



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

EL PAPEL DEL SISTEMA DINORFINÉRGICO
EN LA ADICCIÓN ALCOHÓLICA: DISEÑO DE
NUEVAS TERAPIAS ANTIADICCIÓN Y
ANTIRRECAÍDA

Programa de Doctorado en Neurociencias

Tesis Doctoral

Autora: Natalia Landsberg
Dirigida por: Dra. Sofía Araceli Sanz Aliaga

Febrero-2024

INFORME DIRECTORS/AS, TUTOR/A PER A DIPÒSIT DE TESI

Director (es) / Codirector (es):

1.- Cognoms, Nom. Sanz Aliaga, Sofía Araceli. N.I.F: 24339702K, Departament/Institut: Externo Centre: -

Tutor o tutora (si pertoca)

Cognoms, Nom. Lanuza Navarro, Enrique. N.I.F: 18972008K, Departament/Institut: Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física Centre: Universitat de València

Com a director (a) /codirector (a), tutor(a) de la tesi doctoral El papel del sistema dinorfinérgico en la adicción alcohólica: diseño de nuevas terapias antiadicción y antirrecaída

de D/D^a **Natalia Landsberg,**

estudiant del programa de doctorat **3142 Neurociencias** (RD99/2011), de la Universitat de València, emeten informe **FAVORABLE** (*favorable/desfavorable*) per a la realització del dipòsit i defensa de la tesi doctoral.

En Valencia, a 11 de Diciembre, 2023

Signat: 

Signat: 

Director/a

Tutor/a

**ESCOLA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

La elaboración de este trabajo fue financiada por los fondos de los proyectos concedidos a la Dra. Lucía Hipólito: MICINN PID2019-109823RB-I00; PNSD-2019I038; CIAICO/2021/268 y Dra. Ana Melero FEDER (SAF2017-85806-R).

Agradecimientos

Esta tesis ha sido un camino largo y difícil. Mucho más difícil de lo que me lo podría haber imaginado. Pero aquí termina y, a pesar de todo, me llevo conmigo muchas cosas y personas bonitas a las que me gustaría agradecer.

A Álvaro, mi compañero de vida. Gracias por estar allí. Gracias por tu amor, tu apoyo, tu valentía, tu fuerza. Gracias por recordarme que también soy fuerte, valiente y que sí que valgo. No solo eres el amor de mi vida y mi mejor amigo, eres mi chaleco salvavidas y no sé cómo hubiera salido de ésta si no fuera por ti. Tú sabes en primera persona lo duros que han sido los años de la tesis para mí, sobre todo estos últimos meses. Pero también sabes que más duros somos nosotros, juntos. Gracias por estar a mi lado, y, por favor, sigue allí muchos años más.

A mis padres. Por vuestro amor incondicional. Por todo vuestro esfuerzo. Por el apoyo que me disteis desde mi primer suspiro hasta hoy. Gracias por llevarme todas las mañanas al cole, luego al colegio de artes, y a las extraescolares. Gracias por haberme apoyado en mi deseo de hacer la carrera en España. Papá, gracias por haber estado yendo conmigo un mes entero a Alicante todas las mañanas para estar seguro de que sabré conducir sola por la carretera. Y por la vida. Mamá, gracias por hacer el esfuerzo de dejarme ir tan lejos de vosotros. Sé que te ha costado y te sigue costando, pero gracias a ello aquí estoy. Gracias por estar tan en mi día a día, a pesar de las fronteras, distancias, idiomas, pandemias y guerras. Es imposible nombrar todo que habéis hecho por mí y lo que seguís haciendo. Sois los mejores padres que se puede tener y os quiero mucho.

A mi hermano. Siempre has estado cuando te he necesitado. Con pocas palabras, poco rato, pero en el momento más necesario. Te quiero.

A mis suegros, Mari Carmen y Rafa. Gracias por haberme aceptado como parte de vuestra familia. Gracias por vuestro amor, cariño, apoyo, ayuda y fuerza. Si tenéis esta tesis en vuestras manos, ha sido posible gracias a vosotros. Sois los mejores suegros, la mejor familia que se puede desear. Os quiero mucho.

A mi cuñado Carlos por ser capaz de animarnos a todos pase lo que pase.

A Sofía. Me tendiste la mano en uno de los momentos más feos y oscuros no solo de esta tesis, sino también de mi vida. Gracias por enseñarme que hay gente buena. Gente, que puede ayudarte porque sí. Gracias por todo.

A Mari Carmen Terencio, por ser tan buena persona. No solo eres una gran científica y farmacéutica, también eres una gran persona y un ejemplo de cómo ha de ser una profesora para futuros profesionales de la salud.

A mis excompañeras de la farmacia: Marta y Mariche. Sobre todo, por haberme enseñado lo bonito que es el mundo de la Farmacia Comunitaria. Es uno de los mejores descubrimientos y un aprendizaje muy valioso.

A mis compañeras de la farmacia de ahora: Adela y Ana. Gracias por el apoyo, comprensión, ánimos y toda la ayuda. Una parte de esta tesis también es vuestra.

A mi compi de la farmacia, que ha estado conmigo desde mis inicios en la farmacia, Nuria. Gracias por las risas, por desahogos, por ser una amiga.

A mis amigas Natalia y Valeria. En este grupo de WhatsApp se hace diminuto cualquier problema. Gracias por seguir teniendo sentido del humor y palabras acertadas siempre, a pesar del tiempo que pase, las distancias y las cosas que ocurran en el mundo.

A mi amigo Konstantin por escucharme y por hacerme reír.

Al personal del animalario de la Facultad de Farmacia de la UV. Sois el recuerdo más tierno que me llevo de esta tesis. Gracias por haberme tratado tan bien, por haberos preocupado por mí hasta los zuecos y pijamas, por haber estado en los momentos de crisis. Sois fenomenales.

A la Síndica de Greugues de la Universitat de València. Sé que Usted solo hizo bien su trabajo, pero creo que ni imagina el significado que tuvo para mí y las fuerzas que me dio para seguir luchando. Gracias a Usted aprendí que si sabes que tienes razón, lucha. Tarde o temprano habrá alguien que te la dará y nada será en vano.

A Enrique por su colaboración.

Благодарности

Эта научная работа оказалась для меня дорогой. Очень долгой и очень сложной. Куда более сложной, чем я могла бы себе представить 5 лет назад. Но у всего есть конец, и эта дорога заканчивается здесь и сейчас, в этом манускрипте. Несмотря на все трудности, этот опыт в моей жизни подарил мне кое-что важное: хороших людей. Многие из вас были в моей жизни и раньше, а некоторые появились совсем недавно. И всем вам я хочу сказать: «Спасибо!».

Альваро. Моей второй половинке. Спасибо за то, что ты всегда рядом. За твою любовь, поддержку, смелость и силу. Спасибо, что напоминаешь мне, что я тоже сильная и смелая. Ты не только моя любовь и мой лучший друг, ты стал для меня еще и спасательным кругом в этом море неурядиц, которое называется жизнь. Спасибо, что помог выплыть и из этого омута. Ты как никто другой знаешь, какими сложными были это годы докторской, и каким кошмаром были последние месяцы. Но ещё ты как никто другой знаешь, что мы вместе – сильнее и твёрже всех неурядиц. Спасибо за то, что ты рядом и, пожалуйста, продолжай там быть.

Моим папе и маме. Спасибо за всю заботу, которой вы окружили меня с моего первого вдоха и до сегодняшнего дня. Спасибо, что боролись за меня еще до того, как я появилась на свет и по сегодняшний день. Спасибо за все поездки в школу, в художку и к репетиторам. Спасибо, что поддерживали меня, когда я захотела поехать учиться в Испанию и во всем мне помогли. Папа, спасибо, что целое лето катался со мной на машине и ездил каждое утро со мной в Аликанте, чтобы я не боялась сама двигаться по дорогам. И по жизни. Мама, спасибо, что смогла отпустить меня так далеко от вас. Я знаю, что тебе было сложно. И тебе все еще сложно. Но благодаря этому шагу все это стало возможным. Спасибо, что вы так близки ко мне и всему, что происходит в моей жизни, несмотря на расстояния, языковые барьеры, границы, пандемии и войны. Невозможно перечислить все то, за что я вам благодарна. Вы лучшее на свете родители и я очень вас люблю.

Моему брату Лёве. Ты всегда и во всем немногословен и краток. Но ты всегда рядом в самый необходимый момент. Спасибо! Я тебя люблю!

Моим свёкрам, Мари Кармен и Рафе. Спасибо, что приняли меня в вашу семью, как родную. Спасибо за вашу любовь, вашу поддержку, вашу силу. Если вы сейчас

держите в руках эту работу, то знайте: это благодаря вам. Вы лучшее на свете свёкры. Люблю вас!

Карлосу, за то, что можешь разрядить обстановку в любой ситуации.

Софии. Спасибо, что протянула мне руку помощи в этот не только самый тёмный момент в моей докторской, но и, наверное, в моей жизни. Приятно знать, что есть люди, готовые помочь просто так.

