

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-LEVODOPA-SULFORODAMINA(B)
SOBRE CÉLULAS DE LA SUSTANCIA NEGRA EN UN MODELO MURINO *IN*

TUDO . *VITRO* UMINAN

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOLOGÍA
CON OPCIÓN EN: BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

OLIMPIA MARÍA ORTEGA FIMBRES

Hermosillo, Sonora

Febrero, 2022

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de **Olimpia María Ortega Fimbres** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en **Biotecnología**.

Dr. Marcelino Montiel Herrera

Director de Tesis

Dr. Enrique De la Re Vega

Sinodal Secretario

Q.B. Claudia Celeste Molina Domínguez

Sinodal

Dra. Claudia Castillo Martín del Campo

Suplente

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a las personas que forman parte de mi soporte, que, sin ellas, sin su base, no estaría hoy en día terminando este proyecto. Ha sido un proceso largo, lleno de desafíos mentales, físicos y emocionales, pero con el apoyo de cada uno de ellos el camino fue más ameno:

A mis padres y hermano por su apoyo incondicional en cada una de mis etapas escolares. Por los desvelos, preocupaciones, consejos; por respetar mis decisiones y por aprender a confiar en los caminos que elijo tomar.

A mi abuelo Alonso que, a pesar de los giros inesperados de mis decisiones, siempre estuvo para mí y el apoyo nunca cesó. Por su sabiduría en el quehacer diario, ante los problemas de la vida y en la lucha por siempre salir adelante.

A Verver por formar parte de cada etapa de este arduo proceso, por estar para mí incluso cuando yo misma no me sentía con la fuerza para hacerlo. Por nunca dudar de mi capacidad; por enseñarme a luchar por mí, por mis sueños, y por su comprensión y amor inagotables.

Al profesor Eduardo Aguirre Hinojosa por su apoyo educativo y emocional, antes y durante mi transcurso por la carrera de biología; por siempre tener tiempo, un oído y un consejo para mí, así como por creer en mí cuando los demás no lo hicieron, incluso sin conocerme lo suficiente.

Al Dr. Marcelino Montiel Herrera por el gran apoyo que ha significado para mí, tanto a nivel académico como personal; por aceptarme en su laboratorio durante mi segundo semestre de la carrera, por creer en mí, por sus consejos, sabiduría, tutoría y amistad.

Al resto de mi familia, abuelos, tíos, primos y amigos cercanos, por ser parte de mi pilar diario.

Y, por último, pero no menos importante, recordando lo que en algún momento me hizo ver Reyna, este trabajo me lo dedico a mí misma; porque fuiste, eres y serás la única persona que siempre estará a mi lado; porque este proceso te enseñó que eres más capaz de lo que crees y nunca te diste por vencida. Porque solo tú conoces la historia completa y confío en ti para seguir viendo por ti, por tu futuro, sueños y metas.

AGRADECIMIENTOS

Un proyecto de tesis lleva el nombre de una sola persona, pero el esfuerzo y el trabajo detrás es de varios; este caso no es la excepción y por lo anterior quiero externar mi más sincero agradecimiento a:

Dios por siempre guiar mis pasos y nunca abandonarme. Por darme la vida, todo lo que hay en ella y razones infinitas por las cuales luchar cada día.

A mi familia, novio y amigos por su apoyo económico, material, moral y emocional. Por hacer que el concepto de “salir adelante” sea más ameno y llevadero.

A mi director, el Dr. Marcelino Montiel Herrera, por ser la primera persona que me abrió las puertas del mundo de las neurociencias. Por su apoyo constante, por nunca dejar de creer en mí, por confiar en mi capacidad y siempre apoyarme sin titubear. Por las horas y esfuerzo que invirtió en mi educación y en este proyecto, por explicarme lo que necesitaba; por siempre alentarme a aprovechar las oportunidades que se me presentan e incentivarme a dar un esfuerzo extra para salir de mi zona de confort.

A mi comité de tesis: al Dr. Enrique De la Re Vega por su gran disposición, apoyo académico y técnico; así como por formar parte importante de mi desarrollo integral dentro de mi etapa universitaria. A la Q.B. Claudia Celeste Molina Domínguez por presentarme al Dr. Marcelino, por creer en mi capacidad científica y por su apoyo técnico. Y a la Dra. Claudia Castillo Martín del Campo, por compartir conmigo a pesar de la distancia su guía y conocimientos.

Al M.C. Francisco Jonathan Pérez Delgado, al E. M.C. Miguel Ángel Valencia Núñez, al Dr. Daniel Fernández Quiroz, a la M.C. Miriam Denisse García Villa, al Dr. Refugio Pérez González, a la cDra. Andya Jhosephin Ramírez Irigoyen, a la Q.B. Bertha Isabel Pacheco Moreno y al Dr. Humberto Astiazarán García por su apoyo técnico.

Y, por último, agradezco a la Universidad de Sonora, al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, a la Licenciatura en Biología, y al Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud por haberme abierto sus puertas y haber sido un par de aguas en mi vida académica, profesional y personal.

CONTENIDO

FORMATO DE APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
I. RESUMEN	9
II. INTRODUCCIÓN	10
III. ANTECEDENTES	11
III.1. Sistema Nervioso	11
III.1.1. Sistema motor	17
III.1.2. Fisiopatología del sistema motor	21
III.2. Biopolímeros	24
III.2.1. Quitosana y sus derivados químicos	25
III.2.2. Caracterización de biopolímeros derivados de quitosana	27
III.2.3. Función de los derivados de quitosana en sistemas biológicos	32
IV. JUSTIFICACIÓN	33
V. HIPÓTESIS CIENTÍFICA	34
VI. OBJETIVOS	34
VI.1. Objetivo General	34
VI.2. Objetivos Específicos	35
VII. METODOLOGÍA	35
VII.1 Síntesis de Quitosana-Levodopa-Sulforrodamina(B) (QLS)	35
VII.2 Caracterización Químico-Física de QLS	36
VII.3 Preparación y Caracterización Física de Nanopartículas a partir de QLS	37
VII.4. Distribución sistémica <i>in vivo</i> de SRB	37
VII.5. Cultivos Primarios de Células de la Sustancia Negra Mesencefálica de la Rata	38
VII.6. Localización de las nQLS en Cultivos Celulares Primarios de SN	38
VIII. RESULTADOS	39
VIII.1. Caracterización Químico-física de QLS	39
VIII.1.1. Espectroscopía FT-IR	39
VIII.1.2. 1H-RMN	41

VIII.2. Características físicas de las nQLS	42
VIII.3. Distribución Sistémica In Vivo de SRB	45
VIII.4. Localización de nQLS en Cultivos Celulares Primarios de SN	48
IX. DISCUSIÓN	51
X. CONCLUSIÓN.....	54
XI. LITERATURA CITADA	55

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla I	Fármacos comunes para el tratamiento de la EP según la clase de medicamento.	23
Tabla II	Ejemplos de biopolímeros con sus respectivas señales distintivas de acuerdo con los métodos de caracterización fisicoquímica: FT-IR, 1H-RMN y RMN-13C.	28

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Sistema nervioso central humano. 13
Figura 2	Componentes de la UNV y de la BBH. 16
Figura 3	Conexiones aferentes y eferentes del cuerpo estriado. 19
Figura 4	Estructura primaria de la quitina y la Q. 26
Figura 5	Espectro de ¹ H-RMN de Q. 31
Figura 6	Espectros de FT-IR de Quitosana y Q-Levodopa comparados con el de Q-Levodopa-SRB. 41
Figura 7	Espectros de ¹ H-RMN de Quitosana, Q-Levodopa y Q-Levodopa-SRB con sus desplazamientos químicos característicos. 42
Figura 8	Características físicas de las nQLS. 44
Figura 9	Diámetro hidrodinámico de las nQLS sintetizadas determinado por dispersión dinámica de luz. 45
Figura 10	Distribución sistémica de SRB en ratas Wistar (P15-P26) después de 1 h de administrarse. 46
Figura 11	Distribución sistémica de SRB en ratas Wistar (P15-P26) después de 3 h de administrarse. 47
Figura 12	Distribución sistémica de SRB en ratas Wistar (P15-P26) después de 5 h de administrarse. 48
Figura 13	Localización de nQLS en cultivos celulares primarios de SN (P3) en campo claro. 49
Figura 14	Localización de nQLS en cultivos celulares primarios de SN (P3). 50

I. RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por temblores, discinesias, inestabilidad y rigidez en la postura, que inhabilita progresivamente a un individuo de manera mental y conductual. Dicha enfermedad es causada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra mesencefálica y suele tratarse con fármacos (e.g., levodopa y carbidopa) y rutinas de ejercicio para mejorar la calidad de vida en el paciente. Sin embargo, el consumo prolongado de levodopa genera habituación o resistencia farmacológica en las células cerebrales, alterando al sistema nervioso motor. Por ello, es imperativo elaborar nuevos fármacos dopaminérgicos y estrategias sistémicas de administración controlada. En este sentido, la elaboración de biomateriales inteligentes puede ser una alternativa para estudiar, tratar y entender la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. En este trabajo de investigación se sintetizó un biomaterial basado en quitosana modificada con levodopa y marcado con sulforrodamina B a través de química click. La caracterización del biomaterial con FT-IR y ¹H-RMN confirmó la incorporación de levodopa y de la sulforrodamina B en la cadena polimérica de la quitosana. Asimismo, para generar una estrategia de distribución sistémica del biomaterial, se elaboraron nanopartículas de 103 ± 8.5 nm de diámetro hidrodinámico y se evaluó su localización en cultivos celulares primarios de sustancia negra mesencefálica. Los resultados obtenidos sugieren la internalización de las nanopartículas de Quitosana-Levodopa-Sulforrodamina B en las células de la sustancia negra, por lo que este trabajo muestra el desarrollo de un biopolímero con uso potencial para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson que requiere su evaluación in vivo en modelos animales Hemiparkinsonianos. En su conjunto, este nuevo biomaterial basado en quitosana, podría generar un nuevo paradigma farmacológico de administración de sustancias agonistas y precursoras (e.g., dopaminérgicas) para las células cerebrales motoras con el fin de tratar trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson.

II. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades del sistema nervioso son actualmente la fuente número uno de incapacidad a nivel global. La población envejece cada vez más y la edad es considerada un factor de riesgo importante en el aumento de la incidencia de los trastornos neurodegenerativos, incluida la enfermedad de Parkinson (EP) (GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, 2018), la segunda afección neurodegenerativa más común después de la de Alzheimer (Camacho y Campos, 2020).

Estadísticamente, de acuerdo con información de Dorsey et al. (2018), entre los años de 1990 y 2015 en el mundo fueron diagnosticadas más de 6 millones de personas con la EP; pronosticándose que para el 2040 dicha cifra se duplicaría a más de 12 millones de personas. En México, faltan estudios sobre la incidencia de la EP, sin embargo, una de las primeras investigaciones que recapituló datos fue realizada entre los años 2014-2017 por Rodríguez-Violante et al. (2019), donde se reportó que en el país se presentaron 37.93 casos de EP por cada 100,000 habitantes, presentando igualmente mayor incidencia los hombres que la mujeres. Se estima que a nivel mundial para 2030 el 3% de la población mayor de 65 años sea afectada por la EP (Palakurthi y Burugupally, 2019).

Lo que caracteriza a la EP es una variedad de eventos motores irregulares (temblores, discinesias, inestabilidad y rigidez en la postura), neuroinflamación y activación microglial en un individuo, que alteran e inhabilitan progresivamente a su sistema nervioso motor y cognoscitivo (Hernando et al., 2018; Opara et al., 2017). Esta enfermedad es causada principalmente por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (SN) mesencefálica (Beitz, 2014). Comúnmente, la EP se trata con fármacos metabólicos dopaminérgicos (e.g., levodopa) que regulan y modulan temporalmente las conductas motoras en los pacientes. Sin embargo, el uso prolongado de dichos medicamentos eventualmente puede desencadenar su habituación o resistencia farmacológica en el sistema nervioso, lo que obliga a generar alternativas para tratar la EP (Hayes, 2019). En este contexto, la elaboración de

biomateriales inteligentes puede ser una alternativa potencial para estudiar, tratar y entender la fisiopatología de la EP.

La Q es un biopolímero biodegradable, biocompatible y de baja toxicidad que puede modificarse estructuralmente a través de reacciones químicas sencillas en un sólo paso, de manera rápida a 25-37°C, en un intervalo amplio de potencial de hidrógeno (pH) 4-12, y que además genera productos regioselectivos de interés para un investigador (Montiel-Herrera et al., 2015). Por ello, la modificación química de la Q con fármacos dopaminérgicos que pudieran servir como estrategia para tratar la EP, es potencialmente un paradigma que debe abordarse. En este sentido, la Q tiene grupos aminos libres (>55%) que pueden ser blancos de reacciones de amidación para incorporar sustancias de bajo peso molecular y así ser transportadas vía sanguínea hacia la barrera hematoencefálica cerebral, para estudiar la biodisponibilidad y el efecto fisiológico de fármacos o derivados metabólicos dopaminérgicos transportados por la Q hacia el cerebro.

En este trabajo de investigación se elaborarán y caracterizarán químico-físicamente nanopartículas de un biomaterial derivado de Q amidado con levodopa y marcado con sulforrodamina B (SRB), para evaluar sus efectos fisiológicos *in vitro* sobre cultivos celulares de la SN mesencefálica de rata.

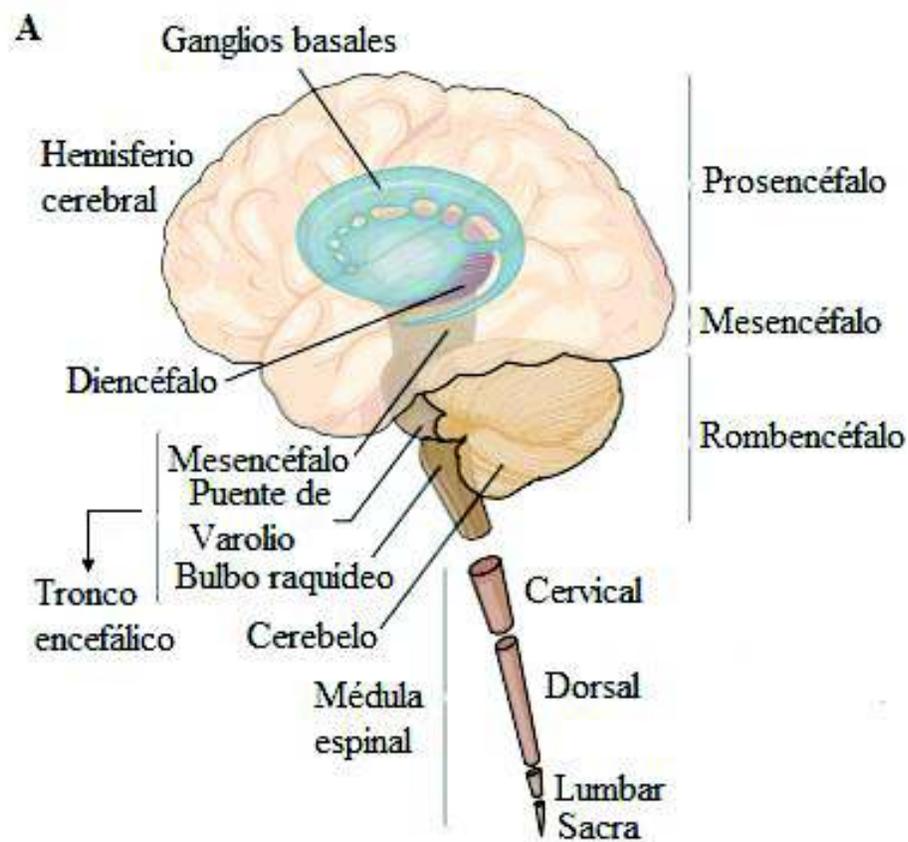
III. ANTECEDENTES

III.1. Sistema Nervioso

El sistema nervioso en cordados se divide en periférico (SNP) y central (SNC). El primero agrupa células nerviosas que se localizan fuera del SNC y ramificaciones axonales que enlazan a ambos sistemas, es decir, permiten la comunicación entre el encéfalo y la médula espinal con los demás órganos y sistemas del cuerpo. Asimismo, el SNP engloba axones motores que salen

del SNC a órganos y músculos, por lo que logra subdividirse en sistema nervioso somático y sistema nervioso autónomo; el primero modera los movimientos voluntarios a través de axones de células localizadas en la médula espinal que alcanzan y activan los músculos esqueléticos; y el segundo, el sistema autónomo, controla la parte involuntaria, modula órganos, glándulas y músculos lisos por medio de proyecciones procedentes principalmente del eje encefálico hipotálamo-hipófisis-glándulas (Audesirk et al., 2008).

El SNC está constituido por la médula espinal, el tronco encefálico (subdividido en bulbo raquídeo, puente de Varolio y mesencéfalo), el cerebelo, el diencefalo y los hemisferios cerebrales (Fig. 1. A) (Kandel et al., 2013).



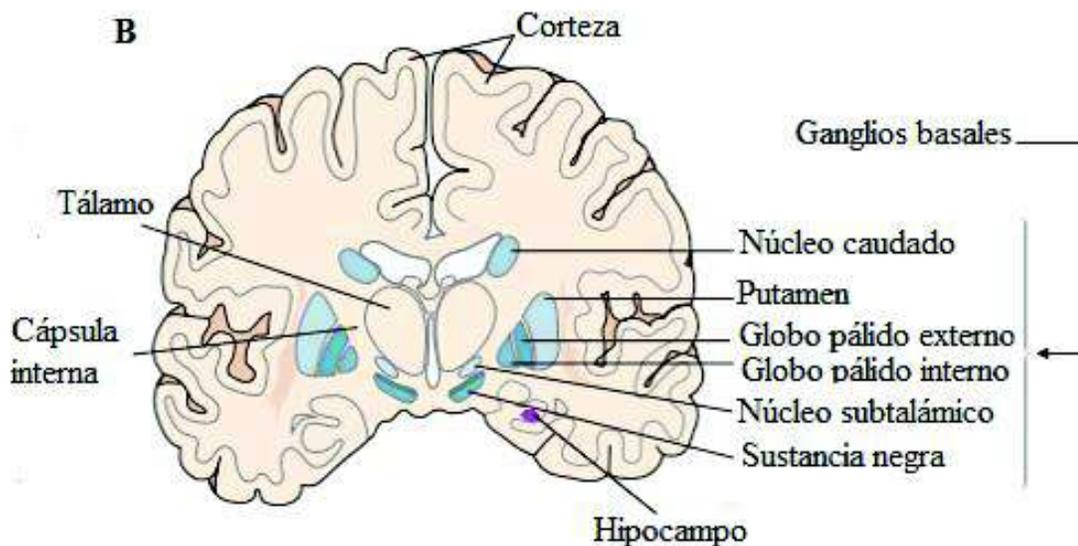


Figura. 1. Sistema nervioso central humano. A. Partes principales del SNC; B. Corte coronal encefálico en el que se muestran los ganglios basales, sus componentes, el tálamo y la cápsula interna. Fuente: Kandel et al. (2013).

