para estudiar la técnica del co-flujo, en especial con relación a la formación del chorro.

Se ha observado que el SomosWatershed es un material de gran utilidad para la encapsulación mediante co-flujo debido a su carácter fotosensible, permitiendo solidificar las partículas obtenidas.

No obstante, según la búsqueda bibliográfica se ha concluido que el etilenglicol y el SomosWatershed no serían materiales viables para la introducción de las partículas creadas en el organismo debido a su componente tóxico.

Por último, se ha confirmado la capacidad de la técnica del co-flujo para crear partículas tanto compactas como cápsulas susceptibles de alojar LCRA en su interior, ambas del orden de micras.

3.2. Líneas futuras de trabajo

En base a las conclusiones obtenidas, se proponen las siguientes líneas futuras de trabajo:

- Reducir el tamaño de las gotas obtenidas lo máximo posible para optimizar el proceso.
- Introducir NPY suspendido en el LCRA antes de proceder a encapsular éste. No se suelen alterar en una medida significativa las propiedades del fluido al añadirle el péptido, con lo cual debería ser un paso que no mostrase mucho impedimento.
- Hacer una búsqueda más exhaustiva de los materiales a emplear, con el objetivo de encontrar algún fotopolímero que no sea citotóxico. En caso de no ser posible esto, quizá optar por emplear otros materiales aunque no sean solidificables mediante

radiación UV y buscar una forma alternativa para pasar estas partículas inicialmente fluidas a sólidas.

- Una vez se han creado cápsulas conteniendo sustancia en su interior, realizar estudios in vitro de liberación del fármaco.
- Concluir qué tipo de transporte es el que mejor favorece la llegada del fármaco al SNC.

Bibliografía

- Allhenn, D., Boushehri, M. A. S., and Lamprecht, A. (2012). Drug delivery strategies for the treatment of malignant gliomas. *International journal of pharmaceuticals*, 436(1):299–310.
- Barbu, E., Molnár, É., Tsibouklis, J., and Górecki, D. C. (2009). The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood–brain barrier. *Expert opinion on drug delivery*, 6(6):553–565.
- Bauer, H. and Traweger, A. (2016). Tight junctions of the blood-brain barrier—a molecular gatekeeper. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 15(9):1016–1029.
- Béduneau, A., Saulnier, P., and Benoit, J.-P. (2007). Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials*, 28(33):4947–4967.
- Chang, J., Jallouli, Y., Kroubi, M., Yuan, X.-b., Feng, W., Kang, C.-s., Pu, P.-y., and Betbeder, D. (2009). Characterization of endocytosis of transferrin-coated plga nanoparticles by the blood–brain barrier. *International journal of pharmaceuticals*, 379(2):285–292.
- Chapman, C. D., Frey, W. H., Craft, S., Danielyan, L., Hallschmid, M., Schiöth, H. B., and Benedict, C. (2013). Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharmaceutical research*, 30(10):2475–2484.
- Chen, Y. and Liu, L. (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Advanced drug delivery reviews*, 64(7):640–665.
- Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A., Nakagawa, S., Egawa, T., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., Niwa, M., and Kataoka, Y. (2005). Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood–brain barrier functions through transforming growth factor- β production. *Brain research*, 1038(2):208–215.
- Dore-Duffy, P. (2008). Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Current pharmaceutical design*, 14(16):1581–1593.
- Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and cell biology*, 130(1):55–70.

- Fortin, D., Gendron, C., Boudrias, M., and Garant, M.-P. (2007). Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in the treatment of cerebral metastasis. *Cancer*, 109(4):751–760.
- Gabathuler, R. (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of disease*, 37(1):48–57.
- Georgieva, J. V., Hoekstra, D., and Zuhorn, I. S. (2014). Smuggling drugs into the brain: an overview of ligands targeting transcytosis for drug delivery across the blood–brain barrier. *Pharmaceutics*, 6(4):557–583.
- HUANG, Z.-r. et al. (2008). Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(9):1094–1102.
- Huwyler, J., Wu, D., and Pardridge, W. M. (1996). Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24):14164–14169.
- Hynynen, K. (2008). Ultrasound for drug and gene delivery to the brain. *Advanced drug delivery reviews*, 60(10):1209–1217.
- Jin, S.-E., Jin, H.-E., and Hong, S.-S. (2014). Targeted delivery system of nanobiomaterials in anticancer therapy: from cells to clinics. *BioMed research international*, 2014.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*, 19(8):312–318.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3):3–25.
- Lu, W., Wan, J., Zhang, Q., She, Z., and Jiang, X. (2007). Aclarubicin-loaded cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticle for glioma chemotherapy in rats. *International journal of cancer*, 120(2):420–431.
- Matthäus, C., Bird, B., Miljković, M., Chernenko, T., Romeo, M., and Diem, M. (2008). Infrared and raman microscopy in cell biology. *Methods in cell biology*, 89:275–308.
- Mora, M., Sagristá, M.-L., Trombetta, D., Bonina, F. P., De Pasquale, A., and Saija, A. (2002). Design and characterization of liposomes containing long-chain n-acylphospholipids for brain delivery: penetration of liposomes incorporating GM1 into the rat brain. *Pharmaceutical research*, 19(10):1430–1438.
- Pardridge, W. M. (2003). Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Molecular interventions*, 3(2):90.