Мари Кармен Тенерсио. За то, что вы – хороший человек. Вы пример не только великолепного ученого и фармацевта, но и того, каким должен быть настоящий преподаватель.

Моим бывшим коллегам из аптеки, Марте и Мариче. Спасибо за время, которое мы проработали вместе, и за то, что с вами я открыла мир общественной аптеки. И он мне ну очень понравился!

Моим нынешним коллегам из аптеки, Аделе и Ане. Спасибо за вашу поддержку, понимание и помощь. Кусочек этой работы ваш.

Моей аптечной коллеге всех времён и народов, Нурии. Спасибо за все наши разговоры, по душам и смеха ради. Спасибо за то, что ты моя подруга.

Моим подругам Наташе и Лере. За то, что в нашем чатике можно решить любую проблему. За то, что сквозь время, расстояния и всякую жесть мы продолжаем шутить и находить слова.

Моему другу Костяну за то, что всегда можно с тобой поболтать и похохотать.

Персоналу зверинца факультета Фармации. Вы – самое нежное воспоминание о моей докторской. Спасибо, что заботились обо мне, вплоть до сменной одежды. За то, что помогали в кризисные моменты и просто были ну очень человечными.

Председателю синдиката Университета Валенсии. Я знаю, что вы просто сделали свою работу, но вы даже не представляете, какой толчок вперед и сколько сил это мне дало, чтобы продолжать. Благодаря Вам я знаю: если ты прав – борись. Найдется тот, кто укажет на твою правоту, и ты победишь.

*“Скажите детям, что тот, кто предал,
Легко спал ночью, легко обедал.
За спины смелых сбегутся трусы,
Что честь и совесть не продаются.*

...

*Скажите взрослым, что в небе звёзды,
А остальное — не так серьёзно.
Пусть мечтают они, как дети.
Скажите взрослым, скажите это.”*

....

*“Digan a sus hijos, que quien traicionó
Anoche durmió a gusto, a gusto cenó.
Pero los cobardes se esconden detrás de los valientes,
Digan, que el honor y la moral no se venden.*

...

*Digan a los adultos, que hay muchas estrellas en el cielo
Y lo demás – no es tan grave.
Que sueñen como niños,
Díganlo a los adultos, díganles esto”*

ÍNDICE

RESUMEN.....	- 1 -
1. INTRODUCCIÓN.....	- 7 -
1.1. NEUROFISIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN.....	- 13 -
1.1.1. Vía mesolímbica: estructura clave de adicción.....	- 13 -
1.1.2. Sistema opioide endógeno	- 17 -
1.2. VÍA NARIZ-CEREBRO	- 28 -
1.2.1. Cavidad Nasal	- 29 -
1.2.2. Administración de fármacos por la vía Nariz-Cerebro	- 31 -
1.3. LIPOSOMAS.....	- 37 -
1.3.1. Clasificación	- 39 -
1.3.2. Preparación	- 40 -
1.3.3. Métodos para la incorporación del fármaco.....	- 42 -
1.3.4. Caracterización de los liposomas.....	- 43 -
1.4. GELES TERMOSENSIBLES.....	- 47 -
1.4.1. Pluronic®	- 47 -
1.4.2. Geles para administración de fármacos vía Nariz-Cerebro	- 49 -
2. OBJETIVOS.....	- 51 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 55 -
3.1. COMPUESTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS.....	- 57 -
3.1.1. Líquido Cerebroespinal Artificial (LCEa).....	- 57 -
3.1.2. Tampón Fosfato Salino pH 7,4 (PBS pH 7,4)	- 57 -
3.1.3. Norbinaltorphimina (Nor-BNI).....	- 57 -
3.1.4. Cianocobalamina (Vitamina B12)	- 58 -
3.1.5. Dopamina (DA)	- 59 -
3.1.6. U-50448	- 59 -
3.1.7. Pluronic® F-127 y Pluronic® F-68	- 59 -
3.1.8. Componentes de los liposomas.....	- 59 -
3.1.9. Soluciones de homogenización (SH) y de estabilización (SE) para Nor-BNI.....	- 60 -
3.1.10. Otros reactivos	- 60 -
3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS: Nor-BNI Y Dopamina.....	- 61 -
3.2.1. Validación de los Métodos Analíticos	- 61 -
3.3. GEL INTRANASAL TERMOSENSIBLE	- 64 -
3.3.1. Preparación de geles	- 65 -
3.3.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas de los geles: temperatura de gelificación- 65 -	
3.3.3. Determinación de las propiedades reológicas del gel: viscosidad	- 66 -
3.4. ESTUDIO DE LIBERACIÓN DEL FÁRMACO Y EL AJUSTE AL MODELO CINÉTICO.....	- 67 -
3.5. LIPOSOMAS.....	- 70 -
3.5.1. Preparación de los liposomas.....	- 70 -
3.5.2. Caracterización de los liposomas.....	- 71 -
3.6. ANIMALES.....	- 73 -
3.7. ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS	- 74 -
3.7.1. Estudio de Microdiálisis (MD)	- 74 -
3.7.2. Determinación de Nor-BNI en tejido cerebral.....	- 80 -
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 83 -
4.1. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	- 85 -

4.2.	GEL INTRANASAL TERMOSENSIBLE: DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y REOLÓGICAS	- 92 -
4.2.1.	Geles Blancos.....	- 92 -
4.2.2.	Geles cianocobalamina	- 93 -
4.2.3.	Geles Liposomasles Blancos.....	- 99 -
4.3.	LIPOSOMAS.....	- 102 -
4.3.1.	Caracterización: Tamaño de la Partícula, Potencial Zeta, Índice de Polidispersidad, Contenido en Fosfolípidos y Eficacia de Encapsulación	- 102 -
4.3.2.	Estudio de liberación de Nor-BNI	- 103 -
4.4.	ENSAYOS NEUROQUÍMICOS	- 106 -
4.4.1.	Estudio de microdiálisis.....	- 106 -
4.4.2.	Determinación de Nor-BNI en tejido cerebral.....	- 108 -
5.	CONCLUSIONES	- 113 -
6.	BIBLIOGRAFÍA	- 117 -

Abreviaturas

AJ: Uniones Adherentes

ATC: Antidepresivos Tricíclicos

AUDIT: Alcohol Use Disorder Identification Test

BHE: Barrera Hematoencefálica

BLA: Área del Lenguaje de Broca (Broca Language Center)

BNST: Núcleo del Lecho de la Estría Terminal (Bed Nucleus of Stria Terminalis)

CMC: Concentración Micelar Crítica

CPF: Corteza Prefrontal

CV: Coeficiente de Variación

DA: Dopamina

DLS: Dynamic Light Scattering (Dispersión Dinámica de Luz)

DMS-5: Manual Diagnóstico y Estadístico para las Enfermedades Mentales, 5ª edición.

DOR: Receptores Opioides Delta

Dyn: Dinorfina

Dyn/KOR: Sistema Dinorfina/Receptores Opioides Kappa

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EEUU: Estados Unidos

EPM: Elevated Plus Maze (Laberinto en Cruz Elevado)

FDA: Food and Drug Administration

GABA: Ácido Gamma-Aminobutírico

GB: Geles Blancos

GC: Geles Cianocobalamina (Vitamina B12)

GLB: Geles Liposomales Blancos

Glu: Glutamato

GPCRs: Receptores Acoplados a la Proteína G

HIPP: Hipocampo

HPLC-ECD: Cromatografía Líquida de Alta Precisión con Detección Electroquímica (High Precision Liquid Chromatography coupled with Electrochemical Detection).

IN: Vía Intranasal

ISRS: Inhibidores Selectivos de Recaptación de Serotonina

KO: knockout

KOR: Receptores Opioides Kappa

LCEa: Líquido Cerebroespinal Artificial
LUV: Liposomas Unilamelares Grandes
MD: Microdiálisis
MOR: Receptores Opioides Mu
NAc: Núcleo Accumbens
NMDA: N-metil-D-aspartato
Nor-BNI: Norbinatrofimina
NSO: Neuronas Sensoriales Olfativas
OMS: Organización Mundial de Salud
OR: Receptores Opioides
PBP: Núcleo Pigmentado Parabraquial (Parabrachial Pigment Nucleus)
PBS: Tampón Fosfato Salino (Phosphate-Buffered Saline)
PDI: Índice de Polidispersidad
PN: Pontine Nuclei
POE: Polioxietileno
POP: Polioxipropeleno
RAM: Reacción Adversa a Medicamento
SD: Desviación Estándar
SE: Solución de Estabilización
SEO: Sistema Opióide Endógeno
SH: Solución de Homogenización
SML: Sistema Mesolímbico
SNC: Sistema Nervioso central
SUV: Liposomas Unilamelares Pequeños
TCA: Trastorno Por Consumo De Alcohol
TJ: Uniones Estrechas
TMC: Temperatura Micelar Crítica
VTA: Área Ventral Tegmental

RESUMEN

Introducción. El tratamiento de las enfermedades neurológicas siempre ha sido un gran reto para la farmacología y tecnología farmacéutica. En primer lugar, se debe a la existencia de la Barrera Hematoencefálica (BHE) ya que pocos son los compuestos capaces de atravesarla por sus propiedades fisicoquímicas y ejercer el efecto deseado a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC). En segundo lugar, la necesidad de administrar dosis más altas por las vías periféricas para alcanzar la diana terapéutica, da lugar a la aparición de reacciones adversas al medicamento (RAM) periféricas y al incremento de costes en el tratamiento. Por ello, la vía Nariz-Cerebro para la administración directa de fármacos al SNC ha ganado importancia en los últimos años, siendo una opción muy prometedora puesto que permite su entrada sin necesidad de atravesar la BHE.