La médula espinal es el componente más caudal del SNC (Fig. 1. A) que se encarga de recibir y procesar señales sensoriales que provienen de la piel, articulaciones y músculos de extremidades y el tronco, asimismo modula el movimiento de estos dos últimos (Kandel & Hudspeth, 2013).

El tronco encefálico (Fig. 1. A) recibe estímulos sensoriales provenientes de la piel y los músculos de la cabeza, con los cuales controla sus movimientos. También funge como vía de comunicación entre el cerebro y la médula espinal, y regula por medio de la formación reticular la conciencia y la excitación. El tronco cerebral contiene los núcleos de los nervios craneales, un complejo de núcleos sensoriales y motores de materia gris (Kandel & Hudspeth, 2013). El bulbo raquídeo o médula oblongada es la porción más caudal del tronco del encéfalo (Fig. 1. A), y agrupa centros de funciones autónomas como la respiración y la digestión (Kandel & Hudspeth, 2013; Moore et al., 2017). El puente de Varolio se sitúa entre el mesencéfalo rostralmente y la médula oblongada caudalmente (Fig. 1. A) y dirige la información motora desde los hemisferios cerebrales hasta el cerebelo (Kandel & Hudspeth, 2013). El mesencéfalo se encuentra entre el puente y los hemisferios del cerebro (Fig. 1. A), y se encarga de regular

funciones sensoriales y motoras como la coordinación de los reflejos auditivos y visuales (Chusid, 1987; Kandel & Hudspeth, 2013).

El cerebelo se posiciona posterior al puente y a la médula oblongada e inferior al cerebro posterior (Fig. 1. A) (Moore et al., 2017). Éste desempeña un papel inconsciente en la contracción de los músculos voluntarios, coordina su actividad, y controla la postura corporal. La función del cerebelo es indirecta, ya que no posee una conexión directa con las neuronas motoras inferiores, sino que se comunica por medio de la corteza cerebral y el tronco del encéfalo (Snell, 2010).

El diencefalo se encuentra en el área central del cerebro (Fig. 1. A) y está constituido por el tálamo y el hipotálamo (Moore et al., 2017). El tálamo ocupa la mayor parte del diencefalo (Fig. 1. B) y es una masa ovoide que funge como intermediaria de los sistemas sensitivos más importantes, a excepción del olfato; la mayoría de la información que se recibe se integra y se direcciona a la corteza cerebral y regiones subcorticales (Snell, 2010). El hipotálamo (Fig. 1. B) se sitúa desde el área del quiasma óptico hasta el borde caudal de los cuerpos mamilares y es quien regula e integra las funciones del sistema nervioso autónomo y del endócrino, al igual que controla la homeostasis corporal por medio de la moderación del apetito, de la temperatura interna, la cantidad de líquidos, la conducta sexual y las emociones (Snell, 2010).

Los hemisferios cerebrales (Fig. 1. A) se dividen en dos, compuestos de una capa externa plegada llamada corteza cerebral (Fig. 1. B); y tres estructuras no superficiales que son los ganglios basales (GB) (Fig. 1. A y B), el hipocampo y el cuerpo amigdalino (Drake et al., 2015; Kandel & Hudspeth, 2013). En la superficie de la corteza del cerebro se observan circunvoluciones y surcos, divididos en cuatro lóbulos (frontal, temporal, parietal y occipital) todos ellos con funciones especializadas motoras o sensitivas (Snell, 2010). Los GB son una red interconectada de núcleos y se componen principalmente por cuatro estructuras: el cuerpo estriado, el globo pálido (GP), la sustancia negra (SN) y el núcleo subtalámico (Fig. 1. B); se encuentran estrechamente relacionados con funciones no motoras y motoras, con la iniciación y realización del movimiento (Avila-Luna & Bueno-Nava, 2014). El hipocampo (Fig. 1. B) es una elevación curva de sustancia gris perteneciente al sistema límbico y posee funciones relacionadas con el almacenamiento de la memoria y la percepción espacial (Kandel & Hudspeth, 2013). Los cuerpos amigdalinos se conforman por un conjunto de núcleos localizado en ambos lóbulos temporales. La amígdala regula respuestas autónomas y endócrinas del

organismo fuertemente asociados a estados emocionales y conducta natas como la materna, paterna y de huida (Kandel y Hudspeth, 2013; Snell, 2010).

Otro componente importante del SNC es la unidad neurovascular (UNV), un conjunto celular compuesto por neuronas, interneuronas, astrocitos, lámina basal con células musculares lisas y pericitos, células endoteliales y matriz extracelular (Harder et al., 2002) (Fig. 2) que, dependiendo de la demanda neuronal, regulan el suministro microscópico de sangre a nivel regional para cumplir con las necesidades de oxígeno y nutrientes. La autoregulación sanguínea es provocada por cambios en el diámetro de los vasos, los cuales son realizados, en el caso de aquellos de mayor tamaño, por los miocitos y en los capilares por las células endoteliales que los recubren (Muio et al., 2014). Este último tipo de células que revisten las paredes de los capilares cerebrales, pero también las de los microvasos de la médula espinal, es llamado en su conjunto barrera hematoencefálica (BBH) (Fig. 2) y es la encargada de controlar el intercambio iónico, molecular y celular entre el cerebro y la sangre (Abbott et al., 2010; Daneman, 2012). Las células endoteliales de la BBH modulan la homeostasis del SNC; conforman un sistema de transporte selectivo que presenta uniones estrechas entre las células y que, a través de difusión simple o activa dependiente de ATP y por medio de transcitosis de receptores o adsorción (transporte vesicular de macromoléculas), permite el paso exclusivo de oxígeno, glucosa, aminoácidos y algunos nutrientes (Escobar y González, 2008). Lo anterior protege al cerebro de toxinas, fármacos, patógenos, señales inflamatorias, lesiones y enfermedades (Daneman y Prat, 2015).

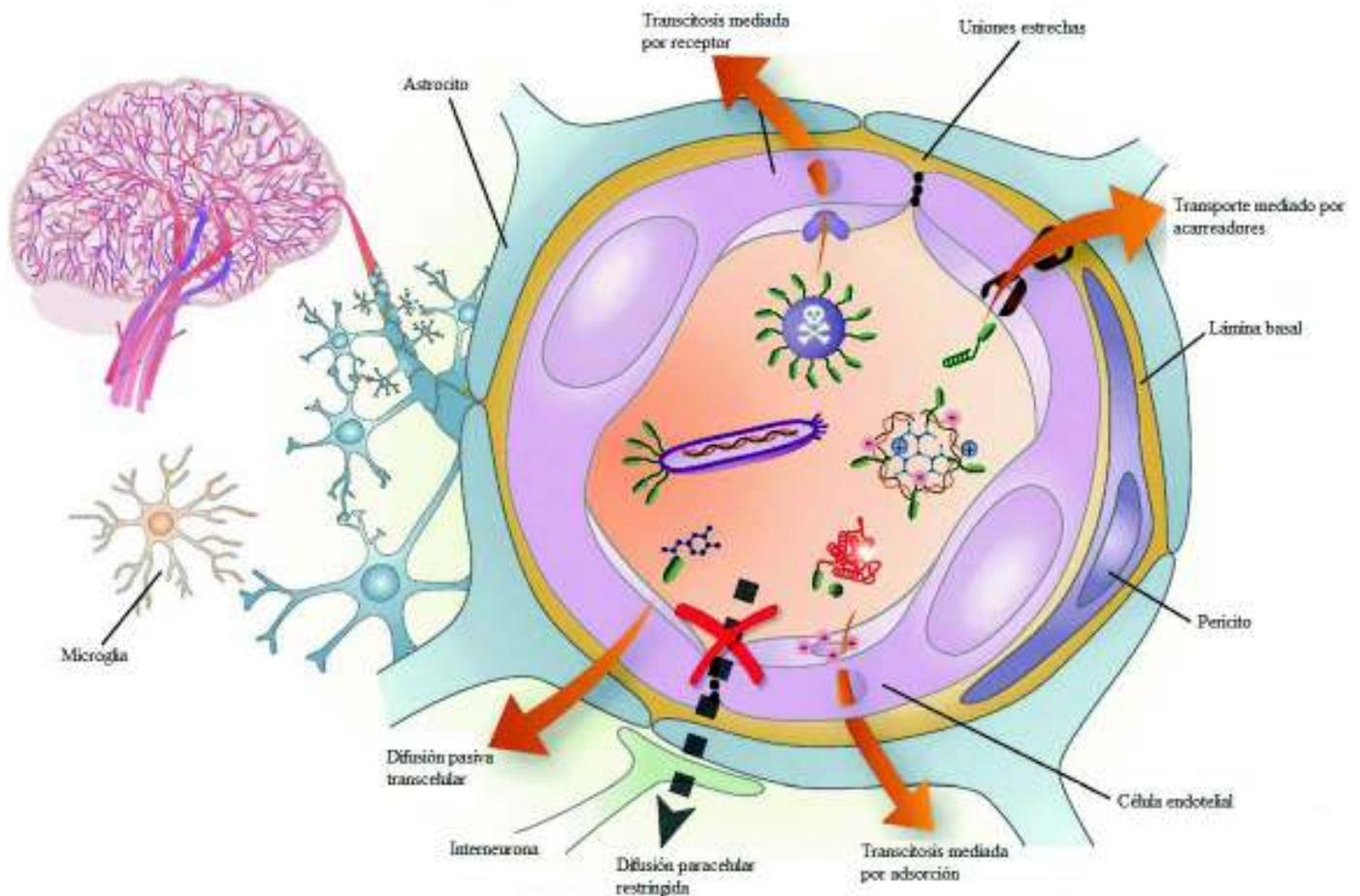


Figura 2. Componentes de la UNV y de la BBH. Las uniones estrechas de las células endoteliales que recubren las paredes de los capilares bloquean el paso de toxinas, fármacos, patógenos, entre otros hacia el área cerebral y solamente ocurre el transporte por difusión simple (difusión pasiva transcelular), activa (e.g., transporte mediado por acarreadores) y por transcitosis de receptores o adsorción (vesículas). Fuente: <https://twitter.com/pjbarrecheguren/status/936350278001070080?lang=ca>.

Las estructuras anteriormente mencionadas intervienen en el procesamiento, planificación y ejecución de órdenes dentro del SNC con la finalidad de efectuar una acción concreta; una de ellas muy importante para todo ser vivo es la del movimiento.

III.1.1. Sistema motor

El sistema motor es el encargado de planificar, coordinar y ejecutar el movimiento en los organismos, sin embargo, se requiere de la interacción de varias áreas cerebrales para ello. Estas estructuras son la corteza cerebral, los núcleos de la base, los núcleos motores del tálamo, el subtálamo, el cerebelo, la SN, los núcleos rojos, la formación reticular, núcleos pontinos, núcleos vestibulares, las olivas inferiores, las neuronas motoras bajas craneales y espinales, y los nervios periféricos (Escobar y Pimienta, 2019).

A nivel jerárquico, la médula espinal es el nivel inferior del sistema motor, en ella se encuentran circuitos neuronales que modulan reflejos y movimientos rítmicos. Las neuronas de la médula espinal se relacionan con proyecciones aferentes, cuyo origen se ubica en los centros superiores y que inducen cambios en las respuestas reflejas (López, 2008).

El asta ventral de la sustancia gris de la médula espinal contiene a los núcleos motores, un conjunto de neuronas motoras cuyos axones abandonan la médula para inervar los músculos esqueléticos. Asimismo, diferentes tipos de interneuronas que se encuentran en la sustancia gris inhiben la salida de proyecciones neuronales de la médula espinal, lo cual repercute en los comandos de información motora que desciende del cerebro a la médula. También, por medio de las interneuronas, las neuronas motoras pueden influir en la salida de axones de otras neuronas motoras. Los cordones laterales y anteriores de la médula espinal contienen axones que proceden del tronco cerebral y de la neocorteza, los cuales interactúan con interneuronas y neuronas motoras de la médula y controlan los músculos axiales y la postura (Amaral, 2013).

El tálamo, ubicado en la parte dorsal del diencefalo, discierne entre la información específica que llega a la corteza, impidiendo o inhibiendo su flujo. Es una estructura constituida por varios núcleos, dentro de los cuales los del grupo ventral anterior y lateral intervienen en el control motor al transferir información de los GB y el encéfalo a la corteza motora (Amaral, 2013).

La corteza motora es la encargada de facilitar la creación, mantenimiento y finalización de movimientos voluntarios, y suele dividirse principalmente en tres áreas: la corteza motora primaria, la corteza motora secundaria o premotora y la corteza suplementaria. La primera estructura envía sus proyecciones axonales a la médula espinal, donde repercuten en las motoneuronas bajas y ejercen control sobre la musculatura distal contralateral a su origen. La

segunda área se extiende axonalmente hasta la formación reticular pontina y bulbar; y se encarga de organizar y planificar los movimientos para que éstos sean efectuados de forma precisa y coordinada por la corteza motora primaria. La corteza suplementaria emite los axones de sus neuronas piramidales hacia la médula espinal y controla los músculos proximales, siendo de acción bilateral (Escobar et al., 2006).

Por otra parte, las neuronas de los GB envían proyecciones hacia la corteza motora a través del tálamo (Kandel et al., 2013). Por medio del circuito corticoestriatal inhiben y disciernen entre los movimientos a realizar; controlan la postura corporal y el movimiento fino de las extremidades. También, definen el fin de un movimiento, coordinan secuencias e intervienen en su corrección (Avila-Luna y Bueno-Nava, 2014; Kandel et al., 2013). Los GB poseen una repercusión importante en la efectuación del movimiento; en ellos además se encuentra la SN, la cual posee neuronas de tipo dopaminérgicas.

II.1.1.1. Ganglios basales

Los GB son un complejo de núcleos dentro de los cuales el cuerpo estriado es quien recibe fundamentalmente las proyecciones aferentes corticales, talámicas y troncoencefálicas (Fig. 3). Las neuronas estriatales llegan al GP y la SN, quienes, debido a la similitud morfológica de sus somas, conforman las principales vías eferentes de los GB (Fig. 3).

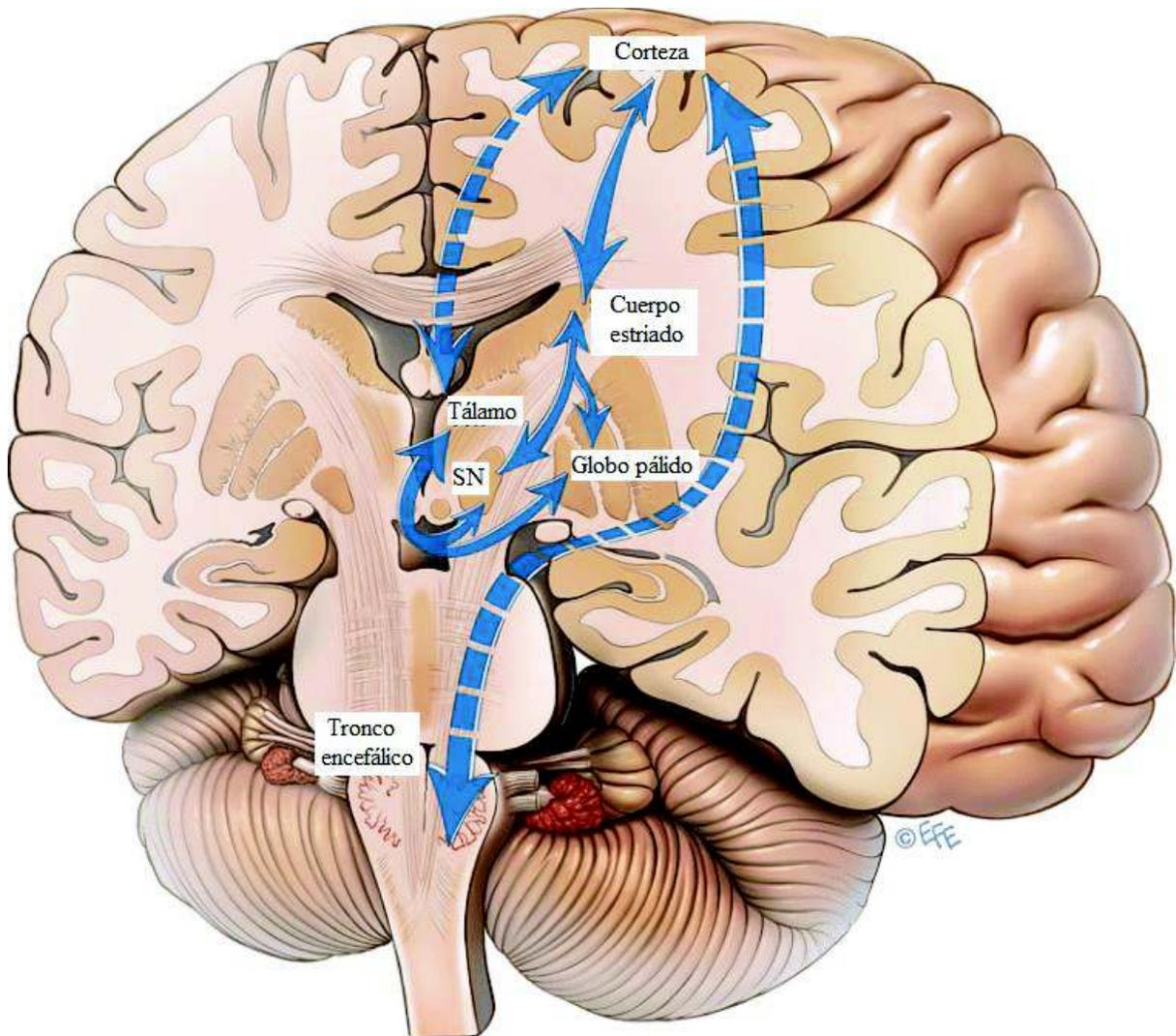


Figura 3. Conexiones aferentes y eferentes del cuerpo estriado. Al estriado llegan las proyecciones axonales de la corteza, el tálamo y el tronco encefálico. Las neuronas estriatales van al GP y a la SN, los cuales son las principales vías eferentes de los GB. Fuente: Hayhow et al. (2013).