- Parker, R. and Herzog, H. (1999). Regional distribution of γ -receptor subtype mRNAs in rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 11(4):1431–1448.
- Parveen, S. and Sahoo, S. K. (2011). Long circulating chitosan/peg blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *European journal of pharmacology*, 670(2):372–383.
- Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J., and Kanmogne, G. D. (2006). Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(3):223–236.
- Reichmann, F. and Holzer, P. (2016). Neuropeptide γ : A stressful review. *Neuropeptides*, 55:99–109.
- Sajdyk, T. J., Shekhar, A., and Gehlert, D. R. (2004). Interactions between NPY and CRF in the amygdala to regulate emotionality. *Neuropeptides*, 38(4):225–234.
- Serova, L., Laukova, M., Alaluf, L., Pucillo, L., and Sabban, E. (2014). Intranasal neuropeptide γ reverses anxiety and depressive-like behavior impaired by single prolonged stress PTSD model. *European Neuropsychopharmacology*, 24(1):142–147.
- Stockwell, J., Abdi, N., Lu, X., Maheshwari, O., and Taghibiglou, C. (2014). Novel central nervous system drug delivery systems. *Chemical biology & drug design*, 83(5):507–520.
- Tam, V. H., Sosa, C., Liu, R., Yao, N., and Priestley, R. D. (2016). Nanomedicine as a non-invasive strategy for drug delivery across the blood brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1):331–342.
- Wang, J., Huang, Y., E David, A., Chertok, B., Zhang, L., Yu, F., and C Yang, V. (2012). Magnetic nanoparticles for MRI of brain tumors. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(12):2403–2416.
- Winer, J. L., Kim, P. E., Law, M., Liu, C. Y., and Apuzzo, M. L. (2011). Visualizing the future: enhancing neuroimaging with nanotechnology. *World neurosurgery*, 75(5):626–637.
- Wolburg, H. and Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular pharmacology*, 38(6):323–337.
- Wong, H. L., Wu, X. Y., and Bendayan, R. (2012). Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, 64(7):686–700.
- Yurchenco, P. D. and Patton, B. L. (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Current pharmaceutical design*, 15(12):1277–1294.
- Zhao, M., Chang, J., Fu, X., Liang, C., Liang, S., Yan, R., and Li, A. (2012). Nano-sized cationic polymeric magnetic liposomes significantly improve drug delivery to the brain in rats. *Journal of drug targeting*, 20(5):416–421.

- Zhu, F., Friedrich, T., Nugegoda, D., Kaslin, J., and Wlodkovic, D. (2015a). Assessment of the biocompatibility of three-dimensional-printed polymers using multispecies toxicity tests. *Biomicrofluidics*, 9(6):061103.
- Zhu, F., Skommer, J., Friedrich, T., Kaslin, J., and Wlodkovic, D. (2015b). 3d printed polymers toxicity profiling: a caution for biodevice applications. In *SPIE Micro+ Nano Materials, Devices, and Applications*, pages 96680Z–96680Z. International Society for Optics and Photonics.
- Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2):178–201.

Anexo I. Código de Matlab para la detección de cápsulas

```
function circleDet

% Entrada de datos
correcto=false;
defaultanswer={'jpg','0.9','dark'};
while ~correcto
    prompt={'Image_extension: ','Sensitivity_[0,..1]: ','
           'Polarity_[bright/dark]: '};
    name='Input_parameters';
    numlines=1;

    answer=inputdlg(prompt,name,numlines,defaultanswer);
    extension=answer{1};
    sens=str2double(answer{2});
    pol=answer{3};
    defaultanswer=answer;

    correcto=true;
    if ~(strcmp(pol,'bright') || strcmp(pol,'dark')), correcto=false; end
    if (sens>1 || sens<0), correcto=false; end
end

% Lectura del archivo
if ~ispref('misPreferencias','pathname');
    addpref('misPreferencias','pathname','');
end

pathname=getpref('misPreferencias','pathname');
if pathname==0
    setpref('misPreferencias','pathname','');
```

```

    pathname=getpref('misPreferencias','pathname');
end
[filename,pathname] = uigetfile(['*.',extension], 'seleccionar_imagen',
,pathname);
setpref('misPreferencias','pathname',pathname);
im = imread([pathname,filename]);
if size(im,3)>1, im=rgb2gray(im); end

% Recortar imagen
hf=figure('color','w'); imshow(im)
[x,y]=ginput(2);
x=round(x); y=round(y);
im=im(y(1):y(end),x(1):x(end));
close(hf)

% Elegir radios menor y mayor
hf1=figure('color','w'); imshow(im)
zoom, pause, [x,y] = ginput(2);
Rmin=round(sqrt(diff(x)^2+diff(y)^2)/2);
zoom, pause, [x,y] = ginput(2);
Rmax=round(sqrt(diff(x)^2+diff(y)^2)/2);

% Transformada de Hough
[centers, radii] = imfindcircles(im,[Rmin Rmax], 'ObjectPolarity',pol,
'Sensitivity',sens, 'method', 'TwoStage');
zoom out
viscircles(centers, radii, 'EdgeColor', 'b');
figure('color','w'), hist(radii)

% Guardar resultados
save([pathname,filename(1:end-4)], 'radii')
savefig(hf1,[pathname,filename(1:end-4)])

```