El trastorno por consumo de alcohol (TCA) es una enfermedad neuropsiquiátrica crónica con posibilidad de tratamiento. Su impacto e incidencia en la sociedad crece cada vez más, si bien se dispone de pocas terapias farmacológicas con evidencia demostrada y lo mismo sucede con las recaídas en el consumo de alcohol, otro punto crítico de esta afección. Durante las últimas décadas la investigación se ha centrado en torno a los mecanismos neurológicos responsables del desarrollo de las adicciones. Gracias a los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación, se espera que el sistema Dinorfina/Receptores Opioides Kappa (Dyn/ KOR) pueda ser una diana terapéutica muy prometedora para el tratamiento de TCA y prevención de las recaídas en el consumo.

Por ello, el objetivo de esta tesis ha consistido en la elaboración y estudio de la efectividad de una forma farmacéutica administrada por la vía Nariz-Cerebro de un antagonista de los receptores KOR y su efecto a nivel de SNC.

Materiales y métodos. La forma farmacéutica elaborada fue un gel intranasal termosensible de formación *in-situ* con liposomas cargados del antagonista KOR.

Liposomas. Los liposomas se elaboraron por el método de película fina. Se estudiaron las características más importantes de los liposomas mediante los métodos correspondientes.

Gel intranasal termosensible. La composición del gel se eligió para garantizar las características fisicoquímicas y reológicas deseadas. La temperatura de gelificación se

estudió mediante el método de Miller-Donovan, mientras que para el estudio de la viscosidad en función de la temperatura se utilizó el viscosímetro rotatorio.

Estudio de liberación. El perfil de liberación del fármaco desde la forma farmacéutica y su capacidad de liberar el fármaco de forma controlada se estudiaron en células de Franz durante 72 horas.

Estudio farmacológico. La capacidad del bloqueo KOR a nivel del SNC de la formulación elaborada se estudió mediante la evaluación de los niveles de dopamina extracelular a nivel del Núcleo Accumbens (NAc). Para ello, se llevó a cabo un ensayo de microdiálisis *in vivo*. Los niveles de dopamina en los dializados se estudiaron mediante el empleo de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ECD).

La distribución del fármaco a nivel del SNC se estudió mediante la evaluación de los niveles del fármaco en diferentes áreas cerebrales. La determinación del fármaco en las muestras cerebrales se llevó a cabo mediante HPLC-ECD.

Resultados. Los liposomas obtenidos presentaron un tamaño homogéneo de $381,03 \pm 10,38$ nm y un potencial de $2,62 \pm 4,42$ mV. La eficacia de encapsulación fue de 53,85%. Los liposomas se incorporaron en el gel de la forma deseada. El ensayo de liberación mostró la capacidad de la formulación de liberar el fármaco de forma controlada, consiguiendo el equilibrio a las 50 horas y alcanzando un máximo de liberación del 21,75% de dosis de fármaco. Por otra parte, los resultados de la prueba de microdiálisis muestran que el tratamiento previo de los animales con la formulación elaborada bloquea el descenso de liberación de dopamina en el SNC provocado por la administración de un agonista de los KOR. Finalmente, el fármaco fue detectado a nivel de mesencéfalo, confirmando así que se produjo su distribución a nivel central.

Conclusiones. La formulación intranasal del gel con incorporación de liposomas cargados de Nor-BNI permite que el fármaco alcance las estructuras clave en el SNC dando lugar al efecto farmacológico esperado.

1. INTRODUCCIÓN

El alcohol étílico es una droga consumida mundialmente. Desde el punto de vista histórico y cultural, el uso de alcohol tiene una gran importancia en las relaciones sociales. El consumo moderado de alcohol resulta placentero para el ser humano. Sin embargo, su ingesta en cantidades excesivas, conocida como el trastorno por consumo de alcohol (TCA), plantea un problema de salud pública de gran prevalencia en la sociedad.

La 5ª edición del Manual Diagnóstico y Estadístico para las Enfermedades Mentales (DSM-5) define el **TCA** como *“un patrón problemático de consumo de alcohol que conduce a problemas clínicamente significativos o asociados a dos o más de los once criterios (Tabla 1) del TCA que tienen lugar en un periodo de doce meses”*. Por su parte, la **adicción al alcohol o alcoholismo** (definido como dependencia de sustancias en DSM-5) es *“un tipo de trastorno caracterizado por recaídas crónicas, búsqueda compulsiva de droga, pérdida de control sobre los límites de consumo y aparición de un estado emocional negativo (ansiedad, irritabilidad, disforia) en respuesta a la retirada de la droga”*. La adicción corresponde a la etapa más grave y crónica del trastorno por el consumo de sustancias.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de TCA (DSM-5).

Criterios para TCA (DSM-5).	
1	Tolerancia
2	Abstinencia
3	Dificultades para controlar la ingesta (fracaso en interrupción o suspensión de la ingesta)
4	Negligencia en actividades diarias
5	Tiempo perdido en ingesta de alcohol o recuperación de sus efectos
6	Ingesta de alcohol a pesar de problemas físicos/psicológicos causados por la ingesta
7	Craving (ansias por consumo)
8	Consumo de alcohol en las cantidades más elevadas o durante periodos de tiempo más prolongados de los previsto
9	Fracaso en el cumplimiento con papeles importantes y obligaciones
10	Uso recurrente de alcohol en situaciones peligrosas
11	Ingesta de alcohol a pesar de problemas sociales/interpersonales

La Organización Mundial de la Salud (OMS) atribuye al TCA 3 millones de muertes al año y un 5,1% de la causa de diferentes enfermedades (World Health Organization, 2018). De hecho, se estima que, en el año 2010, esta problemática supuso un coste de 249 billones de dólares a la sociedad estadounidense en términos de muertes y gasto médico (Sacks, Jeffrey J., MD, MPH, Gonzales et al. 2015). Además, en Estados Unidos (EEUU)

120 millones de personas (51% de la población) mayores de 12 años son consumidores habituales de alcohol, de los cuales 18 millones (7,7%) presentan criterios para ser diagnosticados de adicción alcohólica (Grant and Dawson, 1998; Grant et al. 2004).

En España, el alcohol es la droga psicoactiva más utilizada (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones 2021). El “atrachón de alcohol” o “binge drinking”, que se define como el consumo de más de 4 bebidas para las mujeres y de 5 para hombres en una única sesión de pocas horas de duración, es una tendencia creciente en la sociedad española, sobre todo entre la población más joven. Ante esta disyuntiva, se realizó un estudio de prevalencia del consumo dañino de alcohol, utilizando la metodología AUDIT (Alcohol Use Disorder Identification Test). El AUDIT es un cuestionario desarrollado por la OMS para la detección del consumo excesivo y dañino de alcohol. Consta de 10 preguntas: las preguntas 1-3 ayudan a cuantificar el consumo de alcohol (frecuencia y cantidad); 4-6 evalúan la conducta en respuesta al consumo de alcohol; 7-8 tratan sobre los efectos adversos de la ingesta de alcohol y 9-10 se relacionan con los problemas causados por la bebida. Los resultados del estudio mostraron que un 5,6% de la población española presenta un patrón de consumo dañino de alcohol (AUDIT >8).

Asimismo, la OMS afirma que el TCA es muy resistente a los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos. El TCA es una enfermedad crónica, pero tratable. No obstante, a pesar del gran impacto y creciente prevalencia de esta condición médica, la tasa de los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos con evidencia demostrada es muy baja y se encuentra por debajo del 10% en EEUU (Han, Jones et al. 2021). De hecho, en EEUU menos del 4% de pacientes diagnosticados de TCA reciben prescripción médica para el tratamiento farmacológico de su afección (Mark, Kassed et al. 2009).