Funcionalmente, el segmento interno del GP se asocia con la parte reticulada de la SN (SNr) ya que ambos emplean ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor inhibitorio. La parte compacta de la SN (SNc), ventral a la reticulada, contiene neuronas de dopamina y neuromelanina. La extensión interna de la SNc, el área tegmentoventral, también es dopaminérgica. El núcleo subtalámico de los GB es el único con proyecciones axonales excitadoras de glutamato (Kandel et al., 2013).

El cuerpo estriado recibe proyecciones axonales de glutamato por parte de la corteza para su excitación, al igual que de los núcleos intralaminares del tálamo; también, acepta aferencias dopaminérgicas del mesencéfalo y serotoninérgicas de los núcleos de rafe. El cuerpo estriado cuenta principalmente con neuronas de proyección espinosa media (MSN) de tipo GABAérgicas, quienes se activan únicamente durante el movimiento o como consecuencia de los estímulos periféricos (DeLong, 2000).

Por medio de una vía directa y una indirecta que se originan en el cuerpo estriado, el GP y la SNr reprimen la excitación de los núcleos del tálamo y del tronco cerebral. La vía indirecta, después de llegar al segmento externo del GP, continua hasta el núcleo subtalámico implementando el neurotransmisor GABA; y a partir de aquél último pasa a los núcleos eferentes utilizando glutamato. Como resultado de esta vía se suprime progresivamente al tálamo. La vía directa se activa tras estímulos cortos y rápidos que viajan del cuerpo estriado hasta el GP, donde inhiben las neuronas, posibilitando la activación talámica y cortical (DeLong, 2000). La vía directa genera una retroalimentación positiva, favoreciendo el movimiento y la vía indirecta una negativa, creando el efecto contrario. Ambas rutas están influenciadas por aferencias dopaminérgicas de la SNc: la vía directa contiene receptores de dopamina D1 (RD1), ubicados en la membrana sináptica y el área somatodendrítica de las MSN de proyección estriadonigral, que promueven la transmisión; y la indirecta, receptores D2 (RD2) que la suprimen y se localizan en MSN de proyecciones estriadopalidales. Se ha demostrado que la liberación de dopamina (DA) depende de la activación de los receptores postsinápticos de DA de las MSN (Avila-Luna & Bueno-Nava, 2014).

La actividad del segmento interno del GP y de la SNr normalmente es controlada por las vías directa de RD1 e indirecta de RD2, las cuales, a pesar de sus efectos contrarios, buscan reducir la inhibición de las neuronas talamocorticales y posibilitar los movimientos comandados desde la corteza. Sin embargo, cuando se presenta una alteración en la suministración de DA estriatal, es decir, que ésta se proporcione en menores cantidades a las normales, la actividad de los núcleos eferentes aumenta, generando una mayor inhibición de las neuronas talamocorticales y tegmentales, dando como resultado, anomalías en la producción de movimientos, como los observados en enfermedades neurodegenerativas como la EP (DeLong, 2000).

III.1.2. Fisiopatología del sistema motor

El decaimiento funcional del sistema motor puede originarse a partir de afecciones musculares, uniones mioneurales, nervios periféricos o el SNC (Chusid, 1987). Para establecer una condición patológica, resulta fundamental basarse en la fenomenología de los movimientos. Los trastornos motrices poseen un origen neurológico y dependiendo de su modo de manifestación se les puede clasificar en dos grandes grupos: hipercinesias, cuando hay un exceso de movimientos; e hipocinesias cuando se observa una menor amplitud del movimiento. El primer tipo de trastorno se identifica por presentar discinesias (manifestaciones motoras no naturales) e hipotonía (deterioro del tono muscular). En contra parte, las hipocinesias se caracterizan por movimientos lentos (conocidos como bradicinesias) y acinesias (pérdida del movimiento) (Fahn, 2011).

La manifestación motriz depende de que las vías directa e indirecta que proceden del cuerpo estriado permanezcan en equilibrio, sin embargo, la alteración hiperactiva de la vía indirecta con respecto a la directa, genera trastornos hipocinéticos y la disminución de la actividad de la primera vía en comparación con la segunda, crea trastornos hiperkinéticos (DeLong, 2000).

En el SNC, las afecciones del sistema motor pueden desencadenarse por estados disfuncionales de los GB, la corteza y el tálamo (DeLong, 2000). La enfermedad de Parkinson (EP) es un ejemplo de un trastorno neurodegenerativo hipocinético que presenta gran relevancia en la actualidad. A nivel mundial, de 1990 a 2015, más de 6 millones de personas fueron diagnosticadas con esta enfermedad y se pronosticó que para el 2040 dicha cifra aumentaría a más de 12 millones de personas (Dorsey et al., 2018). Para el caso de México, el estudio realizado por Rodríguez-Violante et al. (2019) indicó que entre los años 2014-2017 en el país se presentaron 37.93 casos de personas con EP por cada 100,000 habitantes, con una incidencia de densidad de 9.48/100,000 personas por año. En personas mayores de 65 años, la prevalencia fue de 313.94/100,000 habitantes y a nivel de sexos, fue mayor en hombres que en mujeres, presentando los primeros una tasa de 42.22 contra una de 34.78/100,000 de las mujeres.

En la EP las neuronas dopaminérgicas que están localizadas principalmente en la SNC del mesencéfalo mueren, hay una despigmentación, gliosis (alteraciones en las células gliales) y se desarrollan cuerpos de Lewis que en conjunto producen cuadros sintomatológicos que

incluyen rigidez, temblores, lentitud de movimiento, inestabilidad de la postura corporal y dificultad para caminar y marchar. En estadios más avanzados, se observan además alteraciones en la función de la mano y hay más predisposición para caídas (Beitz, 2014; Opara et al., 2017).

En la EP, las mutaciones genéticas también son determinantes para la muerte neuronal. La proteína α -sinucleína, ubicada principalmente en las terminales presinápticas, sufre un cambio molecular, lo cual induce su agregación y genera los cuerpos de Lewis, inclusiones celulares insolubles características de la enfermedad (Beitz, 2014). Adicionalmente, la acumulación de dicha proteína mal plegada puede deberse y provoca una disfunción metabólica, alterando la fosforilación oxidativa, un sistema de flujo de electrones presente en la membrana interna mitocondrial que crea un gradiente electroquímico celular, el cual es implementado para la producción de energía (ATP), el control de los niveles moleculares de calcio (Ca^{2+}), especies reactivas de oxígeno, entre otros y la regularización de los eventos de apoptosis y diferenciación celular. Lo anterior crea una mayor sobreproducción y oligomerización (conversión de los monómeros a estados macromoleculares) de la α -sinucleína y en consecuencia se incita a la degeneración y la muerte neuronal (Jiménez, 2019).

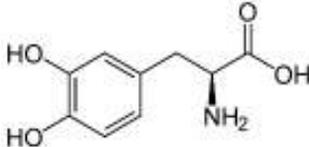
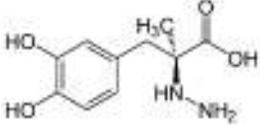
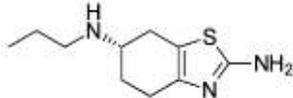
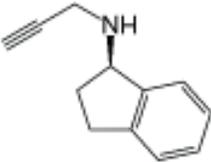
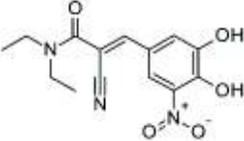
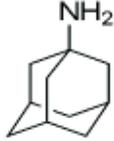
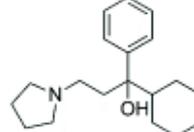
Hoy en día no se conoce la cura para la EP, pero existen diferentes tratamientos como el uso farmacológico de la levodopa, que se implementa para contrarrestar la falta de dopamina generada por la pérdida neuronal de la SN.

III.1.2.1. Levodopa como tratamiento para la enfermedad de Parkinson

Las alteraciones motoras en la EP pueden ser tratadas con inhibidores enzimáticos, fármacos anticolinérgicos, agonistas dopaminérgicos o L-3,4-dihidroxifenilalanina (levodopa) (Tabla I). Este último es el fármaco más implementado (Heumann et al., 2014; Reich & Savitt, 2019), comúnmente suministrado junto con Carbidopa (Co-careldopa, Tabla I), un inhibidor periférico que potencializa la eficiencia del tratamiento suprimiendo la actividad de la enzima DOPA descarboxilasa (metaboliza L-DOPA a 3,4-dihidroxifenilacétato, impidiendo el paso del fármaco a través de la BBH) (Lattera & Goldstein, 2000; Reich & Savitt, 2019). Esto indica que la actividad de esta enzima se genera por las células que forman la BBH. Sin embargo, el uso

prolongado de levodopa genera fluctuaciones motoras y discinesias a través de cambios anatómicos en el cuerpo estriado y en las vías estriatales directa e indirecta (Heumann et al., 2014).

Tabla I. Fármacos comunes para el tratamiento de la EP según la clase de medicamento.

CLASE DE FÁRMACO	EJEMPLO DE FÁRMACO	MOLECULA
Levodopa	Co-careldopa	Levodopa:  Carbidopa: 
Agonistas de dopamina	Pramipexol	
Inhibidores de Monoamino oxidasas B (MAO-B)	Rasagilina	
Inhibidores de catecol O-metiltransferasa (COMT)	Entacapona	
Amantadina	Amantadina	
Anticolinérgicos	Prociclidina	

Información tomada y modificada de <https://www.parkinsons.org.uk/> (fármacos); <https://wikipedia.org> (estructuras moleculares).

El cuerpo estriado es la zona más rica de receptores de DA de los GB y se ha demostrado que durante condiciones de poca DA los RD1 se estimulan de gran manera, lo que activa el complejo monofosfato de adenosina cíclico/Proteína quinasa A (AMPc/PKA) generando la fosforilación de sustratos de PKA (e.g., fosfoproteína neuronal regulada por dopamina y AMPc (DARPP-32)) e induciendo hipersensibilidad de los receptores. De igual manera, las discinesias ocurren bajo una condición de denervación estriatal notable e hipersensibilidad. Por ejemplo, el tratamiento prolongado de levodopa en animales denervados de DA, activa a la PKA y la fosforilación de DARPP-32 en las MSN de la vía directa, afectando cascadas de señalización intracelulares y activando la transcripción de genes (Heumann et al. 2014) (e.g., factor neurotrófico cerebral, una neurotrofina fundamental para el mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas de la SN (Mohammadi et al., 2018)).

La levodopa con Carbidopa es el tratamiento más común para contrarrestar las afecciones motoras de la EP, sin embargo, en un plazo que fluctúa de entre 40 semanas y 6.5 años, los cambios mencionados anteriormente en las vías de los GB se hacen más evidentes, las complicaciones motoras aumentan y se afecta tanto la calidad de vida de los pacientes como su economía, al necesitar dosis cada vez más altas del fármaco (Tran et al., 2018).

III.2. Biopolímeros

Con el fin de ofrecer una alternativa más sostenible y menos costosa, los investigadores han visto un fuerte potencial en el campo de los biopolímeros, los cuales son implementados en diversas áreas, incluida la medicina (Winkworth-Smith & Foster, 2013).

Los biopolímeros pertenecen a los grupos de macromoléculas encontradas en la naturaleza constituidos por decenas de cientos (o incluso cientos de miles) de cadenas lineales o ramificadas de moléculas de bajo peso molecular (monómeros). Suelen constituirse por monómeros de ácidos nucleicos, aminoácidos, o carbohidratos ordenados para crear estructuras primarias, secundarias y en ocasiones terciarias. También, éstos pueden conformarse por un conjunto de diferentes unidades monoméricas denominados heteropolímeros (George et al., 2020). Ejemplos de biopolímeros más comunes y abundantes en la naturaleza son la celulosa y

el almidón; la primera es el componente principal de las plantas, por lo que es considerada como prácticamente inagotable, está conformada por repeticiones monoméricas de D-glucosa y se caracteriza por poseer propiedades como biodegradabilidad, hidrofiliidad y gran habilidad para su modificación química (Klemm et al., 2005). Por su parte, el almidón se encuentra en plantas comestibles en gran cantidad y es una fuente de energía para los humanos; la estructura de esta macromolécula está compuesta por cientos a miles de unidades de D-glucosa orientadas en igual dirección (a diferencia de las de la celulosa que están a 180° sobre su eje columnar) (Shrestha y Halley, 2014) y expresa propiedades como agente de retención de agua, estabilizante, gelificante, entre otras (Ramírez et al., 2017).

El uso de los biopolímeros depende de varios aspectos que caracterizan su función: cantidad/calidad/tipo de solvente, propósito del polímero escogido (¿qué se desea lograr con él?), procedimiento que se siguió para obtener la estructura y su grado de acoplamiento con cualquier otro material con el que se desee trabajar (Winkworth-Smith y Foster, 2013). Hay una gran cantidad de biopolímeros de los cuales el hombre ha sacado provecho, otro ejemplo ampliamente utilizado hoy en día es el de la quitosana, el derivado central de la quitina, el segundo polisacárido más importante después de la celulosa (Singh et al., 2017).

III.2.1. Quitosana y sus derivados químicos

La Q es un copolímero, es decir, está conformado por dos o más monómeros no similares, en este caso, por unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina unidos por 1-O-4 enlaces glucosídicos (Wang et al., 2020). Naturalmente a la Q sólo se le puede encontrar en ciertos hongos de la familia Mucoraceae, pero su síntesis se puede lograr por medio de la N-desacetilación de la quitina (Fig. 4). La Q es un biopolímero biodegradable, no tóxico, biocompatible, con actividad hemostática y antimicrobiana. Su uso es amplio y se recomienda para aplicaciones clínicas para la generación de dispositivos de administración de fármacos (Singh et al., 2017).

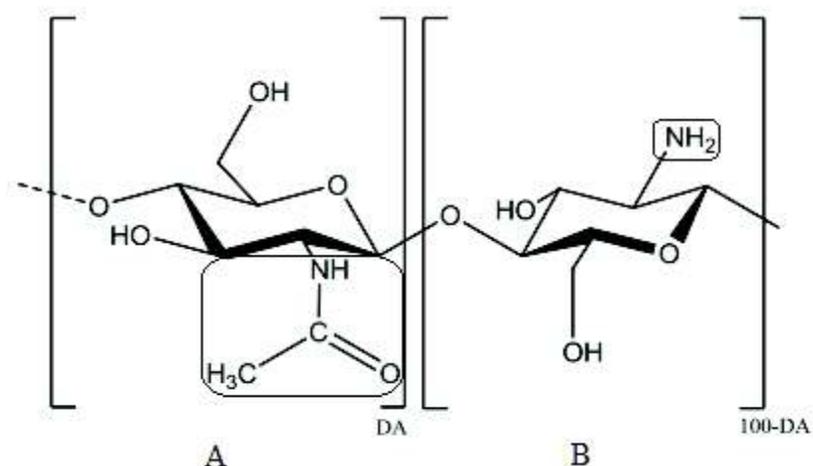


Figura 4. Estructura primaria de la quitina (A) y la Q (B). En la posición 2 de cada anillo se encuentran encerrados el grupo acetato amidado (A) y la amina desacetilada (B). Fuente: Pacheco (2010).

Existen derivados químicos de Q con distintos pesos moleculares, grados de desacetilación y patrones de derivatización molecular (Singh et al., 2017). Uno de los métodos más prominentes para elaborar derivados de Q es la química click, una reacción rápida y de rendimiento elevado en la que dos grupos funcionales interactúan exclusivamente el uno con el otro. Este tipo de reacciones se dan en un rango de temperatura de 25-37°C y con un pH de 4-12; permanecen inalteradas frente a condiciones de agua y oxígeno; responden muy bien a procedimientos sencillos de purificación debido a la selectividad de sus productos y se identifican por seguir los fundamentos de la química modular, mostrando un comportamiento similar al encontrado en la naturaleza (Argüelles-Monal et al., 2018).

Los derivados de Q obtenidos por química click han demostrado ser antimicrobianos y antifúngicos eficaces; y han exhibido propiedades como termosensibilidad, fotocromía, susceptibilidad a cambios de pH, solubilidad en químicos específicos, entre otros (Argüelles-Monal et al., 2018; Liu et al., 2017). A partir de esta última característica ha sido posible preparar principalmente copolímeros de Q a través de injertos moleculares (Argüelles-Monal et al., 2018), método en el que la Q por medio de sus dos grupos funcionales reactivos, el grupo amino y el hidroxilo (punto de inicio de la copolimerización por injerto) permite que moléculas de menor tamaño generen derivados tras unirse covalentemente a la columna de Q (Kumar et al., 2020). La Q modificada por este tipo de procedimiento ha mostrado mejor estabilidad,

solubilidad en agua y características bioactivas como antioxidantes (Kumar et al., 2020; Liu et al., 2017). Algunos ejemplos de productos por copolimerización de injerto son: poli(*N*-isopropilacrilamida), *N*-*u*-*O*-quitosana-*g*-poli(etilenglicol), quitosana-*g*-poli(*N*-vinilcaprolactama), entre otros (Argüelles-Monal et al., 2018; Fernández-Quiroz et al., 2015).