En España, el protocolo para el abordaje de la dependencia alcohólica fue aprobado por el Ministerio de Sanidad en 2003 y no se ha renovado desde entonces. Se trata de un protocolo de dos etapas: detoxificación y deshabitación (Ponce, Jiménez-Arriero et al. 2003, Robledo, Córdoba 2005). La etapa de detoxificación consiste en la suspensión brusca de ingesta de alcohol. En esta etapa, el tratamiento farmacológico responde a dos necesidades principales del paciente: mantener los niveles correctos de hidratación y nutrientes (uso de zumos, sueros de rehidratación, suplementos con vitaminas del grupo B, ácido fólico y hierro si es preciso) y prevenir el síndrome de abstinencia (fármacos con efecto sedante). Los fármacos sedantes más utilizados son las benzodiacepinas

(diazepam, clonazepato) con efecto ansiolítico y anticonvulsivante. Otra opción farmacológica es clobetazol, fármaco sedante e hipnótico con propiedades anticonvulsivantes. La primera etapa del protocolo suele tener una duración de aproximadamente 1 semana, mientras que la etapa de deshabituación requiere de la mayor parte de la vida del paciente. En la deshabituación, el papel más importante es la prevención de las recaídas mediante el uso del tratamiento farmacológico apropiado. Para lograr este fin, se utilizan dos grupos de fármacos: interdictores o aversivos y anti-craving.

Los fármacos interdictores tienen un mecanismo de acción que se define como “freno psicológico”. Son fármacos inhibidores de la enzima aldehído deshidrogenasa hepática (disulfiram, cianamida cálcica). Debido a su acción farmacológica, el acetaldehído (metabolito principal de etanol) se acumula en la sangre del paciente, dando lugar a un típico cuadro de intoxicación aguda por alcohol (o reacción alcohólica) que cursa con náuseas, vómitos, vértigo, sudoración, visión borrosa, dolor de cabeza, etc. Este cuadro tiene inicio 10-20 minutos después de la ingesta de alcohol y es proporcional a la dosis ingerida. Se espera que el paciente tratado con este grupo de fármacos evite el consumo de alcohol con el fin de evitar la reacción alcohólica. El tratamiento con los fármacos interdictores requiere una supervisión médica debido a los efectos adversos que presenta. Además, el consumo de drogas de abuso en pequeñas dosis durante un periodo de tiempo prolongado disminuye la eficacia de estos fármacos, por lo cual su uso tan solo tiene sentido en caso de abstinencia absoluta.

Los fármacos anti-craving, a su vez, ayudan a mitigar el deseo compulsivo de consumir la droga y reducen su refuerzo positivo. Estos fármacos son de primera elección y son la parte más importante del tratamiento de la dependencia. No solo ayudan a prevenir la recaída, sino también contribuyen a una recuperación de la abstinencia más temprana en los pacientes que han recaído. Por ello, estos fármacos se usan durante 6-12 meses de forma ininterrumpida a pesar de las recaídas del paciente. El tratamiento con los fármacos anti-craving ha de establecerse lo antes posible para reducir el riesgo de las recaídas tempranas. Los principios activos más usados son acamprostat y naltrexona.

Naltrexona es un antagonista no selectivo de los receptores opioides endógenos (μ , κ y δ) y es usado también en el tratamiento de la adicción por opiáceos. El mecanismo de acción de este fármaco consiste en el bloqueo de los receptores opioides endógenos para

evitar la activación del sistema opioide endógeno inducida por alcohol, disminuyendo de este modo el incremento de la actividad dopaminérgica en las áreas cerebrales responsables de los procesos de recompensa, aprendizaje por refuerzo positivo y desarrollo de la adicción. En pocas palabras, la naltrexona disminuye el efecto reforzador del alcohol.

El otro principio activo, acamprostat, actúa sobre los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y reduce la hiperactividad glutamatergica, característica para los estados de ansiedad y disforias que sufre el paciente al estar expuesto a los estímulos que favorecen la recaída.

Otros fármacos, como los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS), antidepresivos tricíclicos (ATC), litio, antipsicóticos y antiepilépticos pueden dar resultados favorables en el tratamiento de alcoholismo, pero, actualmente, no están integrados en los protocolos oficiales. Se trata de un protocolo funcional, pero que presenta muchos problemas, sobre todo de adherencia al tratamiento. Los pacientes suelen sufrir recaídas y abandonar los tratamientos debido a los efectos adversos que presentan, dificultad para seguir las pautas y sintomatología que padecen por su condición.

El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el abordaje del TCA y recaídas en el consumo de alcohol es imprescindible. En los últimos años la investigación se ha centrado en la comprensión de los factores que promueven tanto el TCA, como la recaída, el punto crítico para los pacientes con TCA. El desarrollo de terapias novedosas, seguras y con demostrada evidencia científica para el tratamiento y prevención de las recaídas en el consumo de alcohol conducirá a la disminución de la prevalencia del TCA en la sociedad.

La presente Tesis está enfocada en el desarrollo de una formulación novedosa para el tratamiento del TCA y recaídas que ofrece una terapia segura, de fácil manejo y basada en la evidencia. Además, este trabajo estudia la posibilidad de enfocar las estrategias anti-recaída en el sistema Dinorfina-KOR del Núcleo Accumbens (NAc).

1.1.NEUROFISIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN

El área ventral tegmental, núcleo accumbens y las conexiones neuronales que existen entre ellas son estructuras clave del sistema mesolímbico implicados en el desarrollo de la adicción.

La dopamina, uno de los neurotransmisores involucrados en la señalización entre estas áreas del sistema mesolímbico, también juega un papel de gran importancia en este proceso. La interacción y señalización que existen entre el sistema mesolímbico y el sistema opioide endógeno parecen ser clave no solo en el entendimiento del desarrollo de la adicción, sino que también son potenciales dianas terapéuticas. En los siguientes apartados, se procede a detallar el funcionamiento de estas áreas y sus interconexiones con más detalle.

1.1.1. Vía mesolímbica: estructura clave de adicción

Existen diferentes regiones cerebrales responsables del control de los procesos de toma de decisiones, hábito, emociones y recompensa, e involucradas en la patología de adicción. El **sistema mesolímbico (SML)** es la estructura cerebral más relevante.

El SML es una vía cerebral heterogénea, compuesta por diferentes estructuras proencefálicas interconectadas: **núcleo accumbens (NAc)**, amígdala extendida, hipocampo, hipotálamo y regiones frontales de la corteza cerebral. Numerosos neurotransmisores forman parte de la vía mesolímbica, siendo las **neuronas dopaminérgicas (DA)** un elemento clave en el funcionamiento de este sistema. De hecho, todas las regiones cerebrales citadas anteriormente reciben inervaciones dopaminérgicas procedentes del **Área Ventral Tegmental (VTA)** del mesencéfalo (Fields, Hjelmstad et al. 2007). A parte de la DA, existen otros neurotransmisores y tipos de neuronas involucrados que ejercen una acción moduladora. Desde el punto de vista del proceso de desarrollo de la adicción, las proyecciones dopaminérgicas del **VTA** al **NAc** son las de mayor interés.

A) Circuito VTA-NAc

1) Área Ventral Tegmental (VTA)

El **área ventral tegmental (VTA)** es una región del mesencéfalo de situación central contigua a la sustancia negra (SN), inmediatamente ventral a la red de núcleos aleñados y caudal al hipotálamo (Björklund, Dunnett 2007). Incluye neuronas dopaminérgicas del tipo celular A10 (Dahlstroem, Fuxe 1964). El VTA se puede dividir, a su vez, en cinco regiones en función de la morfología y orientación celular: núcleos paranigrales (PN) y área pigmentada parabraquial (PBP) (conocidos como núcleos laterales) y tres núcleos centrales (interfascicular, lineal rostral y lineal caudal) (Sanchez-Catalan, Kaufling et al. 2014).

2) Neuronas del VTA

Las **neuronas dopaminérgicas (DA)** del VTA son un grupo de neuronas heterogéneo desde el punto de vista de sus propiedades moleculares y electrofisiológicas. Dependen de la zona desde donde proyectan (Margolis, Mitchell et al. 2008, Lammel, Hetzel et al. 2008). La clasificación de las neuronas dopaminérgicas en dos poblaciones fue sugerida por algunos autores (Lammel, Lim et al. 2014).

La primera, consiste en las neuronas DA localizadas mayoritariamente en el VTA lateral posterior y anterior (lateral PBP), proyectando al NAc lateral shell. Este grupo de neuronas parece estar involucrado en las conductas relacionadas con el proceso de recompensa (Morales, Margolis 2017, Lammel, Lim et al. 2012) y presentan las propiedades electrofisiológicas clásicas atribuidas a las neuronas DA: baja frecuencia de disparo y larga corriente de hiperpolarización (corriente h) (Zhang, Placzek et al. 2010, Ungless, Grace 2012, Lammel, Lim et al. 2014, Lammel, Hetzel et al. 2008).

Por otra parte, la segunda población de las neuronas DA se encuentra localizada en VTA medial-posterior (PN y PBP medial), proyectando a la corteza prefrontal (CPF), BLA y NAc medial shell y core. La implicación de este grupo de neuronas DA en las conductas relacionadas con el proceso de recompensa y aversión parece ser más complicada y se relaciona con sus diferentes inputs y outputs (Bariselli, Glangetas et al. 2016, Morales, Margolis 2017). Además, estas neuronas presentan una electrofisiología “no

convencional” caracterizada por una corriente h corta y frecuencia de disparo alta (Lammel, Lim et al. 2014).

A pesar de que el VTA siempre se ha definido como una región dopaminérgica, tan sólo alrededor del 60% de las neuronas en el encéfalo de rata son neuronas dopaminérgicas (Margolis, Lock et al. 2006, Swanson 1982). Existen evidencias de que un 30% de neuronas en el VTA se identifican citoquímicamente como neuronas GABAérgicas (Van Bockstaele, Pickel 1995, Carr, Sesack 2000, Margolis, Lock et al. 2006) y un 2-3% de neuronas liberan glutamato (neuronas Glu) (Lavin, Nogueira et al. 2005, Chuhma, Zhang et al. 2004). Además, las neuronas DA presentan la capacidad de liberar más de un neurotransmisor. De esta manera, de acuerdo con los datos optogenéticos las neuronas DA liberan glutamato y GABA en diferente grado (Britt, Bonci 2013).

Múltiples proyecciones GABAérgicas (inhibitorias) y glutamatérgicas (excitatorias

) provenientes de diferentes áreas cerebrales tienen el control mayoritario sobre la actividad de las neuronas DA del VTA. Las neuronas inhibitorias eferentes (GABA) que llegan al VTA tienen su origen en el NAc (Conrad, Pfaff 1976) y en palladium ventral (VP) (Geisler, Zahm 2005). Por otra parte, el VTA recibe los inputs excitatorios (glutamato) desde el núcleo tegmental pedunculopontino y el núcleo laterodorsal tegmental del área tegmental del mesopontino (Paxinos, Watson 2007, Semba, Fibiger 1992), BNST (Georges, Aston-Jones 2002), PFC (Sesack, Pickel 1992), hipotálamo lateral y colículo superior (Geisler, Zahm 2005).

3) VTA-NAc

Entre un 65 y un 85% de las neuronas que proyectan desde **VTA al NAc son dopaminérgicas**, siendo la proyección con la proporción más alta de neuronas DA. Le siguen por orden decreciente en proporción las proyecciones desde el VTA al área septal lateral (75%), amígdala (53%), corteza entorrinal (46%), PFC (30-40%) e hipocampo (6-18%) (Gasbarri, Verney et al. 1994, Fallon, Schmued et al. 1984, Margolis, Lock et al. 2006, Swanson 1982). Por otra parte, las proyecciones GABAérgicas y glutamatérgicas desde el VTA a NAc y PFC también están presentes en gran medida (Lavin, Nogueira et al. 2005, Chuhma, Zhang et al. 2004, Van Bockstaele, Pickel 1995, Carr, Sesack 2000, Margolis, Lock et al. 2006). Algunos estudios demuestran que normalmente un subgrupo de neuronas proyecta a una única diana cerebral (Fallon, Schmued et al. 1984, Margolis,

Lock et al. 2006, Swanson 1982). Además, al igual que el fenotipo molecular de las neuronas del VTA determina el papel que juegan estas neuronas en la recompensa y aversión, la conectividad específica de las neuronas también juega un papel determinante (Brischoux, Chakraborty et al. 2009, Morales, Margolis 2017).

En condiciones fisiológicas normales, las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al NAc liberan la DA en NAc en respuesta a los estímulos reforzantes naturales (comida, bebida, interacciones sociales ...). (Fields, Hjelmstad et al. 2007). La DA liberada se une a los receptores dopaminérgicos localizados en las Neuronas Espinosas de Tamaño Medio (MSN, médium spiny neurons). Esto genera un refuerzo positivo y activa los procesos de memoria y aprendizaje. La regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas es llevada a cabo por la transmisión GABAérgica: las neuronas GABAérgicas del VTA liberan GABA. Cuando GABA se une a sus receptores localizados en las neuronas dopaminérgicas, la liberación de DA a nivel de NAc disminuye. Por otra parte, también existe la regulación de la actividad dopaminérgica por parte del sistema anti-recompensa (sistema Dyn/KOR), sobre la cual hablaremos con más detalle en apartados posteriores.

Las drogas de abuso son reforzadoras, ya que su ingesta produce sensaciones placenteras. Una sustancia de abuso activa el aprendizaje por refuerzo positivo, aumentando la probabilidad de que el individuo vuelva a consumirla con el fin de conseguir su efecto reforzador (Everitt, Robbins 2005). Las propiedades reforzadoras de las drogas de abuso se deben a su actividad a nivel del SML, en concreto a nivel de las neuronas DA que proyectan desde el VTA al NAc. Sin embargo, a diferencia de lo comentado anteriormente, en el caso de las drogas de abuso tiene lugar la aparición de neuroadaptaciones. Se trata de una inhibición de las neuronas GABAérgicas de VTA debida a la unión del derivado metabólico del alcohol, Salsolinol (producto de condensación del acetaldehído, metabolito de etanol, con DA), a los receptores opioides μ (MOR) localizadas en VTA (Sánchez-Catalán, Hipólito et al. 2009, Hipólito, Martí-Prats et al. 2011). Las neuroadaptaciones producidas conducen a una sobreestimulación del circuito dopaminérgico VTA-NAc, siendo esto la primera etapa del desarrollo de adicción (Koob, Le Moal 2005).

1.1.2. Sistema opioide endógeno

La actividad dopaminérgica de las neuronas del VTA también está controlada por el **sistema opioide endógeno (SEO)**. Este sistema juega un papel crucial en los procesos de aprendizaje por refuerzo positivo, regulación del estado de ánimo y desarrollo del abuso de drogas (Gerrits, Lesscher et al. 2003). El SEO incluye tres tipos de receptores opioides (ORs): mu, kappa y delta (MORs, KORs y DORs, respectivamente). Los ORs son recetores acoplados a las proteínas G (GPCRs). Los MOR y DOR son activados por sus ligandos endógenos: encefalinas y endorfinas; mientras que los ligandos endógenos de los KOR son las dinorfinas, péptidos opioides con bloque de leu-encefalina (Tejeda, Bonci 2019, Oka, Negishi et al. 1982, Chavkin, James et al. 1982).

Además, los ORs también pueden ser activados por algunas drogas de abuso. Inicialmente, la investigación se enfocó en los receptores mu y delta ya que se demostró que los opiáceos como la heroína y la morfina son sus potentes agonistas. De hecho, varios estudios llevados a cabo en las ratas knockout (KO) para MOR o con modificaciones farmacológicas en este receptor demostraron el crucial papel de los MOR en la adicción por los opiáceos (Kieffer, Gavériaux-Ruff 2002, Darceq, Kieffer 2018, Charbogne, Kieffer et al. 2014). La activación de MORs (y en menor medida de DORs) produce efectos eufóricos, activando el aprendizaje por refuerzo positivo con potencial adictivo en humanos y en modelos animales (Le Merrer, Becker et al. 2009). Es de destacar que los estudios en MOR KO ratones mostraron una disminución importante de los efectos reforzantes del alcohol, cannabinoides y nicotina, pero no fueron observados cambios significativos para cocaína y anfetamina. Una posible explicación de este fenómeno es la activación de dianas no-opioides por el alcohol, cannabis y nicotina que conlleva una liberación de agonistas endógenos de MOR. Sin embargo, la implicación de los MOR en el caso de la cocaína y anfetamina puede tener un carácter de modulación (Charbogne, Kieffer et al. 2014). En resumen, el aprendizaje por refuerzo positivo inducido por las drogas es mediado por la activación directa (opioides) o indirecta (no-opioides) de los MOR. De hecho, tal y como se menciona en apartados anteriores, en el caso del etanol, se sugiere que la activación de los MOR en el VTA es debida a la acción de Salsolinol (Sánchez-Catalán, Hipólito et al. 2009, Hipólito, Martí-Prats et al. 2011).

No obstante, durante dos décadas muy pocas investigaciones se centraron en los **KOR** debido a que sus agonistas parecían no presentar potencial de abuso. Hoy en día, el

sistema **dinorfina/KOR (Dyn/KOR)** recibe más atención debido al papel que juega en aversión, estado afectivo negativo, alteraciones inducidas por estrés en conductas motivadas y facultades cognitivas, además de efectos psicomiméticos (Massaly, Morón et al. 2016, Karkhanis, Holleran et al. 2017, Crowley, Kash 2015, Carlezon Jr, Krystal 2016, Anderson, Becker 2017, Darcq, Kieffer 2018).