III.2.2. Caracterización de biopolímeros derivados de quitosana

La modificación estructural de la Q es una manera eficiente para obtener derivados con características químico-físicas en el biopolímero. Se puede modificar la solubilidad de la Q y pasar, de únicamente solubilizarse en medios ácidos ($\text{pH} \leq 5$) a generar una solución en agua ($\text{pH} = 7$), como lo ocurre cuando a la Q se le injerta *N*-vinilcaprolactama (Alves y Mano, 2008; Fernández-Quiroz et al., 2015). En este sentido, cuando se modifica la estructura de la Q, se confirman los cambios que se produjeron químicamente, a través de la caracterización analítica con espectroscopía de infrarrojo-transformada de Fourier (FT-IR), resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) o de carbono (RMN- ^{13}C) (Liu et al., 2017) (Tabla II), entre otros.

Tabla II. Ejemplos de biopolímeros con sus respectivas señales distintivas de acuerdo con los métodos de caracterización fisicoquímica: FT-IR, 1H-RMN y RMN-13C. cm^{-1} = Centímetros recíprocos. Ppm= Partes por millón.

BIOPOLÍMERO	FT-IR (cm^{-1})	1H-RMN (ppm)	RMN-13C (ppm)	FUENTES
<i>N</i> -ftaloil quitosana	Bandas fuertes en 1773 y 1712 por el C=O de la ftalimida; y a 720 del =C-H de cuatro H adyacentes.	Señal a 7.8 por los protones del anillo aromático.	Picos a 169 del C de los grupos carbonil imida y a 123, 131, 134 y 135 de los C del anillo aromático.	(Montiel-Herrera et al., 2015)
6-azido-6-deoxi- <i>N</i> -ftaloil quitosana	Banda en 2106 por el grupo N=N=N.	Señal a 7.8 por los protones del anillo aromático.	Pico a ~52 del C6; a 59 del C2; a 70,75 y 80 de los C3-5; a 98 del C1; a 123, 132 y 136 del grupo ftaloilo y a 170 del C=O de este último.	(Ifuku et al., 2011; Montiel-Herrera et al., 2015)
Hidroxipropil quitosana	Picos a 2970 y 1376 del C-H del grupo CH ₃ .	Señal en 0.99-1.02 por el CH ₃ del C9.	Pico a 68.9 por el carbono hidroxipropilado en C6.	(Shao et al., 2015; Wan et al., 2004)

III.2.2.1. Espectroscopía de infrarrojo-transformada de Fourier

La espectroscopía de infrarrojo-transformada de Fourier (FT-IR) es una herramienta utilizada para obtener información de las energías asociadas a grupos funcionales que conforman una o

varias moléculas. En este sentido, el análisis de dichas energías asociadas a la incorporación de sustancias en el esqueleto molecular en la Q puede derivar en la identificación de injertos químicos y reacciones químicas tipo click en quitosanas (Liu et al., 2017) como es el caso de la quitosana-g-poli(*N*-vinilcaprolactama) (Fernández-Quiroz et al., 2015) o derivados de *N*-furfural quitosana (Montiel-Herrera et al., 2015).

En el método se atraviesa una muestra con un dipolo inducido o permanente con radiación infrarroja electromagnética para conocer, en condiciones específicas de energía, qué fracción de radiación es absorbida (Kumirska et al., 2010). El fundamento radica en las vibraciones atómicas de las moléculas analizadas, cada pico del espectro final que se obtiene es la frecuencia vibracional de una sección de la molécula (Kumirska et al., 2010), por lo que se permite identificar los grupos funcionales que se encuentran acoplados en ella (Banihashem et al., 2020). Para reducir tiempo y volver al método más eficiente, el espectro resultante se convierte en frecuencia de número de onda por la transformada de Fourier, una operación matemática que determina el papel que desempeña cada frecuencia para crear la señal final (Smith, 2011).

Recientemente, Fernández et al. (2015) generó un derivado de Q que caracterización por FT-IR. En dicho espectro se identificaron una banda débil en 1653 cm^{-1} , característico del grupo carbonilo (C=O) de la amida I; una banda a 1578 cm^{-1} de la molécula -N-H de la amida II; una banda a 1417 cm^{-1} debida al grupo metileno (-CH₂) del compuesto; una banda a 1375 cm^{-1} por el grupo metil (-CH₃); una banda a 1320 cm^{-1} por el enlace C-N de la amida III; una banda fuerte a 1152 cm^{-1} por el grupo éter (C-O-C) y dos bandas, una a 1075 cm^{-1} y otra a 1030 cm^{-1} , correspondientes a los anillos piranosos de la Q. En contraparte, dentro del mismo trabajo, se caracterizó el derivado de Q Q-g-PVCL, siendo notable el comparativo del espectro de la Q pura, y la de su derivado, que presentó bandas más débiles, una en 1625 cm^{-1} y otra en 1520 cm^{-1} , sugiriendo la generación de nuevos enlaces entre el grupo carboxilo de la *N*-vinilcaprolactama y el grupo amina de la Q.

III.2.2.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) es un método de referencia útil para determinar las características estructurales y fisicoquímicas de compuestos orgánicos, como el grado de desacetilación de la Q (Kumirska et al., 2010). Esta técnica se fundamenta en la absorción física y emisión de radiación electromagnética (Rhodes, 2017), en los momentos magnéticos nucleares átomos que poseen campos magnéticos. Dichos momentos se relacionan con el momento angular de los mismos núcleos, llamado espín nuclear, el cual basa su valor en el número de giro. Aquellos núcleos con un número no par de protones y neutrones favorecen la práctica de la técnica, ya que poseen un giro nuclear y un momento magnético diferentes de cero; un ejemplo de ello es el ^1H , quien tiene un número de espín de $\frac{1}{2}$, es decir que puede tener dos orientaciones, una paralela y otra antiparalela al campo externo (Mlynárik, 2017). Por lo anterior, cuando la muestra a analizar recibe radiación que se encuentra usualmente entre 40-1000 MHz y dentro de la región de las radiofrecuencias (Rhodes, 2017), los núcleos la absorben y responden cambiando su estado de espín; posteriormente, los núcleos regresan a su estado original y emiten energía, cuya señal es registrada por un espectrofotómetro de RMN en una gráfica de frecuencias – intensidad (Mlynárik, 2017).

El espectro que se puede obtener de Q por ^1H -RMN, según Liu et al. (2017), muestra desplazamientos de energías alrededor de 2.9 ppm, 3.3-3.7 ppm, 4.4 ppm y una cerca de 1.8 ppm, correspondientes a las unidades de *N*-acetilglucosamina (Fig. 5). Por otra parte, Fernández et al. (2015), establece que las unidades de *N*-acetil de la Q se observan en desplazamientos energéticos a 1.92 ppm y 3.18 ppm y 4.85 ppm de los grupos *N*-glucosamina. En el mismo trabajo, el espectro del copolímero Q-g-PVCL, mostró las señales características de Q y las de vinilcaprolactama, por ejemplo, un multiplete entre 1.20 y 1.81 ppm correspondientes al 6H del grupo $-\text{CH}_2-$ del anillo de caprolactama y al 2H del $-\text{CH}_2-$ de la cadena principal del polímero; asimismo el copolímero no presentó el desplazamiento energético característico del grupo carboxilo a 10.20 ppm, que la vinilcaprolactama sí mostró.

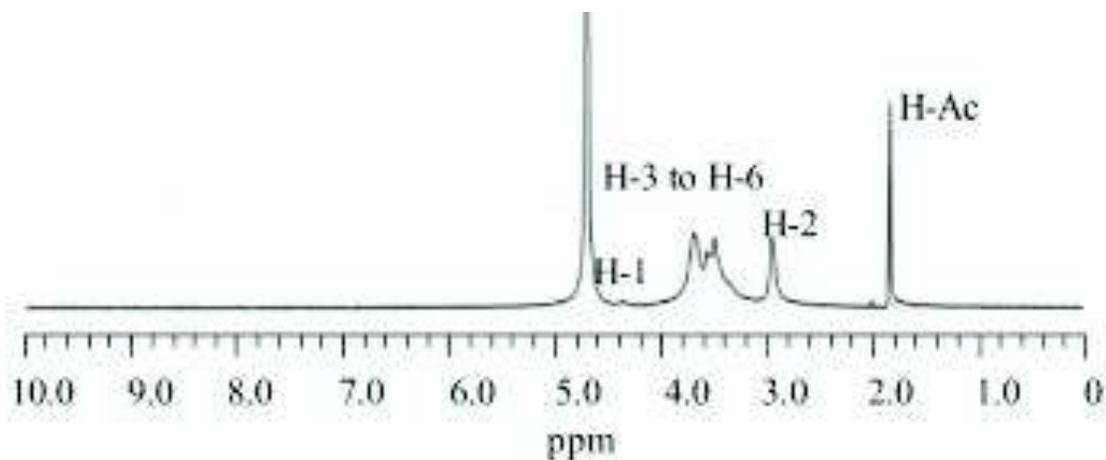


Figura 5. Espectro de 1H-RMN de Q exhibiendo desplazamientos de energías cerca de 2.9 ppm, 3.3-3.7 ppm, 4.4 ppm y alrededor de 1.8 ppm, correspondientes a las unidades de *N*-acetilglucosamina. Fuente: Liu et al. (2013).

Una vez que la caracterización fisicoquímica de los compuestos a estudiar es realizada, otra interrogante es la presentación en la que el biopolímero se proveerá para el análisis de sus posibles efectos a nivel sistémico, para ello las nanopartículas representan una gran opción.

III.2.2.3. Nanopartículas

Las nanopartículas pueden definirse como partículas coloidales sólidas que presentan tamaños entre 10 a 1000nm (Luque-Alcaraz et al., 2016). Las nanopartículas pueden ser poliméricas y usualmente abarcan a las nanoesferas y a las nanocápsulas; las primeras contienen una matriz sólida donde las moléculas pueden absorberse superficialmente o encapsularse dentro de ella. Las nanocápsulas funcionan como vesículas donde las sustancias son atrapadas en un núcleo líquido, ya sea de aceite o agua, que se encuentra encapsulado en una membrana sólida (Rao y Geckeler, 2011).

Actualmente las nanopartículas son consideradas una gran herramienta en el campo de la medicina por los beneficios que trae consigo su tamaño, ya que pueden pasar diferentes barreras biológicas, incluida la barrera hematoencefálica (Ali y Ahmed, 2018) y distribuirse fácilmente a través de los vasos sanguíneos del cerebro de animales como las ratas, ya que éstos

tienen un diámetro promedio de entre $<20 \mu\text{m}$ y $>50 \mu\text{m}$ (Zhang et al., 2014). Un ejemplo de lo anterior son las nanopartículas de Q, quienes presentan grandes propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y cierta especificidad debida a su carácter catiónico (Agnihotri et al., 2004).

III.2.3. Función de los derivados de quitosana en sistemas biológicos

La modificación químico-física de la Q le confiere características específicas como biocompatibilidad, no toxicidad, biodegradabilidad y una alta capacidad de absorción, lo cual soluciona ciertos problemas como la solubilidad en medios ácidos (El Knidri et al., 2018).

Ejemplos de campos de investigación que se han beneficiado por la modificación de la Q son la ingeniería de tejidos, la industria química, médica y farmacéutica (El Knidri et al., 2018). Esta última lo ha hecho con la síntesis de drogas de diferentes tipos: antiinflamatorias, cardiovasculares, antitumorales, antidiabéticas, hormonas, proteínas, aminoácidos, entre muchas otras, las cuales han sido adheridas o encapsuladas en sistemas de partículas de Q. Adicionalmente, las nanopartículas de Q y sus derivados han sido utilizadas como portadores de vacunas y de genes, creando una respuesta inductora de anticuerpos; un ejemplo de una vacuna que ha sido cargada en este sistema de nanopartículas es la de la influenza (Ahmed y Aljaeid, 2016).

Pasanphan et al., (2010) reportaron un efecto potenciador antioxidante por parte del ácido gálico hacia la Q debido a la transferencia de átomos de hidrógeno que realiza. Liu et al., (2017) reafirman lo anterior comunicando que el acoplamiento de fenoles a la Q provoca en el biopolímero un aumento de su capacidad antioxidante. A su vez, Zhao et al. (2019) cargaron nanopartículas de o-carboximetilquitosana con ácido gálico para su administración como tratamiento de la lesión por isquemia/reperfusión cerebral y concluyeron que el sistema le brinda mayor neuroprotección al fármaco disminuyendo su baja capacidad de absorción y rápida eliminación; por lo que consideran a las nanopartículas como un vehículo eficiente en la administración de ácido gálico cerebral y, como consecuencia, en el tratamiento de la enfermedad.

Otro ejemplo es el reportado por Fernández et al. (2015), quienes debido a que la quitosana-g-poli(*N*-vinilcaprolactama) es soluble en agua a bajas temperaturas y se disocia en fases al incrementar la temperatura, especulan una fuerte capacidad del biopolímero para utilizarse como un sistema de transporte controlado de fármacos. Lo anterior es respaldado por el trabajo de Rejinold et al. (2011), quienes acoplaron curcumina a nanopartículas del biopolímero antes mencionado y reportaron la posible eficacia del sistema para la administración de fármacos anticancerígenos, dado las propiedades de la curcumina para la activación de la apoptosis y el bloqueo de vías de proliferación celular.

De acuerdo con los antecedentes presentados, este trabajo sintetizará nanopartículas de un derivado de Q amidado con levodopa y marcado con SRB, como propuesta para estudiar sus efectos fisiológicos en un modelo murino con EP.

IV. JUSTIFICACIÓN

En la enfermedad de Parkinson, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra mueren progresivamente. Esto genera una concentración irregular de dopamina en el cerebro. Comúnmente, la levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina) se prescribe como un tratamiento farmacológico para atender a esta enfermedad. Sin embargo, el uso prolongado de levodopa puede generar irregularidades motoras en los pacientes. En este contexto, en este proyecto de investigación se elaborarán y caracterizarán químico-físicamente nanopartículas de un biomaterial derivado de quitosana amidado con levodopa y marcado con SRB, para analizar el efecto que tiene la administración de nanopartículas de Quitosana-Levodopa-Sulforrodamina(B) sobre las células de la sustancia negra mesencefálica en un modelo murino *in vitro*. Los resultados que se obtengan de este trabajo experimental podrían abrir nuevas brechas de investigación para estudiar y comprender la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.

V. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

Para el año 2040 se estima que habrán alrededor de 12 millones de personas con enfermedad de Parkinson que desarrollarán de manera progresiva e irreversible, temblores, discinesias, inestabilidad, rigidez en la postura, e inhabilitación cognoscitiva y conductual. En este sentido, es fundamental desarrollar nuevas estrategias de tratamiento preventivo y farmacológico. Por ello, este trabajo plantea si la elaboración de nanopartículas de Quitosana-Levodopa-Sulforrodamina(B) tienen la capacidad de atravesar las membranas celulares de la sustancia negra cerebral en un modelo murino *in vitro*, responsables de sintetizar la dopamina que modula el circuito motor cerebral. El conocimiento que se genere de este trabajo de investigación abrirá un nuevo paradigma investigación para estudiar y comprender la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.

VI. OBJETIVOS

VI.1. Objetivo General

Caracterizar químico-físicamente nanopartículas de Quitosana-Levodopa-Sulforrodamina(B) para evaluar sus efectos sobre las células de la sustancia negra en un modelo murino *in vitro*.

VI.2. Objetivos Específicos

1. Sintetizar a través de química click un derivado de quitosana unido covalentemente a levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina) y sulforrodamina B.
2. Elaborar nanopartículas de Quitosana-Levodopa-Sulforrodamina(B) y caracterizarlas a través de espectroscopía de infrarrojo-transformada de Fourier, resonancia magnética nuclear de protón y dispersión de luz dinámica.
3. Determinar *in vitro* la localización de las nanopartículas de Quitosana-Levodopa-Sulforrodamina(B) en cultivos celulares primarios de la sustancia negra del cerebro de rata.

VII. METODOLOGÍA

Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, la Declaración de Helsinki, y los principios éticos propuestos en documentos y guías pertinentes de la Administración de Drogas y Alimentos, asimismo por la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos.

VII.1 Síntesis de Quitosana-Levodopa-Sulforrodamina(B) (QLS)

Para este trabajo se utilizó Q de bajo peso molecular (Fluka). El resto de los reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (Merk). Para todos los experimentos se usó agua grado Milli-Q con una conductancia $2 \mu\text{S}/\text{cm}^2$. La Q presentó un peso molecular viscosimétrico promedio de 1.3×10^5 , estimado a 25°C de una solución 0.3 M de ácido acético/0.2 M de acetato de sodio

(Montiel-Herrera et al., 2015). Además, por 1H-RMN, se determinó el grado de N-acetilación de la Q.

La Q se disolvió (10 g/L) en ácido acético 0.3 M. A esta solución de Q se le agregó 1 mg de levodopa a 25°C y se dejó 24 h en oscuridad. La disolución de Quitosana-Levodopa (QL) se transfirió a una membrana de celulosa para purificarla por diálisis en agua grado Milli-Q por 36 h. Finalmente, la solución se liofilizó y el biomaterial liofilizado se evaluó por FT-IR en pastillas de KBr. Una vez confirmada la incorporación de levodopa en las cadenas de la Q por FT-IR y 1H-RMN (ver más adelante), se generó una disolución de Q (10 g/L) en ácido acético 0.3 M y se le agregó 1 mg (1.7 μ M) SRB (PM 558.666 g/mol) a 25°C y se dejó 24 h en oscuridad. Esta disolución de QL y sulforrodamina B (QLS) se transfirió a una membrana de celulosa para purificar el biomaterial por diálisis en agua grado Milli-Q por 36 h. De nueva cuenta, se confirmó la incorporación de la sulforrodamina B en las cadenas de QL por FT-IR y 1H-RMN. En particular, con este último procedimiento se analizaron los grados de N-sustitución en la Q y se determinó el rendimiento del procedimiento expresado en porcentaje.

VII.2 Caracterización Químico-Física de QLS

El biomaterial QLS se evaluó por técnicas de FT-IR y 1H-RMN para estudiar las características físicas y espectroscópicas del QLS sintetizado.

- FT-IR: el espectro de infrarrojo del biomaterial QLS se realizó en un espectrómetro Nicolet Protege (System 460 E.S.P) FT-IR Spectrometer (Madison WI, USA) en pastilla de KBr. Se corrieron >64 barridos acumulados con una resolución de 2 cm^{-1} (Fernández-Quiroz et al., 2019).
- 1H-RMN: los espectros de alta resolución en estado líquido 1H-RMN para el biomaterial QLS se realizó en un espectrómetro Varian Inova-600 Plus (599.7 MHz) equipado con una sonda criogénica de triple resonancia (HCN). La muestra se disolvió en óxido de deuterio/HCl 0.5 N. Todos los experimentos se realizaron a 25°C (Fernández-Quiroz et al., 2015).