La activación del sistema Dyn/KOR presenta tanto similitudes, como efectos totalmente contrarios a la activación de los MOR. Por ejemplo, la morfina, agonista MOR, ejerce el efecto antinociceptivo en las ratas e incrementa su actividad locomotora; mientras ketocyclazocina, agonista KOR, también produce la antinocicepción, pero reduce la actividad locomotora (Iwamoto 1981). Del mismo modo, el uso de los agonistas MOR en los roedores disminuye la ingesta del agua y leche, mientras que la misma aumenta con el uso de los agonistas KOR (Hartig, Opitz 1983). Desde el punto de vista motivacional, los agonistas KOR inducen efectos aversivos en los humanos y animales, mientras la activación de MOR produce los efectos de recompensa (Zimmer, Valjent et al. 2001, Shippenberg, Zapata et al. 2007, McLaughlin, Marton-Popovici et al. 2003). En cuanto a la neuroquímica, la activación de los MOR aumenta la liberación de la DA, por lo contrario, la activación de KOR la disminuye (Di Chara, Imperato 1988).

A) Sistema Dyn/KOR

1) Dinorfinas

Las dinorfinas son ligandos endógenos de los receptores KOR. Sin embargo, estas moléculas también son capaces de activar otros OR con menor afinidad (Merg, Filliol et al. 2006, Zhang, Tong et al. 1998). Las dinorfinas están ampliamente distribuidas por todo el SNC (Bérubé, Laforest et al. 2013) y participan en muchos procesos fisiológicos: actividad motora, regulación neuroendocrina, función cardiovascular, regulación térmica, respiración, respuesta al estrés y conducta alimentaria (Fallon, Leslie 1986). Existen diversos tipos de dinorfinas: dinorfina A, dinorfina B, gran dinorfina, alfa-neoendorfina y beta-neoendorfina. Todas ellas se obtienen por síntesis endógena a partir de la prodinorfina (Minamino, Kangawa et al. 1981, Merg, Filliol et al. 2006, Kilpatrick, Wahlstrom et al. 1982, Kangawa, Matsuo et al. 1979, Goldstein, Fischli et al. 1981, Goldstein, Tachibana et al. 1979). En función de la región cerebral, la lisis de prodinorfina es llevada al cabo por diversas proteasas no selectivas: catepsina L, PC1, 2 y 3 y CPE

(Minokadeh, Funkelstein et al. 2010, Boudarine, Yegorov et al. 2002, Berman, Mzhavia et al. 2000), dando lugar a diferentes tipos de dinorfinas y otros péptidos derivados de prodinorfina en proporciones variables (Zamir, Weber et al. 1984). Sin embargo, se desconoce qué tipo de dinorfina es responsable de la activación de los KOR y si existen diferencias en liberación de los diferentes péptidos de dinorfina y los procesos de activación de los KOR en las distintas regiones cerebrales.

2) Dyn/KOR y las conductas asociadas a la depresión y la ansiedad

La investigación reciente sugiere que la activación del sistema Dyn/KOR es suficiente y necesaria para el desarrollo **de las conductas asociadas a la depresión y la ansiedad**, propios de un estado afectivo negativo característico de los trastornos psiquiátricos. Veamos algunos ejemplos que lo demuestran.

Los agonistas KOR presentan efectos pro-depresivos y ansiogénicos, mientras que los antagonistas KOR dan lugar a un efecto antidepresivo y ansiolítico (Wittmann, Schunk et al. 2009, Narita, Kaneko et al. 2006, Knoll, Muschamp et al. 2011, Knoll, Meloni et al. 2007, Carr, Lucki 2010, Bruchas, Land et al. 2009). La prueba de natación forzada (FST, forced swimming test) es un método clásico utilizado para el estudio de los fenotipos depresivos (Porsolt, Le Pichon et al. 1977), en el cual el estado depresivo se relaciona con la inmovilidad del animal sometido a la natación forzada. El uso de los antagonistas KOR en este estudio disminuye la inmovilidad del animal, por lo cual, ejerce un efecto antidepresivo (Mague, Pliakas et al. 2003, Reindl, Rowan et al. 2008). La prueba de laberinto en cruz elevado (EPM, elevated plus maze) se utiliza para la evaluación de los niveles de ansiedad en los roedores. Knoll y colaboradores demostraron que el uso del antagonista KOR Nor-BNI da lugar a un efecto ansiolítico en la prueba de EPM (Knoll, Muschamp et al. 2011, Knoll, Meloni et al. 2007). Además, el uso de los antagonistas KOR en EPM puede revertir los efectos ansiogénicos del estrés (Peters et al., 2011). De manera parecida, los antagonistas KOR revierten la acción de los agonistas KOR (Valdez, Harshberger 2012).

Por otra parte, es importante mencionar que la activación de los KOR disminuye las interacciones sociales (Robles, McMackin et al. 2014). Las conductas relacionadas con el déficit de las interacciones sociales son síntomas observados para numerosos trastornos

psiquiátricos. Por el contrario, los antagonistas KOR previenen este déficit inducido por el estrés por fracaso social (Bruchas, Schindler et al. 2011).

El uso de agonistas KOR induce un estado hedónico debido al incremento de los umbrales intracraneales autoestimulantes (Todtenkopf, Marcus et al. 2004, Ebner, Roitman et al. 2010, Carlezon, Béguin et al. 2006) y la aversión condicionada en los modelos animales con la exposición repetida a un entorno neutral (Mucha, Herz 1985).

3) El sistema anti-recompensa: Dyn/KOR

Por otra parte, muchos estudios citados a continuación sugieren que el sistema **Dyn/KOR es un sistema anti-recompensa**. Su existencia es vital para el mantenimiento de la homeostasis entre los sistemas recompensa/anti-recompensa y para el desarrollo correcto de hábitos, proceso de toma de decisiones, emociones y también de la adicción.

En los estudios preclínicos se demostró que la activación de Dyn/KOR produce un estado afectivo negativo, aversión, efectos pro-depresivos y anti-recompensa, además de contribuir al refuerzo negativo que lidia la drogadicción. Se demostró que los KOR están involucrados en los procesos de ingesta, retirada y escalada para varias drogas de abuso, incluyendo al alcohol (Zhou, Colombo et al. 2013). La activación del sistema Dyn/KOR anula los efectos recompensa que producen las drogas de abuso mediante el bloqueo de muchas respuestas conductuales (refuerzo positivo y/o recompensa) y neuroquímicas (incremento extracelular de DA en los centros cerebrales de recompensa) inducidas por su consumo (Shippenberg, Zapata et al. 2007, Gehrke, Chefer et al. 2008, Chefer, Thompson et al. 1999, Chefer., Morón et al. 2000, Chefer, Czyzyk et al. 2005). Las drogas de abuso pueden involucrar el sistema Dyn/KOR en promover el estado afectivo negativo. Ello queda reflejado en el bloqueo del estado afectivo negativo inducido por la retirada de la droga que produce el uso de los antagonistas KOR (Valenza, Butelman et al. 2017, Tejeda, Natividad et al. 2012, Kissler, Walker 2016, Jackson, Carroll et al. 2010, Erikson, Wei et al. 2018).

Es importante mencionar que el **estrés** también es un factor potenciador de las conductas proadictivas. De hecho, el estrés es un factor crítico que activa la búsqueda de droga (Mantsch, Baker et al. 2016). La actividad de los KOR también es crucial para regular las conductas de búsqueda de la droga inducidas por el estrés y la potenciación de la recompensa de la droga (Schindler, Li et al. 2010, Redila, Chavkin 2008, Polter, Bishop

et al. 2014, McLaughlin, Land et al. 2006, McLaughlin, Marton-Popovici et al. 2003, Land, Bruchas et al. 2009). En el caso de ingesta de las drogas de abuso, el sistema Dyn/KOR puede tener un papel del mecanismo homeostático que anula los efectos conductuales y neuroquímicos de las sustancias de abuso. Sin embargo, en presencia del estrés y exposición a las drogas crónicas, el sistema puede sufrir de una desregulación. Esto a su vez puede conducir a la potenciación del estado afectivo negativo y al incremento de reactividad frente al estrés.

4) Circuitos Dyn/KOR en SML y adicción

I. VTA

Los receptores KOR se expresan en diferentes niveles del SNC, sin embargo, su expresión a nivel de la vía mesolímbica es de gran interés para el entendimiento de los procesos de adicción, la recaída en el consumo de sustancias y se erige como nuevo horizonte para la búsqueda de posibles tratamientos.

En el VTA, los KOR se expresan a diferentes niveles: neuronas dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas. La activación de los KOR regula la actividad de estas neuronas, siendo la regulación de las neuronas dopaminérgicas la de mayor interés (Rácz, Markert et al. 2013).

Los estudios electrofisiológicos de los cortes cerebrales (brain-slice electrophysiology) demostraron que la activación de los receptores KOR en las neuronas dopaminérgicas reduce la liberación de la dopamina por parte de éstas (Margolis, Hjelmstad et al. 2003), favoreciendo de esta manera las conductas relacionadas con la hipoactividad dopaminérgica (pro-depresivas, ansiogénicas, estado afectivo negativo, aprendizaje por refuerzo negativo).