VII.3 Preparación y Caracterización Física de Nanopartículas a partir de QLS

Para obtener las nanopartículas a partir biomaterial sintetizado, se elaboró una solución de QLS (10 g/L) en 0.3 M ácido acético y se llevó a cabo un entrecruzamiento ionotrópico con tripolifosfato de sodio (TTP) de acuerdo con el método planteado por (Calvo et al., 1997) con algunas modificaciones. Brevemente, a la solución de QLS colocada en agitación constante a 25°C se le agregaron gota-a-gota 140 μ L de una disolución de TPP en agua de grado MiliQ (2 mg/mL). Las nanopartículas (nQLS) se formaron de manera espontánea favorecida por agitación magnética moderada. La apariencia de las nQLS se analizó visualmente para identificar agregados (ligera turbidez) y solución polimérica simple.

- Dispersión dinámica de luz y ζ -potencial

Las mediciones de Dispersión dinámica de luz y ζ -potencial se realizaron al mismo tiempo en un Möbiu ζ (Wyatt Technologies), bajo temperaturas controladas. El sistema Möbiu ζ utilizó un láser de modo longitudinal único de 45 mW a 532 nm. Las mediciones se realizaron con un ángulo de dispersión de 163.5°. La muestra se sometió a un programa de calentamiento de 0.25°C min⁻¹, a cada temperatura, la muestra se mantuvo en equilibrio durante 40 min antes de las mediciones. La muestra se cargó en una cubeta de cuarzo de 45 μ L con un conjunto de electrodos. El registro y el análisis de datos se realizaron con el software DYNAMICS 7.8.0.26 (Wyatt Technology Corporation).

VII.4. Distribución sistémica *in vivo* de SRB

Para evaluar la distribución *in vivo* de la SRB se tomó un grupo de 6 ratas (3 machos y 3 hembras) de la cepa Wistar (posnatal 30) y se les inyectaron 500 μ L de una suspensión de SRB en 0.9% NaCl de manera intraperitoneal (Appaix et al., 2012) para monitorear el cambio

de color de patas, uñas, cola, encías y orina en una línea de tiempo de 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h.

VII.5. Cultivos Primarios de Células de la Sustancia Negra Mesencefálica de la Rata

Para realizar los cultivos celulares primarios se utilizaron ratas de la cepa Wistar posnatales P0-P21 y se usó como base el protocolo seguido por (Montiel-Herrera et al., 2006) con ligeras modificaciones. A los animales se les practicó la eutanasia inyectándoles pentobarbital sódico intraperitoneal (120 mg/kg) para después decapitarlos. Inmediatamente, a cada animal se le extrajo el cerebro con material de disección, se colectó la SN mesencefálica para colocarla en una caja Petri de plástico con solución Ringer fría (4-8°C). A continuación, dentro de una campana de flujo laminar (LABCONCO) previamente esterilizada y utilizando jeringas de insulina, en un tubo de 1.8 mL se cortaron trozos pequeños de SN para facilitar su disociación mecánica inmersos en 1 mL de medio Neurobasal (NB; Invitrogen). Utilizando una pipeta Pasteur, suavemente se disoció mecánicamente a través de succiones repetidas. La solución sedimentó (5 min) y se tomaron 300 µL de medio NB y se colocaron en la superficie de un cubreobjetos de vidrio (tratado con poli-L-ornitina) colocado dentro de una caja Petri de 35 mm estéril. Finalmente, se agregaron 2 mL de medio de cultivo NB-SFB de la siguiente composición: 8.9 mL de NB, 1 mL de suero fetal bovino (SFB), 100 µL de antibióticos (penicilina-estreptomicina). El cultivo celular se colocó en una incubadora (New Brunswick, Eppendorf Company, Galaxy 48S) a 37°C y 5% CO₂ en atmósfera húmeda. El medio de cultivo se cambió cada primer y tercer día, hasta su utilización para los experimentos.

VII.6. Localización de las nQLS en Cultivos Celulares Primarios de SN

Los cultivos primarios de células de la SN se presentaron ante una suspensión de nQLS para estudiar su interacción y posible introducción al soma y/o proyecciones celulares. Para ello, inicialmente el medio NB se sustituyó por 2 mL de solución artificial cerebroespinal (aCSF, en mM: 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄-H₂O, 10 C₆H₁₂O₆, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, a pH 7.3) con 100 µL nQLS (preparadas de una solución de 1% QLS en 0.3 M de ácido acético y 2mg TPP/1 mL H₂O MiliQ). La excitación óptica de la SRB unida covalentemente a la estructura de la Q sirvió para localizar a las nQLS, estimulándolas con una longitud de onda de 550 nm y colectando su emisión a 580 nm (Appaix et al., 2012). El monitoreo de las nQLS se analizó con microscopía de fluorescencia (Zeiss). Los datos fueron procesados e ilustrados con ImageJ-FIJI y el software Origin Pro 8.0.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Caracterización Químico-física de QLS

El biomaterial sintetizado se evaluó por FT-IR y ¹H-RMN para confirmar la incorporación de la levodopa y la SRB a las cadenas poliméricas de quitosana.

VIII.1.1. Espectroscopía FT-IR

El espectro de FT-IR obtenido de la QLS sintetizada se muestra en la Fig. 6. En éste se exponen las bandas características de la quitosana en 1648 cm⁻¹ (amida I, debido a la vibración de estiramiento de CO para amidas primarias alifáticas); 1569 cm⁻¹ (amida II, debido a la vibración

de deformación de -NH); 1319 cm^{-1} (amida III, debido a la vibración de deformación de C-N); 1150 cm^{-1} (debido a la vibración asimétrica de deformación del grupo éter C-O-C) y 1028 cm^{-1} (debido a la vibración de deformación de -OH en los anillos piranosos). Por otro lado, también se muestran las bandas características que modificó la incorporación de la levodopa y SRB en el espectro de la quitosana “Q-Levodopa” y Q-Levodopa-SRB”. En los espectros se identifican ligeros corrimientos en las bandas de la quitosana de 1648 a 1644 cm^{-1} (Fig. 6 QL) y 1640 cm^{-1} (Fig. 6 QLS) asociadas a las amidas I, y de 1569 a 1551 cm^{-1} para las amidas II para QL y QLS. Adicionalmente, es importante notar en los espectros de QL y QLS, un ligero corrimiento en la banda de 1418 a 1408 cm^{-1} característico de energías asociadas de grupos metilenos unidos a grupos funcionales que contienen azufre ($\text{CH}_2\text{-SO}_2$) o nitrógeno ($\text{CH}_2\text{-N-}$). Asimismo, nótese la banda 1744 cm^{-1} (debido a la vibración de deformación de C=O), 1257 cm^{-1} (debido a la vibración de deformación de la sustitución aromática) y 895 cm^{-1} (debido a la vibración de deformación del anillo aromático y del ácido carboxílico). Adicionalmente, en el espectro de “Q-Levodopa-SRB” se observan bandas características en 1250 cm^{-1} (debido a la vibración de deformación de la anilina), en 1200 cm^{-1} (debido a la vibración de deformación del éter aromático), 1151 cm^{-1} y 1062 cm^{-1} (debido a la vibración de deformación del éter cíclico), en 1027 cm^{-1} (debido a la vibración de deformación de la amina terciaria (R_3N)) y 944 cm^{-1} (debido a la vibración de deformación de C=S).

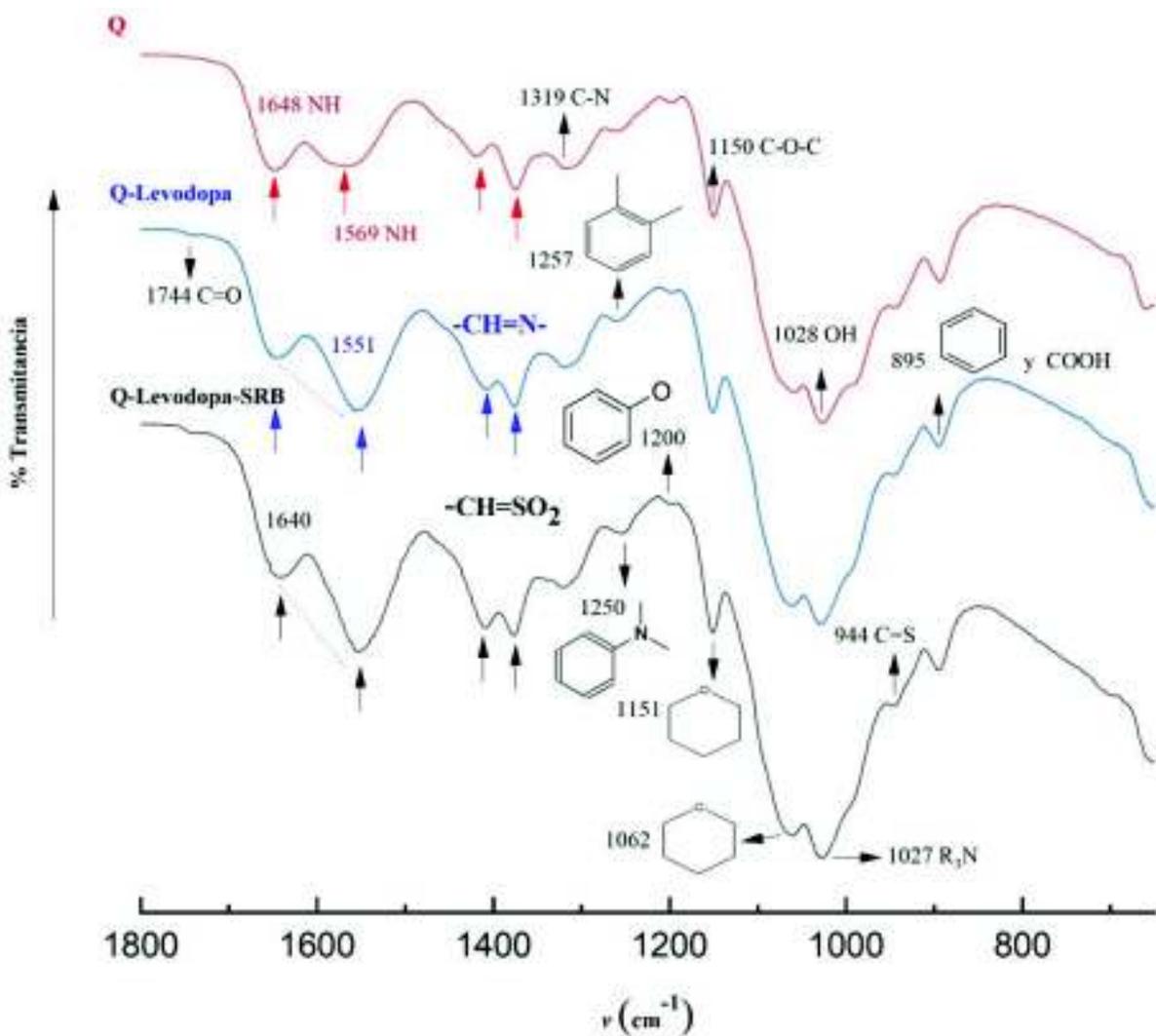


Figura 6. Espectros de FT-IR de Qitosana (Q, rojo) y Q-Levodopa (azul) comparados con el de Q-Levodopa-SRB (gris). Las energías asociadas a los grupos funcionales característicos de cada constituyente en el biomaterial se indican en cada flecha.

VIII.1.2. 1H-RMN

La caracterización por 1H-RMN de la Q-Levodopa y la Q-SRB-Levodopa arrojó espectros de resonancia magnética nuclear de 1H con desplazamientos químicos asociados a los esperados por los protones aromáticos de la levodopa y la SRB incorporadas a la estructura

macromolecular del biopolímero. En la Fig. 7 se muestra el espectro de la quitosana (A), la Q-Levodopa (B) y Q-Levodopa-SRB (C). A diferencia de los desplazamientos químicos esperados de protones glucopiranosos, de aminas primarias, metilos o carboxilos presentes en la quitosana (Argüelles et al., 2004), se aprecian desplazamientos químicos de protones *orto* aromáticos (7-8 ppm) simétricos presentes en las estructuras moleculares de la levodopa y de la SRB en 7.078, 7.99 y 8.1 ppm, y también los desplazamientos químicos de protones aromáticos adyacentes a un grupo carbonilo en 8.269 y 8.368 ppm. Todos estos desplazamientos químicos de protones están fuertemente influenciados por la electronegatividad de grupos carbonilos y también aquellos derivados de nitrógeno o azufre (Jacobsen, 2007). Estos espectros ¹H-RMN indican la unión de levodopa, o de levodopa y SRB en la quitosana.

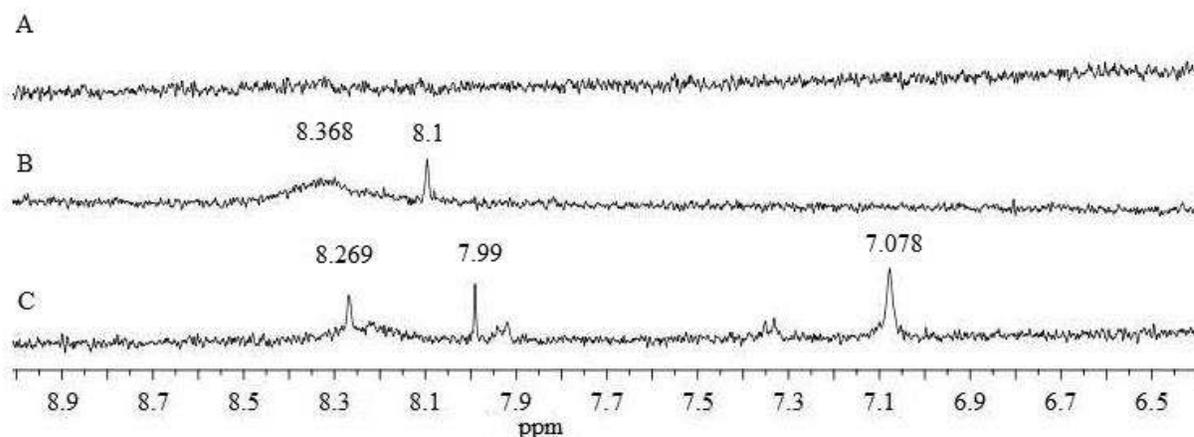


Figura 7. Espectros de ¹H-RMN de Quitosana (A), Q-Levodopa (B) y Q-Levodopa-SRB (C) con sus desplazamientos químicos característicos.

VIII.2. Características físicas de las nQLS

Las nQLS del biomaterial sintetizado se obtuvieron a partir de una solución compuesta de 100 μ L de QLS (10 g/L en 0.3 M de ácido acético) y 900 μ L de agua de grado MiliQ. Estos se

entrecruzaron (ionotrópicamente) con 140 μL TTP (2 mg/mL H_2O MiliQ) en agitación constante a 1200 rpm a 25°C por 10 min.

El aspecto físico de las nQLS se evaluó por medio de microscopía óptica (Fig. 8) y dispersión dinámica de luz (Fig. 9). Al microscopio, las nQLS se observaron de apariencia esférica y regular. Es importante señalar que en la Fig. 8 se muestran partículas de QLS de 0.3-2 μm de diámetro con la finalidad de ilustrar las características microscópicas del biomaterial. Sin embargo, la elaboración de las nQLS con TPP produjo un tamaño promedio de nQLS de 103 ± 8.5 nm de diámetro hidrodinámico. Nótese en la Fig. 9 que el tamaño de las nQLS presentó una distribución de nanopartículas monomodal polidispersa de 10-300 nm de diámetro hidrodinámico.

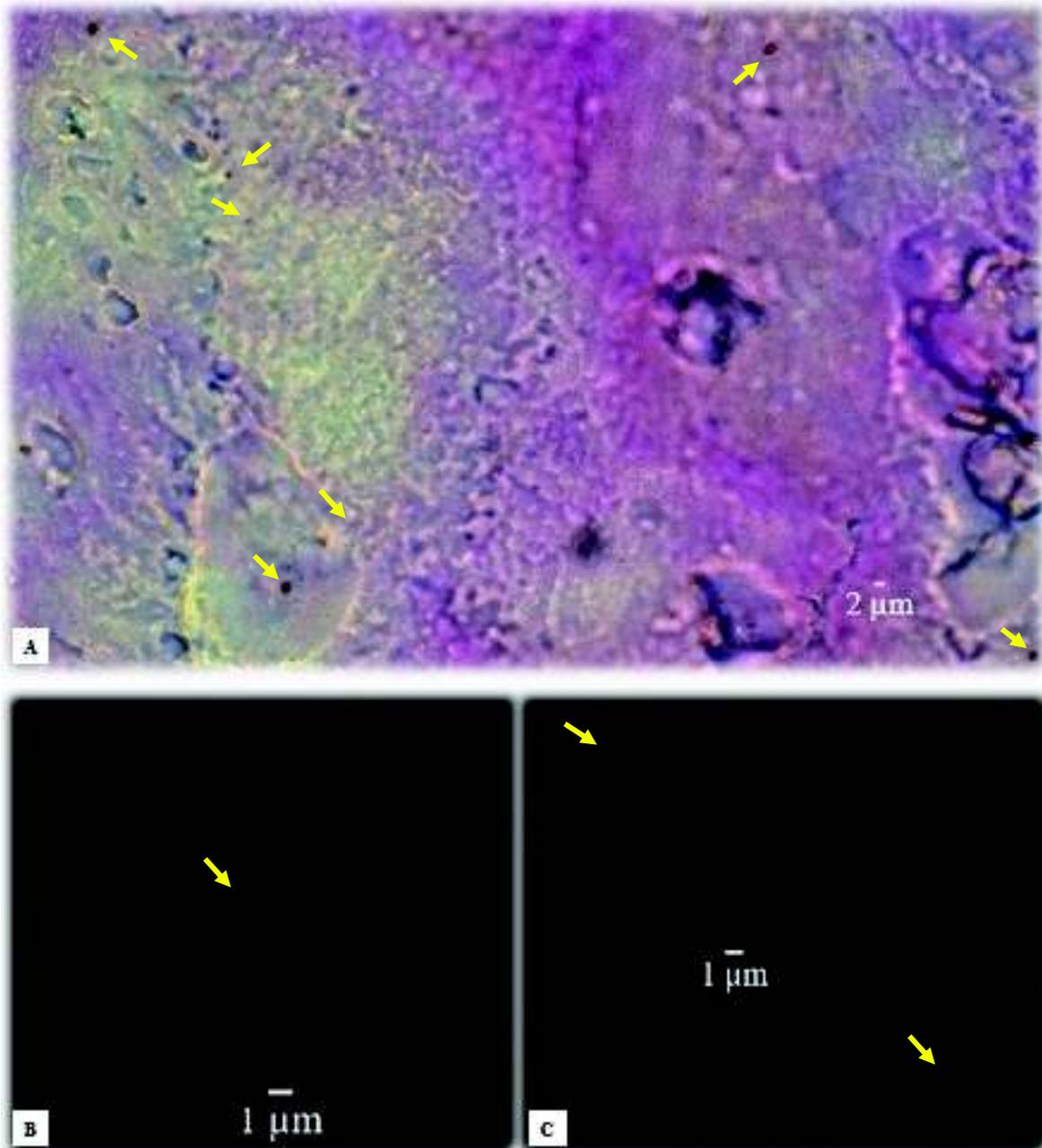


Fig. 8. Características físicas de las nQLS (flechas). Las fotografías se obtuvieron con un microscopio confocal invertido (Zeiss) en campo claro (A) y fotoestimuladas con un láser de argón (λ 550/580 nm para coleccionar la fluorescencia emitida por la SRB unida a la Quitosana (B y C).

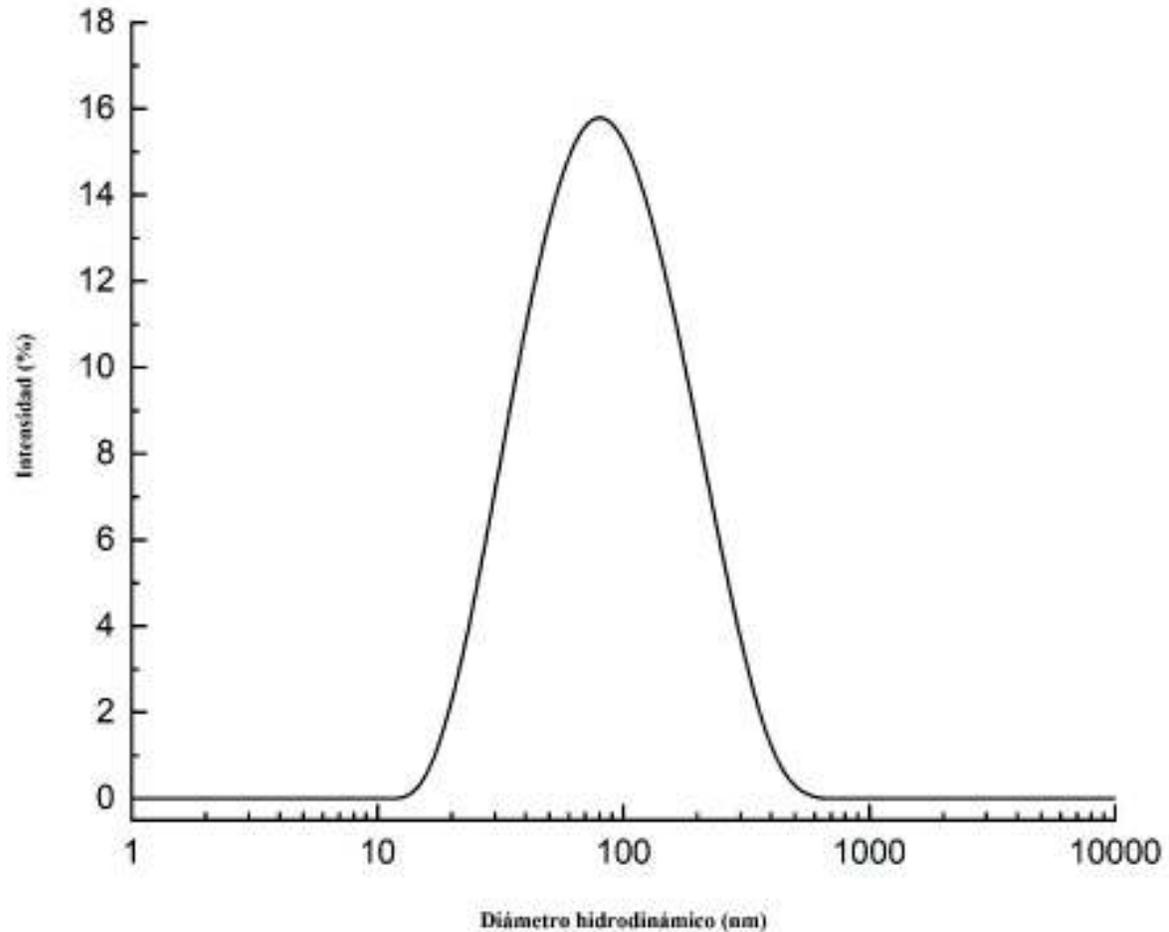


Fig. 9. Diámetro hidrodinámico de las nQLS sintetizadas determinado por dispersión dinámica de luz.

VIII.3. Distribución Sistémica In Vivo de SRB

La administración intraperitoneal de SRB se ensayó en 6 ratas Wistar (P15-P26) para determinar su distribución sistémica y su excreción renal (Appaix et al., 2012). A cada animal, se le inyectó una suspensión de 250 μ L de SRB (10 mg/mL) en NaCl al 0.9% y en un periodo de 1, 3 y 5 h, se monitoreó su distribución en cerebro, hígado, intestino delgado y grueso, orejas, patas/uñas,

retina, riñón y pulmón. Los resultados se observaron a simple vista en cada uno de los tiempos evaluados. La presencia de SRB fue notable en todos los tejidos mencionados, apreciándose un cambio de coloración a tonos rosados en la primera hora (Fig. 10), más ténues durante la tercera hora (Fig. 11) y casi imperceptibles a simple vista a la quinta hora pos-administrada (Fig. 12). Asimismo, se observó SRB en la orina de las ratas de coloración rosa intenso (Fig. 11D).

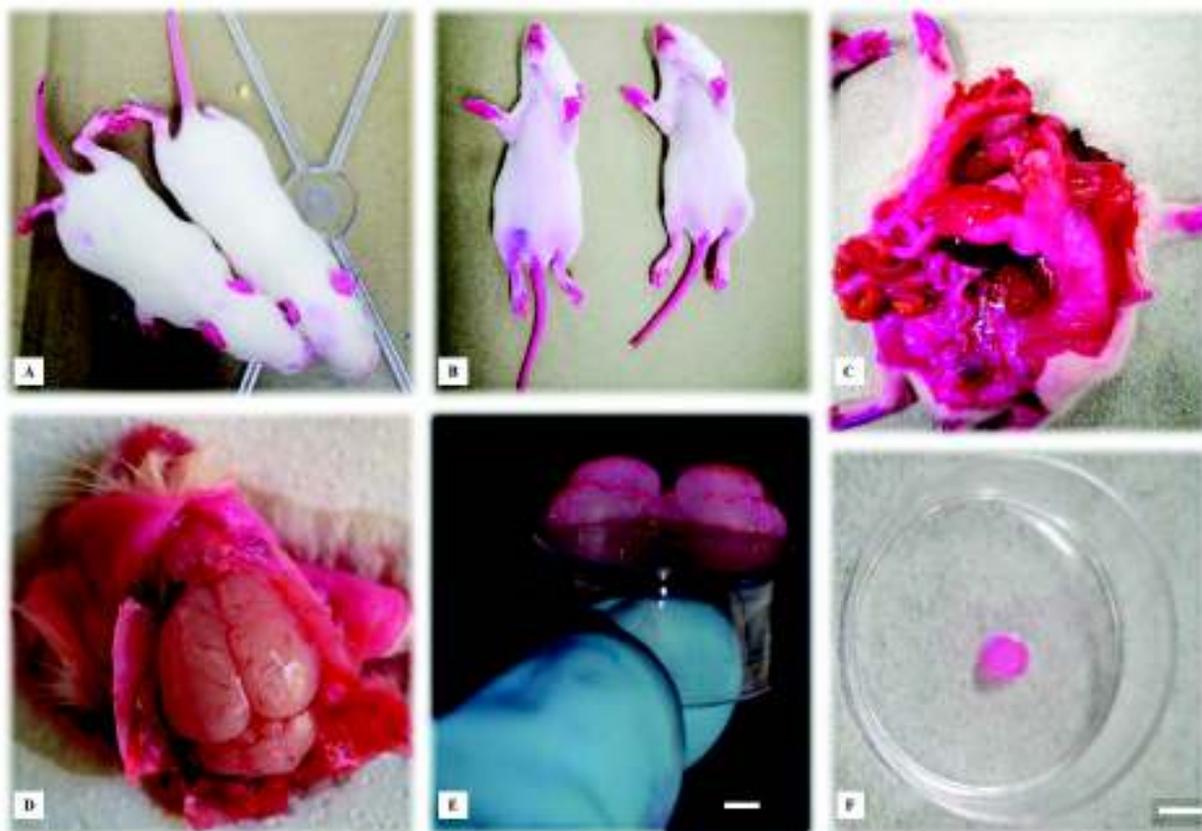


Figura 10. Distribución sistémica de SRB en ratas Wistar (P15-P26) después de 1 h de administrarse. A y B: patas/uñas y orejas; C: Pulmón, intestino delgado y grueso, hígado y riñón; D: cerebro y tejido subcutáneo; E: corte sagital de cerebro; F: globo ocular. En E y F, barra = 5 mm.

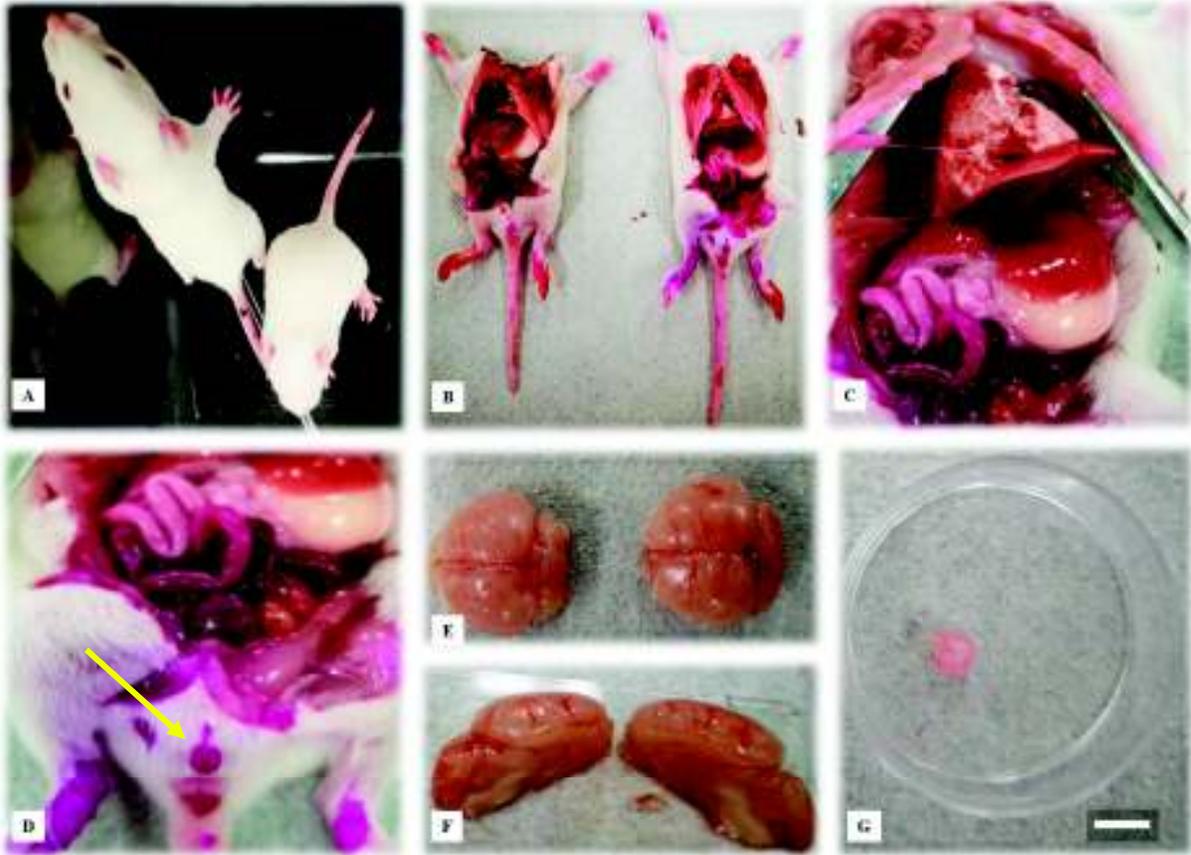


Figura 11. Distribución sistémica de SRB en ratas Wistar (P15-P26) después de 3 h de administrarse. A: patas/uñas y orejas; B y C: Pulmón, intestino delgado y grueso, hígado y riñón; D: orina color rosa intenso (flecha); E: cerebro en vista superior; F: corte sagital de cerebro; G: globo ocular. En G, barra = 5 mm.

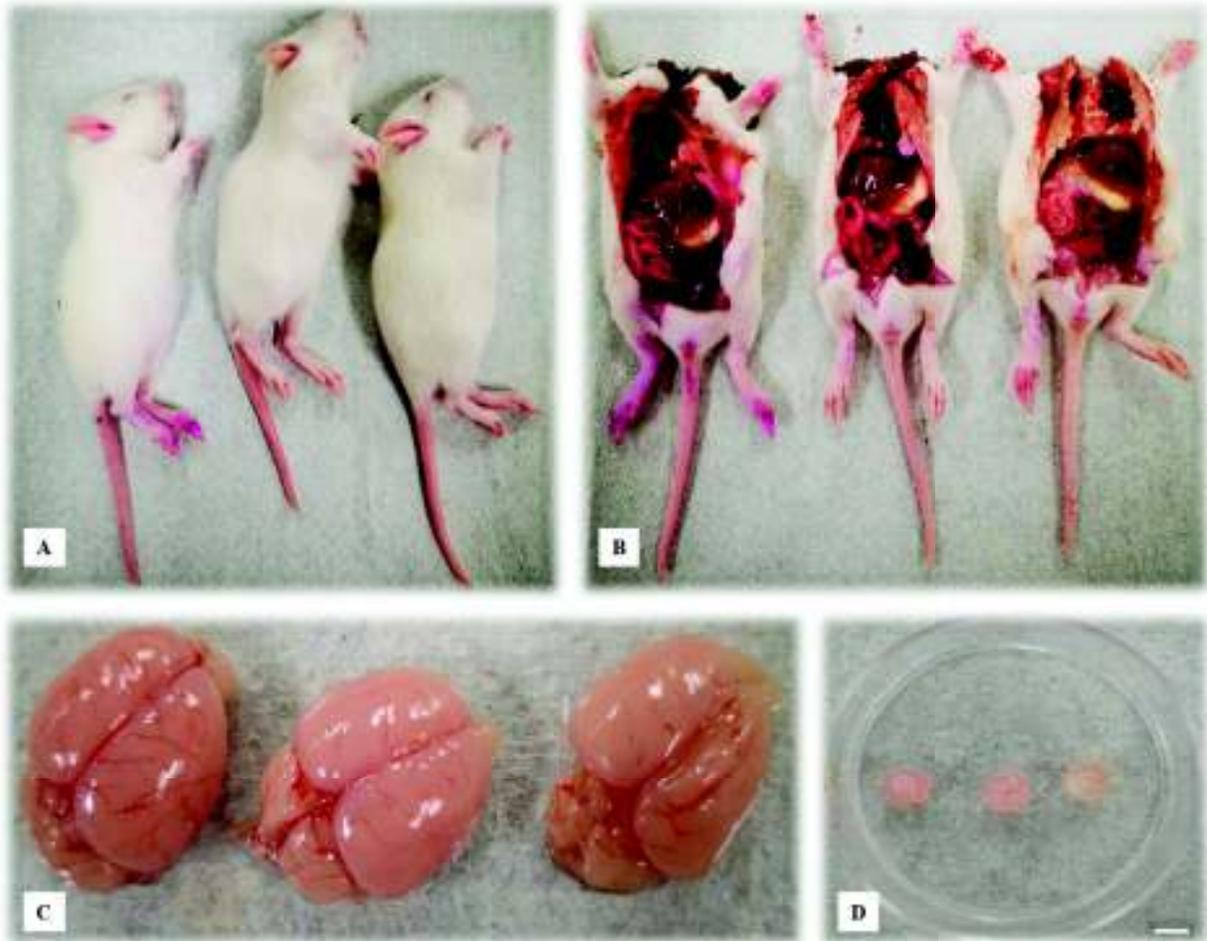


Figura 12. Distribución sistémica de SRB en ratas Wistar (P15-P26) después de 5 h de administrarse. A: patas/uñas y orejas; B: Pulmón, intestino delgado y grueso, hígado y riñón; C: cerebro; F: globo ocular. En D, barra = 5 mm.

VIII.4. Localización de nQLS en Cultivos Celulares Primarios de SN

La localización de las nQLS en los cultivos celulares primarios de SN de ratas de 3 días de edad se estudió tras la aplicación de una solución de 100 μL de nQLS en 900 μL de aCSF. Las nQLS se observaron al microscopio dispersas en el plato de cultivo celular. En la Fig. 13 se observa una célula en campo claro de uno de los cultivos celulares primarios de SN con nQLS a su

alrededor y próximas a su membrana celular. Asimismo, al estimular con un sistema de iluminación láser (550/580 nm) se observó que algunas nanopartículas posiblemente lograron internalizarse en algunas células. En la Fig. 14 se muestra un cultivo celular primario de SN en campo claro (A) que fue estimulado con 550/580 nm (B) para localizar a las nQLS. La incorporación de las nQLS en las células (Fig. 14C) se muestra con la superposición de las imágenes A y B. Nótese que solamente algunas células incorporaron a las nQLS (flechas).