Además, la aversión de lugar condicionada y las conductas relacionadas con la adicción también son reguladas por la actividad de los KOR: los ratones con eliminación selectiva de los KOR en las neuronas DA no presentan la aversión de lugar condicionada después de la administración de los agonistas KOR, como lo hace el grupo control (Chefer, Bäckman et al. 2013). Además, la microinyección directa del agonista KOR en VTA produce la aversión por lugar en ratón normal (Bals-Kubik, Ableitner et al. 1993).

Sin embargo, es necesaria más investigación en torno al sistema Dyn/KOR en VTA para mejor entendimiento de los circuitos neuronales e interacciones funcionales.

II. NAc

El sistema Dyn/KOR también juega un papel importante en la regulación de los circuitos neuronales del NAc. En los estudios de microdiálisis llevados al cabo por Spanagel y colaboradores (Spanagel, Almeida et al. 1994) se demostró que la administración del agonista KOR, U-69593, inhibe la liberación de la DA en NAc. Por otra parte, la administración de Nor-BNI (antagonista KOR) aumenta la liberación de DA en NAc. La liberación de DA por las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al NAc también se ve inhibida por la activación de los receptores KOR (Margolis, Hjelmstad et al. 2003). En presencia del estrés, mRNA de prodinorfina se ve incrementado en NAc (Chartoff, Papadopoulou et al. 2009). Tras la exposición al estrés inducido por el estudio del residente intruso (método utilizado para evaluación de agresión ofensiva, conducta ofensiva y violencia en roedores), se observa un incremento del mRNA en el NAc Shell medial y dorsal, lo cual puede promover las conductas inadaptadas en respuesta al estrés (Bérubé, Laforest et al. 2013). De forma parecida, el estrés conduce a la activación dinorfina-dependiente de los KOR en NAc, amígdala basolateral, DR y HIP. Finalmente, Koob y su grupo de investigación descubrieron que la modulación de los KOR a nivel de NAc presenta beneficios terapéuticos potenciales: la escalada en la ingesta de heroína en el modelo de larga duración en ratas es evitada por la administración previa de Nor-BNI (Schlosburg, Whitfield et al. 2013).

III. Los circuitos Dyn/KOR en el SML y las drogas de abuso

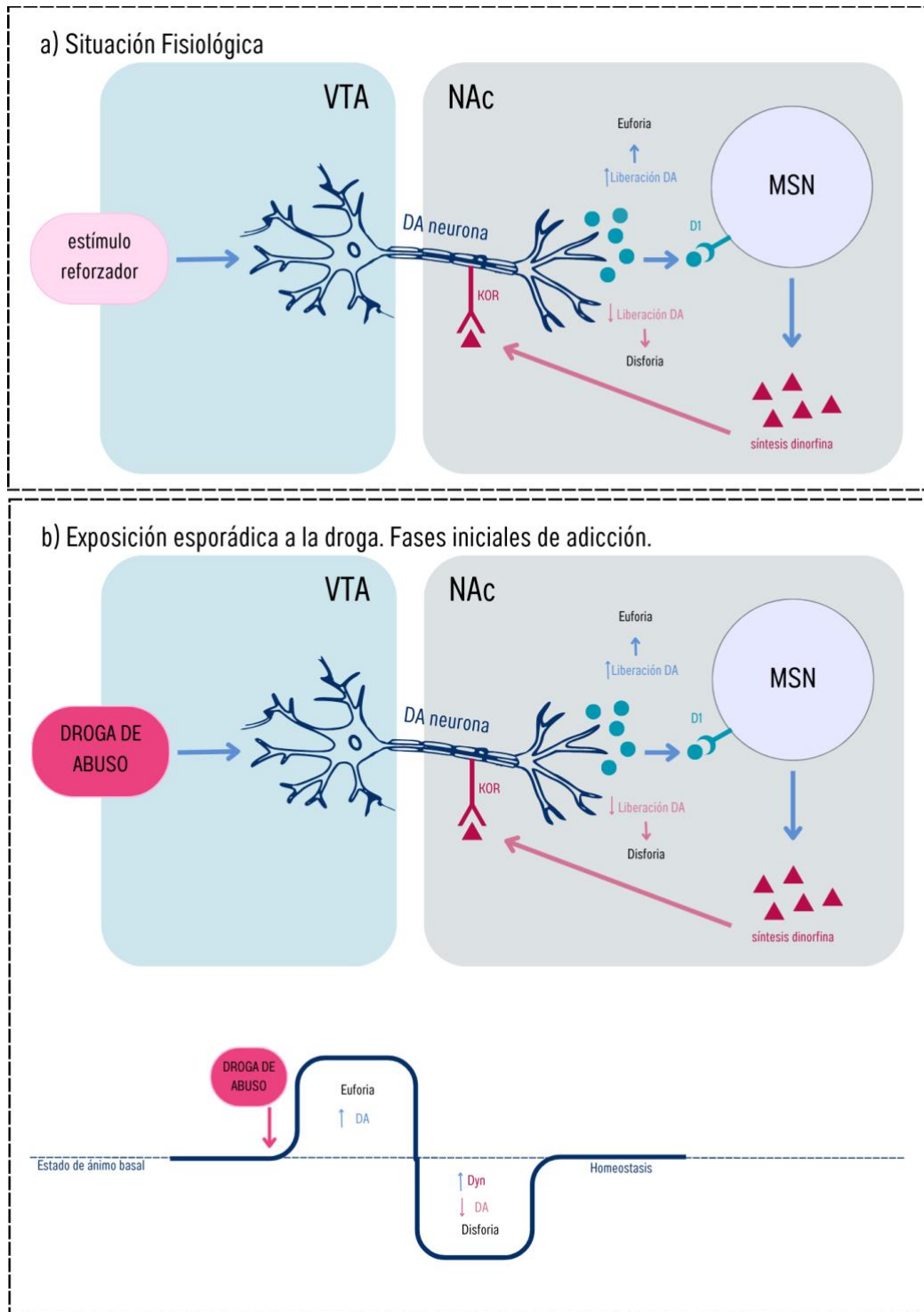
Como se explicó anteriormente en este capítulo, el sistema Dyn/KOR es el sistema anti-recompensa que se encarga de la activación de las conductas relacionadas con la ansiedad y la depresión, características del estado afectivo negativo. Sin embargo, desde el punto de vista fisiológico, este sistema juega un papel regulador (**Figura 1 a**). Cuando el individuo se expone a estímulos placenteros (comida o bebida, interacciones sociales y etc.), se produce la activación de las neuronas DA del VTA, conduciendo a la liberación de DA en las terminaciones presinápticas en NAc. La DA liberada en NAc activa los receptores D1 de las MSN, provocando la despolarización de éstas y, como consecuencia, promoviendo la producción intracelular de la dinorfina. Tal y como se mencionó

anteriormente, las neuronas DA del VTA con proyecciones en NAc disponen de los KOR en su estructura. La dinorfina liberada por MSN activa los KOR de las neuronas dopaminérgicas, dando lugar a la inhibición de la liberación de la DA (Thompson, Zapata et al. 2000, Werling, Frattali et al. 1988, Svingos, Chavkin et al. 2001). El incremento de la liberación de la DA en NAc en respuesta a un estímulo se traduce al efecto eufórico de éste, mientras que la activación del KOR se encarga de devolver el estado de ánimo del individuo a su estado basal gracias a la acción disfórica que conlleva. La actividad conjunta de los sistemas de recompensa y anti-recompensa mantiene el estado de ánimo del individuo en una homeostasis.

Cuando un individuo no dependiente se expone a drogas de abuso de manera accidental, la actividad de los sistemas de recompensa y anti-recompensa es idéntica a la situación fisiológica (**Figura 1 b**). De hecho, en los individuos no dependientes, la activación del sistema anti-recompensa en las etapas iniciales de consumo de alcohol resulta efectiva para reducir su consumo. Durante la adquisición temprana, el uso del agonista KOR (U-50488) simultáneamente con el alcohol, inhibe la preferencia por lugar condicionada por alcohol (Logrip, Janak et al. 2009). Además, el uso crónico de agonistas KOR reduce la ingesta de bebida en el modelo de libre acceso (Lindholm, Werme et al. 2001). Incluso los animales con preferencia por alcohol presentan menor respuesta al etanol cuando son tratados con U-50448 (el mismo efecto es observado para la sacarosa) (Henderson-Redmond, Czachowski 2014). En las fases iniciales del consumo de alcohol u otras drogas, el efecto eufórico actúa como el refuerzo positivo, motivando al individuo a volver a consumir la droga para conseguir el efecto placentero, mientras que la activación del sistema anti-recompensa ayuda a evitar la sobreestimulación del sistema de recompensa.