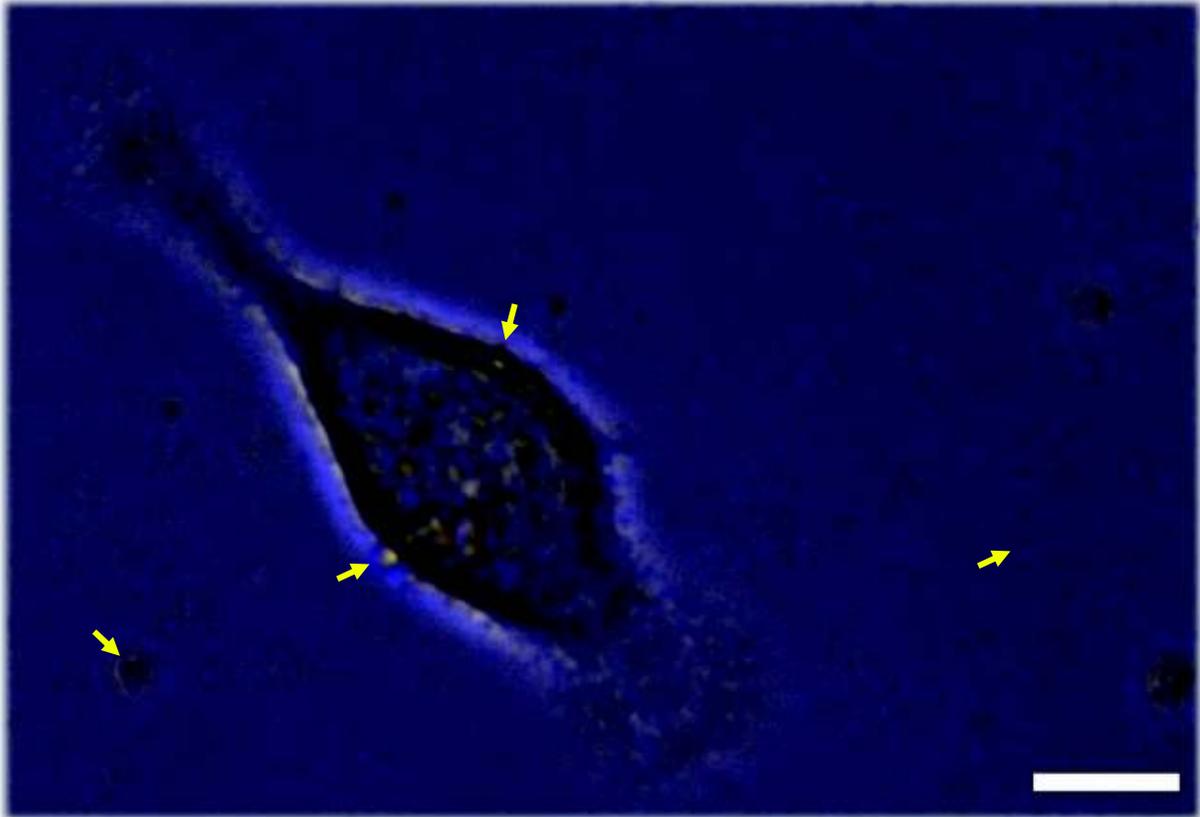


Figura 13. Localización de nQLS (flechas) en cultivos celulares primarios de SN (P3) en campo claro. Barra = 10 μm .

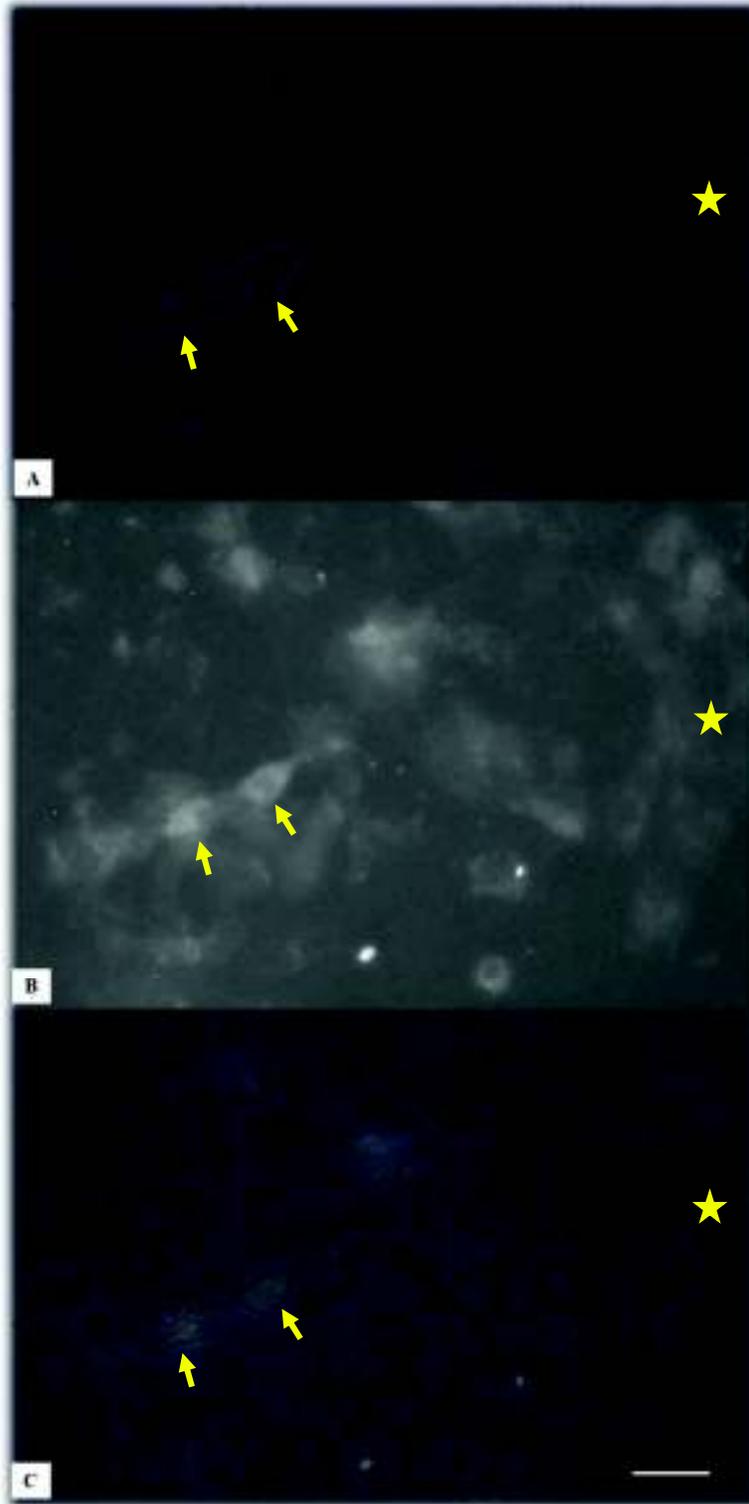


Figura 14. Localización de nQLS en cultivos celulares primarios de SN (P3). A, campo claro; B, mismo campo estimulado con $\lambda=550/580$ nm; C, imágenes superpuestas. Flechas: células cargadas con nQLS; Estrellas: célula sin nQLS. Barra = 25 μ m.

IX. DISCUSIÓN

La quitosana es un biopolímero utilizado ampliamente en campos de investigación como la medicina, la farmacéutica, la ingeniería de tejidos y la industria química (El Knidri et al., 2018). Una de las ventajas de la quitosana que se ha tratado de aprovechar por parte de dichas áreas, es la posibilidad de implementarla como transportador de fármacos a través de nanopartículas modificadas con la asociación a otras moléculas. Un ejemplo es la elaboración de nanopartículas sintetizadas a partir de O-carboximetilquitosana con ácido gálico para tratar la lesión por isquemia/reperfusión cerebral (Zhao et al., 2019). Para el caso de las enfermedades neurodegenerativas, las nanopartículas han sido un blanco prometedor para el diagnóstico y creación de posibles tratamientos. Por ejemplo, las nanopartículas metálicas se han utilizado para la detección *in vitro* de las proteínas β -amiloide y α -sinocleína, macromoléculas características de la enfermedad de Alzheimer y la EP, respectivamente. Asimismo, dichas nanopartículas se han implementado para manipular *in vitro* la agregación de la β -amiloide con el fin de reducir su toxicidad (Vio et al., 2017). Las nanopartículas de oro y sílice son nanopartículas metálicas, las primeras cargadas negativamente son reconocidas por prevenir la fibrilación de la proteína β -amiloide, y las de sílice cargadas positivamente, inhiben la fibrilación de la α -sinocleína y los niveles de proteínas del sistema ubiquitina-proteasoma (Pichla et al., 2020). Sin embargo, a pesar de los beneficios que ha traído consigo el uso de nanopartículas metálicas, hay evidencia que sugiere que este tipo de nanoestructuras puede contribuir igualmente a la fibrilación proteica, es decir, desencadenar efectos tóxicos en un sistema biológico asociados al tamaño de las nanopartículas, su recubrimiento, la concentración y la carga superficial (Alvarez et al., 2013; Taebnia et al., 2015; Win-Shwe y Fujimaki, 2011).

Por otra parte, las nanopartículas pueden ser elaboradas a partir de poliacetatos, polisacáridos o copolímeros (Wilson et al., 2011). En el caso de estos últimos, la quitosana al ser un polímero natural bioamigable (biocompatible y biodegradable) que muestra actividad hemostática y antimicrobiana (Singh et al., 2017), es utilizada frecuentemente como una alternativa para elaborar materiales para el tratamiento de enfermedades del SNC (Manek et al.,

2020; Wilson et al., 2011). Lo anterior se ha explotado igualmente como material para la fabricación de nanopartículas que funjan como alternativa de tratamiento para trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson; en el primer caso, se ha demostrado obtener mayores resultados en la mejora de los síntomas de la enfermedad con las nanopartículas a base de quitosana que implementando únicamente la parte farmacológica. Asimismo, se ha visto que la combinación de ambos tipos de tratamientos genera otras ventajas como dosis efectivas más bajas, mayor efecto antioxidante, incremento de la vida media del bioactivo, entre otros (Manek et al., 2020). Para tratar los síntomas motores de la EP generalmente se utiliza alguna estrategia de la terapia de reemplazo de dopamina, donde se suelen utilizar agonistas de la molécula, inhibidores enzimáticos, entre otros (Ferrazzoli et al., 2016). Comúnmente se prescribe el precursor de la dopamina, la levodopa junto con carbidopa (Reich & Savitt, 2019).

Es interesante mencionar, que se han fabricado nanopartículas de quitosana acopladas con dopamina de 110 ± 3 nm de radio hidrodinámico para ser consideradas como vehículos activos de dopamina al cerebro (De Giglio et al., 2011), dado que la administración de dopamina exógena se encuentra limitada por su escasa penetración a través de la BBH causada por su estado hidrosoluble (Ferrazzoli et al., 2016). Asimismo, recientemente se elaboraron nanopartículas híbridas de lecitina-quitosana acopladas con piribedil (agonista dopaminérgico de la familia de receptores D2 y D3) de 147 nm para administrar vía nasal el fármaco al cerebro, encontrando que las nanoestructuras aumentaron significativamente la captación directa de piribedil hacia el cerebro (Uppuluri et al., 2021). En este sentido, tomando en cuenta la eficiencia que pueden lograr las nanopartículas de quitosana como vehículos acarreadores de fármacos hacia el cerebro, en este trabajo se diseñaron, sintetizaron y elaboraron nanopartículas de quitosana acopladas con levodopa y SRB como alternativa potencial para el tratamiento de la EP.

La caracterización del nuevo biomaterial a base de quitosana, QLS, indicó que los corrimientos encontrados en el espectro de FT-IR, confirmaron que la levodopa y la SRB fueron incorporadas a la cadena del polímero. La banda correspondiente al grupo funcional de las amidas I suele localizarse entre $1640\sim 1560\text{ cm}^{-1}$ y la de las amidas II en $1580\sim 1490\text{ cm}^{-1}$ (Rojo, 2000). La quitosana genera una señal de amidas I en 1648 cm^{-1} y de amidas II en 1569 cm^{-1} , tras adicionar levodopa y SRB en la estructura de la quitosana, dichas señales sufrieron un ligero

corrimiento hacia 1644 cm^{-1} (QL) y 1640 cm^{-1} (QLS) en el primer caso, y otro hacia 1551 cm^{-1} para el caso de las amidas II. Lo anterior sugiere que en dichos sitios la levodopa y la SRB se unieron covalentemente al polímero. De igual manera, el corrimiento de 1418 cm^{-1} a 1408 cm^{-1} , propio de energías asociadas a grupos metilenos enlazados con grupos funcionales con azufre ($\text{CH}_2\text{-SO}_2$) o nitrógeno ($\text{CH}_2\text{-N-}$) (Rojo, 2000), probaron la unión de los tres compuestos.

Adicionalmente, la quitosana no posee grupos aromáticos en su estructura, y a través de $^1\text{H-RMN}$, se encontraron desplazamientos químicos debidos a protones aromáticos en QL y QSL. La quitosana no muestra ningún desplazamiento químico después de las 6 ppm (Montiel-Herrera et al., 2015). Sin embargo, los protones de grupos aromáticos suelen localizarse entre las 7 y 8 ppm, y en algunos casos entre las 8 y 9 ppm (dependiendo del ambiente químico) (Fig. 7, B y C).

El análisis físico de las nQLS mostró que éstas presentaron un tamaño promedio de $103 \pm 8.5\text{ nm}$ de diámetro hidrodinámico, el cual pudiera resultar óptimo para atravesar diferentes barreras biológicas, incluida la BBH y los vasos sanguíneos cerebrales de mamíferos (e.g., ratas) que presentan diámetros promedios entre $5\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$ y mayores a $50\text{ }\mu\text{m}$, en el caso de los micro y macrovasos respectivamente (Ali & Ahmed, 2018; Zhang et al., 2014). De igual manera, diversos autores han confirmado que partículas con tamaños inferiores a 200 nm tienen más posibilidades de atravesar la BBH (Betzer et al., 2017; Ceña & Játiva, 2018; Ohta et al., 2020). Un ejemplo de esto último es el trabajo de Betzer et al. (2017), donde estudiaron el efecto de diferentes tamaños (20 , 50 y 70 nm) de nanopartículas de oro acopladas con insulina sobre la BBH y llegaron a la conclusión de que las estructuras de 20 nm , además de atravesar la BBH, lograron obtener una mejor biodistribución y acumulación del fármaco en el cerebro. En este sentido, lo anterior podría sugerir que las nQLS tendrían que elaborarse de diversos tamaños para evaluar la influencia de este factor sobre su posible internalización hacia el cerebro.

Adicionalmente, diversas sustancias de bajo peso molecular solvatadas en agua o lípidos, así como los gases, pueden atravesar la BBH. Por ejemplo, algunos gases como el oxígeno, nitrógeno y el dióxido de carbono, y sustancias como el dimetilfumurato, que es utilizado para tratar la esclerosis múltiple; la isoniazida, la pirazinamida y el linezolid, implementados en el tratamiento de infecciones del SNC (Dotiwala et al., 2021).

Finalmente, la solución de nQLS que se adicionó a los cultivos celulares primarios de la SN se distribuyó en el citoplasma, lo cual podría sugerirse que la levodopa puede estar

biodisponible para que las células la transformen en dopamina, y potencialmente la incorporen a vesículas de transporte celular. Como respaldo a este trabajo, anteriormente ya se han realizado estudios con otros materiales que han logrado incorporarse a los sistemas celulares, un ejemplo de ello son los nanotubos de óxido de titanio, los cuales se han elaborado para evaluar la relación causal entre la inhalación de nanopartículas y la enfermedad cardiovascular, encontrando que los nanotubos se absorben en la membrana de células epiteliales logrando alterar su estructura molecular (Urbančič et al., 2018). Otro ejemplo es el trabajo que se realizó para comprender la interacción entre nanopartículas de polimetilmetacrilato y policloruro de vinilo sobre una línea celular de fibroblastos de riñón de hámster sano, donde se encontró que las nanopartículas se internalizan en las células por medio de endocitosis e inducen una reducción de la viabilidad celular al disminuir la disponibilidad de ATP y generar especies reactivas de oxígeno (Mahadevan y Valiyaveetil, 2021).

En corolario, la internalización de las nQLS por las células de los cultivos de SN mesencefálica sugiere que las nanopartículas tienen el potencial de atravesar diferentes barreras biológicas, lo cual faltaría evaluarlo en posteriores investigaciones para aprovechar los beneficios del transporte de fármacos por parte de la quitosana hacia el cerebro y lograr obtener nuevas oportunidades de tratamiento para enfermedades neurodegenerativas como la EP.

X. CONCLUSIÓN

Este trabajo describe un procedimiento sencillo y ecoamigable para preparar un nuevo biomaterial a base de quitosana amidada con levodopa y sulforrodamina B vía química click. La caracterización químico-física del biomaterial, a través de FT-IR y ¹H-RMN, corroboró la incorporación de levodopa y sulforrodamina B en la cadena polimérica de la quitosana. Asimismo, el trabajo muestra la elaboración de nanopartículas de QLS de 103 ± 8.5 nm de diámetro hidrodinámico, sugerente del potencial del material para estudiar su funcionalización en sistemas biológicos *in vivo* en modelos neurodegenerativos como la EP.

XI. LITERATURA CITADA

- Abbott, N. J., A. Patabendige, D. Dolman, S. Yusof y D. Begley. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1): 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Agnihotri, S. A., N. Mallikarjuna y T. Aminabhavi. 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 100(1): 5-28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.010>
- Ahmed, T. A. y B. Aljaeid. 2016. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy* 10: 483-507. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S99651>
- Ali, A. y S. Ahmed. 2018. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 109: 273-286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>
- Alvarez, Y. D., J. Fauerbach, J. Pellegrotti, T. Jovin, E. Jares-Erijman y F. Stefani. 2013. Influence of gold nanoparticles on the kinetics of α -synuclein aggregation. *Nano Letters* 13(12): 6156-6163. <https://doi.org/10.1021/nl403490e>
- Alves, N. M. y J. Mano. 2008. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 43(5): 401-414. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.09.007>
- Amaral, D. 2013. The Neural Basis of Cognition, 356-369 p. En: *Principles of Neural Science*. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Appaix, F., S. Girod, S. Boisseau, J. Römer, J. Vial, M. Albrieux, M. Maurin, A. Depaulis, I. Guillemain y B. van der. Sanden. 2012. Specific In Vivo Staining of Astrocytes in the Whole Brain after Intravenous Injection of Sulforhodamine Dyes. *PLOS ONE* 7(4): e35169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035169>
- Argüelles, W., A. Heras, N. Acosta, G. Galed, A. Gallardo, B. Miralles, C. Peniche y J. San Román. 2004. Caracterización de Quitina y Quitosano. En: Pastor, A. (Ed), *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*. Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Argüelles-Monal, W. M., J. Lizardi-Mendoza, D. Fernández-Quiroz, M. Recillas-Mota y M. Montiel-Herrera. 2018. Chitosan Derivatives: Introducing New Functionalities with a Controlled Molecular Architecture for Innovative Materials. *Polymers* 10(3). <https://doi.org/10.3390/polym10030342>
- Audesirk, T., G. Audesirk y B. Byers. 2008. *Biología: La vida en la Tierra*. Pearson Educación.
- Avila-Luna, A., y A. Bueno-Nava. 2014. Los ganglios basales: La participación dopaminérgica estriatal. *Investigación en Discapacidad* 3(1): 19-24.
- Banihashem, S., M. Nezhati y H. Panahi. 2020. Synthesis of chitosan-grafted-poly(N-vinylcaprolactam) coated on the thiolated gold nanoparticles surface for controlled release

- of cisplatin. Carbohydrate Polymers 227: 115333. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115333>
- Beitz, J. M. 2014. Parkinson's disease: A review. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 6: 65-74. <https://doi.org/10.2741/s415>
- Betzer, O., M. Shilo, R. Opochninsky, E. Barnoy, M. Motiei, E. Okun, G. Yadid y R. Popovtzer. 2017. The effect of nanoparticle size on the ability to cross the blood-brain barrier: An in vivo study. *Nanomedicine* 12(13): 1533-1546. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0022>
- Calvo, P., C. Remuñán-López, J. Vila-Jato y M. Alonso. 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science* 63(1): 125-132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4)
- Camacho, J. A. y V. Campos. 2020. The phenomenology of pain in Parkinson's disease. *The Korean Journal of Pain* 33(1): 90-96. <https://doi.org/10.3344/kjp.2020.33.1.90>
- Ceña, V. y P. Játiva. 2018. Nanoparticle crossing of blood-brain barrier: A road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Nanomedicine* 13(13): 1513-1516. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0139>
- Chusid, J. 1987. *Neuroanatomía Correlativa y Neurología Funcional*. El Manual Moderno, S.A. de C.V.
- Daneman, R. 2012. The blood-brain barrier in health and disease. *Annals of Neurology* 72(5): 648-672. <https://doi.org/10.1002/ana.23648>
- Daneman, R. y A. Prat. 2015. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(1): a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- De Giglio, E., A. Trapani, D. Cafagna, L. Sabbatini y S. Cometa. 2011. Dopamine-loaded chitosan nanoparticles: Formulation and analytical characterization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400(7): 1997-2002. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4962-y>
- DeLong, M. 2000. Los ganglios basales. 853-867 p. En: *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill, Interamericana.
- Dorsey, E. R., T. Sherer, M. Okun y B. Bloem. 2018. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *Journal of Parkinson's Disease* 8(Suppl 1): S3-S8. <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>
- Dotiwala, A. K., C. McCausland y N. Samra. 2021. *Anatomy, Head and Neck, Blood Brain Barrier*. En: *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519556/>
- Drake, R., A. Wayne y A. Mitchell. 2015. *Gray. Anatomía para estudiantes*. ELSEVIER.
- El Knidri, H., R. Belaabed, A. Addaou, A. Laajeb y A. Lahsini. 2018. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 120(Pt A): 1181-1189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>
- Escobar, A. y B. González. 2008. Barrera hematoencefálica. *Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo*. *Revista Mexicana de Neurociencia* 9(5): 395-405.
- Escobar, B., J. Pimienta y H. Téllez. 2006. Sistema Motor. 333-338 p. En: *Sistema nervioso*. Universidad del Valle. https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=yiHHCZmekJsC&oi=fnd&pg=PA333&dq=Sistema+nervioso&ots=kwJKAHOXjM&sig=jjIDOgbwm0X0KrMBZ-QfDVkzRtg&redir_esc=y#v=onepage&q=Sistema%20nervioso&f=false
- Escobar, M. I. y H. Pimienta. 2019. *Sistema nervioso: Neuroanatomía funcional y clínica*. Programa Editorial UNIVALLE.

- Fahn, S. 2011. Classification of movement disorders. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 26(6): 947-957. <https://doi.org/10.1002/mds.23759>
- Fernández-Quiroz, D., Á. González-Gómez, J. Lizardi-Mendoza, B. Vázquez-Lasa, F. Goycoolea, J. San Román y W. Argüelles-Monal. 2015. Effect of the molecular architecture on the thermosensitive properties of chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam). *Carbohydrate Polymers* 134: 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.069>
- Fernández-Quiroz, D., J. Loya-Duarte, E. Silva-Campa, W. Argüelles-Monal, A. Sarabia-Sainz, A. Lucero-Acuña, T. del Castillo-Castro, J. San Román, J. Lizardi-Mendoza, A. Burgara-Estrella, B. Castaneda, D. Soto-Puebla y M. Pedroza-Montero. 2019. Temperature stimuli-responsive nanoparticles from chitosan-graft-poly(N-vinylcaprolactam) as a drug delivery system. *Journal of Applied Polymer Science* 136(32): 47831. <https://doi.org/10.1002/app.47831>
- Ferrazzoli, D., A. Carter, F. Ustun, G. Palamara, P. Ortelli, R. Maestri, M. Yücel, M. y G. Frazzitta. 2016. Dopamine Replacement Therapy, Learning and Reward Prediction in Parkinson's Disease: Implications for Rehabilitation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10: 121. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00121>
- GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators. 2018. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Neurology* 17(11): 939-953. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3)
- George, A., M. Sanjay, R. Srisuk, J. Parameswaranpillai y S. Siengchin. 2020. A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. *International Journal of Biological Macromolecules* 154: 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120>
- Harder, D. R., C. Zhang y D. Gebremedhin. 2002. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 17: 27-31. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2002.17.1.27>
- Hayes, M. T. 2019. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *The American Journal of Medicine* 132(7): 802-807. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001>
- Hayhow, B., I. Hassan, J. Looi, F. Gaillard, D. Velakoulis y M. Walterfang. 2013. The Neuropsychiatry of Hyperkinetic Movement Disorders: Insights from Neuroimaging into the Neural Circuit Bases of Dysfunction. *Tremor and other hyperkinetic movements* 3. <https://doi.org/10.7916/D8SN07PK>
- Hernando, S., E. Herran, J. Figueiro-Silva, J. Pedraz, M. Igartua, E. Carro y R. Hernandez. 2018. Intranasal Administration of TAT-Conjugated Lipid Nanocarriers Loading GDNF for Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology* 55(1): 145-155. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0728-7>
- Heumann, R., R. Moratalla, M. Herrero, K. Chakrabarty, R. Drucker-Colín, J. Garcia-Montes, N. Simola y M. Morelli. 2014. Dyskinesia in Parkinson's disease: Mechanisms and current non-pharmacological interventions. *Journal of Neurochemistry* 130(4): 472-489. <https://doi.org/10.1111/jnc.12751>
- Ifuku, S., M. Wada, M. Morimoto y H. Saimoto. 2011. Preparation of highly regioselective chitosan derivatives via "click chemistry". *Carbohydrate Polymers* 85(3): 653-657. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.030>

- Jacobsen, N. E. 2007. *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. John Wiley & Sons.
- Jiménez, I. 2019. Fosforilación oxidativa y proteinopatías neurodegenerativas. Tesis de Maestría. Universidad de Zaragoza. <https://zaguan.unizar.es/record/86840/files/TAZ-TFM-2019-274.pdf>
- Kandel, E. y A. Hudspeth. 2013. Overall Perspective. 5-20 p. En: *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill.
- Kandel, E., J. Schwartz, T. Jessell, S. Siegelbaum, J. Hudspeth y S. Mack. 2013. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill.
- Klemm, D., B. Heublein, H. Fink y A. Bohn. 2005. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie* 44(22): 3358-3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Kumar, D., S. Gihar, M. Shrivash, P. Kumar y P. Kundu. 2020. A review on the synthesis of graft copolymers of chitosan and their potential applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 163: 2097-2112. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.060>
- Kumirska, J., M. Czerwicka, Z. Kaczyński, A. Bychowska, K. Brzozowski, J. Thöming y P. Stepnowski. 2010. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs* 8(5): 1567-1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>
- Laterra, J. y G. Goldstein. 2000. Apéndice B: Organización ventricular del líquido cefalorraquídeo: Barrera hematoencefálica, edema encefálico e hidrocefalia. 1288-1300 p. En: *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill, Interamericana.
- Liu, J., J. Lu, J. Kan y C. Jin. 2013. Synthesis of chitosan-gallic acid conjugate: Structure characterization and in vitro anti-diabetic potential. *International Journal of Biological Macromolecules* 62: 321-329. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.032>
- Liu, J., H. Pu, S. Liu, J. Kan y C. Jin. 2017. Synthesis, characterization, bioactivity and potential application of phenolic acid grafted chitosan: A review. *Carbohydrate Polymers* 174: 999-1017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.014>
- López, J. 2008. Fundamentos de fisiología del ejercicio. 3-33 p. En: *Fisiología Clínica del Ejercicio*. Ed. Médica Panamericana.
- Luque-Alcaraz, A. G., J. Lizardi-Mendoza, F. Goycoolea, I. Higuera-Ciapara y W. Argüelles-Monal. 2016. Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. *RSC Advances* 6(64): 59250-59256. <https://doi.org/10.1039/C6RA06563E>
- Mahadevan, G. y S. Valiyaveetil. 2021. Understanding the interactions of poly(methyl methacrylate) and poly(vinyl chloride) nanoparticles with BHK-21 cell line. *Scientific Reports* 11(1): 2089. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80708-0>
- Manek, E., F. Darvas y G. Petroianu. 2020. Use of Biodegradable, Chitosan-Based Nanoparticles in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Molecules* 25(20): 4866. <https://doi.org/10.3390/molecules25204866>
- Mlynárik, V. 2017. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Analytical Biochemistry* 529: 4-9. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.05.006>
- Mohammadi, A., V. Amoeian y E. Rashidi. 2018. Dysfunction in Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling Pathway and Susceptibility to Schizophrenia, Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Current Gene Therapy* 18(1): 45-63. <https://doi.org/10.2174/1566523218666180302163029>

- Montiel-Herrera, M., A. Gandini, F. Goycoolea, N. Jacobsen, J. Lizardi-Mendoza, M. Recillas-Mota y W. Argüelles-Monal. 2015. N-(furfural) chitosan hydrogels based on Diels-Alder cycloadditions and application as microspheres for controlled drug release. *Carbohydrate Polymers* 128: 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.052>
- Montiel-Herrera, M., R. Miledi y J. García-Colunga. 2006. Membrane currents elicited by angiotensin II in astrocytes from the rat corpus callosum. *Glia* 53(4): 366-371. <https://doi.org/10.1002/glia.20290>
- Moore, K., A. Dalley y A. Agur. 2017. Moore. *Anatomía con orientación clínica*. Wolters Kluwer.
- Muoio, V., P. Persson y M. Sendeski. 2014. The neurovascular unit—Concept review. *Acta Physiologica* 210(4): 790-798. <https://doi.org/10.1111/apha.12250>
- Ohta, S., E. Kikuchi, A. Ishijima, T. Azuma, I. Sakuma y T. Ito. 2020. Investigating the optimum size of nanoparticles for their delivery into the brain assisted by focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening. *Scientific Reports* 10(1): 18220. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75253-9>
- Opara, J., A. Małeckki, E. Małeczka y T. Socha. 2017. Motor assessment in Parkinson's disease. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM* 24(3): 411-415. <https://doi.org/10.5604/12321966.1232774>
- Pacheco, N. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: Caracterización y aplicación.
- Palakurthi, B. y S. Burugupally. 2019. Postural Instability in Parkinson's Disease: A Review. *Brain Sciences* 9(9). <https://doi.org/10.3390/brainsci9090239>
- Pichla, M., G. Bartosz e I. Sadowska-Bartosz. 2020. The Antiaggregative and Antiamyloidogenic Properties of Nanoparticles: A Promising Tool for the Treatment and Diagnostics of Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020: 3534570. <https://doi.org/10.1155/2020/3534570>
- Ramírez, I. H., J. Castro-Rosas, C. Gómez-Aldapa, R. Cortés y M. Marín. 2017. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de mezclas de almidón de papa y almidón de maíz ceroso. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP* 3(6).
- Rao, J. P. y K. Geckeler. 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* 36(7): 887-913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
- Reich, S. G. y J. Savitt. 2019. Parkinson's Disease. *The Medical Clinics of North America* 103(2): 337-350. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.014>
- Rejinold, N. S., M. Muthunarayanan, V. Divyarani, P. Sreerekha, K. Chennazhi, S. Nair, H. Tamura y R. Jayakumar. 2011. Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* 360(1): 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.04.006>
- Rhodes, C. J. 2017. Magnetic resonance spectroscopy. *Science Progress* 100(3): 241-292. <https://doi.org/10.3184/003685017X14993478654307>
- Rodríguez-Violante, M., L. Velásquez-Pérez y A. Cervantes-Arriaga. 2019. Incidence rates of Parkinson's disease in Mexico: Analysis of 2014-2017 statistics. *Revista Mexicana de Neurociencia* 20(3): 2253. <https://doi.org/10.24875/RMN.M19000043>
- Rojo, F. 2000. *Tablas de Espectroscopía Infrarroja*. UNAM.
- Shao, K., B. Han, W. Dong, F. Song, W. Liu y W. Liu. 2015. Pharmacokinetics and biodegradation performance of a hydroxypropyl chitosan derivative. *Journal of Ocean University of China* 14(5): 888-896. <https://doi.org/10.1007/s11802-015-2600-6>

- Shrestha, A. K. y P. Halley. 2014. Chapter 5 - Starch Modification to Develop Novel Starch-Biopolymer Blends: State of Art and Perspectives. 105-143 p. En: Halley, P. y Avérous, L. (Eds.), *Starch Polymers*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53730-0.00022-1>
- Singh, R., K. Shitiz y A. Singh. 2017. Chitin and chitosan: Biopolymers for wound management. *International Wound Journal* 14(6): 1276-1289. <https://doi.org/10.1111/iwj.12797>
- Smith, B. C. 2011. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press.
- Snell, R. 2010. *Neuroanatomía Clínica (7a ed.)*. Wolters Kluwer.
- Taebnia, N., D. Morshedi, M. Doostkam, S. Yaghmaei, F. Aliakbari, G. Singh y A. Arpanaei. 2015. The effect of mesoporous silica nanoparticle surface chemistry and concentration on the α -synuclein fibrillation. *RSC Advances* 5(75): 60966-60974. <https://doi.org/10.1039/C5RA08405A>
- Tran, T. N., T. Vo, K. Frei y D. Truong. 2018. Levodopa-induced dyskinesia: Clinical features, incidence, and risk factors. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 125(8): 1109-1117. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1900-6>
- Uppuluri, C. T., P. Ravi y A. Dalvi. 2021. Design and evaluation of thermo-responsive nasal in situ gelling system dispersed with piribedil loaded lecithin-chitosan hybrid nanoparticles for improved brain availability. *Neuropharmacology* 201: 108832. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108832>
- Urbančič, I., M. Garvas, B. Kokot, H. Majaron, P. Umek, H. Cassidy, M. Škarabot, F. Schneider, S. Galiani, Z. Arsov, T. Koklic, D. Matallanas, M. Čeh, I. Mušević, C. Eggeling y J. Štrancar. 2018. Nanoparticles Can Wrap Epithelial Cell Membranes and Relocate Them Across the Epithelial Cell Layer. *Nano Letters* 18(8): 5294-5305. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b02291>
- Vio, V., M. Marchant, E. Araya y M. Kogan. 2017. Metal Nanoparticles for the Treatment and Diagnosis of Neurodegenerative Brain Diseases. *Current Pharmaceutical Design* 23(13): 1916-1926. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170105152948>
- Wan, Y., K. Creber, B. Peppley y V. Bui. 2004. Ionic conductivity and tensile properties of hydroxyethyl and hydroxypropyl chitosan membranes. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 42(8): 1379-1397. <https://doi.org/10.1002/polb.20007>
- Wang, W., C. Xue y X. Mao. 2020. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. *International Journal of Biological Macromolecules* 164: 4532-4546. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042>
- Wilson, B., M. Samanta, M. Muthu y G. Vinothapooshan. 2011. Design and evaluation of chitosan nanoparticles as novel drug carrier for the delivery of rivastigmine to treat Alzheimer's disease. *Therapeutic Delivery* 2(5): 599-609. <https://doi.org/10.4155/tde.11.21>
- Winkworth-Smith, C. y T. Foster. 2013. General Overview of Biopolymers: Structure, Properties, and Applications. 7-36 p. En: *Handbook of Biopolymer-Based Materials*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527652457.ch2>
- Win-Shwe, T.-T. y H. Fujimaki. 2011. Nanoparticles and neurotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences* 12(9): 6267-6280. <https://doi.org/10.3390/ijms12096267>
- Zhang, M. Q., D. Sun, Y. Xie, G. Peng, J. Xia, H. Long y B. Xiao. 2014. Three-dimensional visualization of rat brain microvasculature following permanent focal ischaemia by synchrotron radiation. *The British Journal of Radiology* 87(1038): 20130670. <https://doi.org/10.1259/bjr.20130670>
- Zhao, Y., D. Li, Z. Zhu y Y. Sun. 2019. Improved Neuroprotective Effects of Gallic Acid-Loaded Chitosan Nanoparticles Against Ischemic Stroke. *Rejuvenation Research* 23(4): 284-292. <https://doi.org/10.1089/rej.2019.2230>