Sin embargo, cuando la exposición a la sustancia de abuso es prolongada y crónica, aparece la desregulación (alostasis) en el funcionamiento conjunto de los sistemas recompensa/anti-recompensa (**Figura 1 c**). Desde el punto de vista neuroquímico, tiene lugar la sobreestimulación del sistema Dyn/KOR, por lo cual la inhibición de la liberación de la DA es mayor. La disforia cada vez supera más a la euforia, en este punto el individuo se ve motivado a consumir la droga debido a un refuerzo negativo: la ingesta de la droga disminuye el afecto negativo (aunque durante un periodo corto y provocando una mayor disforia como consecuencia). Una de las características de la dependencia a drogas es su consumo a pesar de las consecuencias negativas que el mismo conlleva (disforia). De

hecho, en los animales con dependencia al alcohol se observó la resistencia a la disminución de la ingesta de droga en respuesta a un castigo (adición de quinina a la solución alcohólica, lo que le proporciona un sabor desagradable) (Vendruscolo, Barbier et al. 2012).



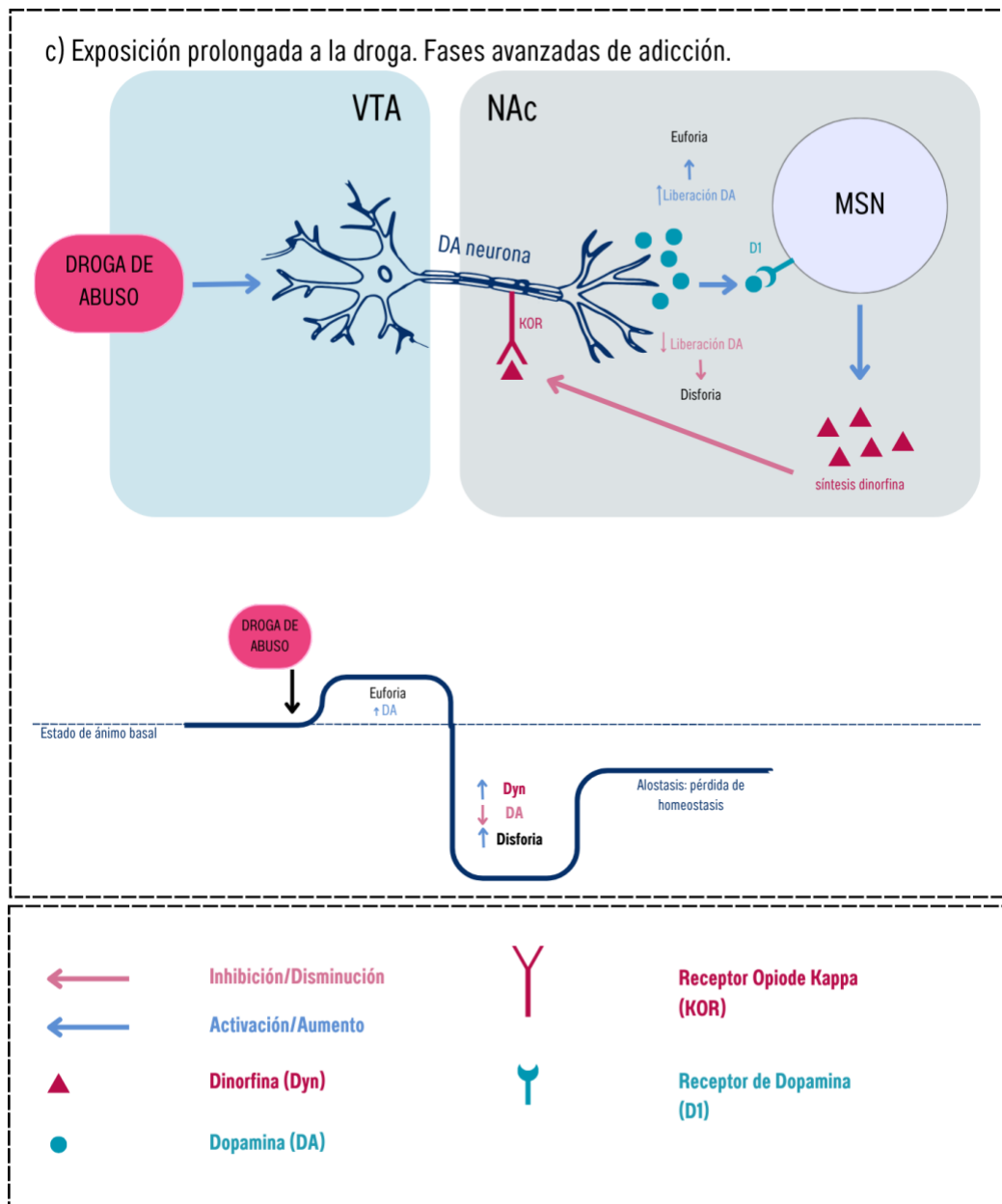


Figura 1: Señalización Dyn/KOR entre VTA y NAc. a) Situación fisiológica; b) Exposición esporádica a la droga. Fases iniciales de adicción; c) Exposición prolongada a la droga. Fases avanzadas de adicción.

Durante el periodo de abstinencia e inmediatamente después de la retirada de la droga, el sistema Dyn/KOR está hiperactivado (Rose, Karkhanis et al. 2016, Karkhanis, Huggins et al. 2016), dando lugar a las conductas relacionadas con el estado afectivo negativo. Esto induce los procesos de búsqueda de la droga durante el periodo de abstinencia y en las etapas avanzadas de dependencia mediante el refuerzo negativo (Karkhanis, Holleran et al. 2017). Cuando la ingesta inicial de alcohol se convierte en dependencia, el uso de agonistas KOR incrementa la conducta de bebida. De esta forma la administración de U50.488 en animales con dependencia al alcohol incrementa su ingesta (Rose, Karkhanis

et al. 2016). Mientras tanto, cuando los animales expuestos crónicamente al alcohol reciben el tratamiento con Nor-BNI (antagonista KOR), la respuesta a la droga en ellos se ve disminuida. Este efecto es mucho más pronunciado en ratas P dependientes que en las ratas P no dependientes (Cashman, Azar 2014). Además, Nor-BNI también reduce la ingesta voluntaria de alcohol en los animales dependientes, pero no en los no dependientes (Walker, Koob 2008, Rose, Karkhanis et al. 2016). Asimismo, el tratamiento con Nor-BNI inhibe el aumento de consumo de alcohol inducido por la abstinencia en los animales con un historial prolongado (16 meses) de exposición al alcohol (Hölter, Henniger et al. 2000).

IV. Sistema Dyn/KOR como potencial diana terapéutica

En términos de adicción alcohólica, la investigación sobre el sistema Dyn/KOR ha ganado importancia en los últimos años. Es interesante que la investigación se enfoca en este sistema como una diana terapéutica potencial (Heilig, Schank 2014, Walker, Koob 2008) y en su papel molecular en la adicción (Faisal, Waseem et al. 2014). En el TCA, el consumo de alcohol y las recaídas son puntos críticos para el tratamiento de esta enfermedad. Paradójicamente, tanto los agonistas como antagonistas KOR han sido propuestos como tratamientos potenciales para esta enfermedad, en función del estadio en el que se encuentre.

Por una parte, como se expuso anteriormente, los **agonistas KOR** resultan efectivos para reducir la ingesta de alcohol en los individuos no dependientes. Se demostró que la activación de los KOR con agonistas (salvinorina A y mesil salvinorina B) reduce la búsqueda de cocaína estimulada por la exposición a la droga después de la autoadministración en ratas (Simonson, Morani et al. 2015, Kivell, Ewald et al. 2014). Tal y como se mencionó anteriormente, la activación de los KOR produce aversión, por lo cual el efecto observado puede ser debido a la reducción de los efectos eufóricos de la cocaína. Además, el castigo “ansiogénico” de la activación de KOR puede reducir los efectos recompensatorios de la droga o del alcohol cuando éstos se administran juntamente con el agonista KOR, llevando a la reducción de la ingesta voluntaria de droga en los animales no dependientes (Nestby, Schoffelmeer et al. 1999, Lindholm, Werme et al. 2001).

A pesar de que en numerosos estudios se observó que la administración de los agonistas KOR puede reducir la ingesta de drogas, este grupo de moléculas no parece ser la mejor opción terapéutica. En primer lugar, la administración de los agonistas KOR ha de ser cercana en el tiempo a la ingesta de la droga o incluso ser realizada conjuntamente, haciendo que este tratamiento sea difícil de manejar para los pacientes con trastornos por consumo de sustancias. En segundo lugar, la acción de estas moléculas se basa en la potenciación del efecto “castigo” de las drogas. Sin embargo, una de las conductas más características del trastorno por consumo de sustancias es el uso de la sustancia a pesar de sus efectos negativos sobre el estado físico y emocional del individuo. Por ello, esta terapia basada en el castigo se convierte en una estrategia de poco interés.

Sin embargo, los **antagonistas KOR** parecen ser una opción terapéutica más prometedora. La autoadministración de alcohol se ve reducida en los ratones que no expresan KOR (Kovacs, Szakall et al. 2005). El uso de los antagonistas KOR en los estudios preclínicos redujo con éxito la ingesta voluntaria de alcohol en animales dependientes (Berger, Williams et al. 2013, Anderson, Lopez et al. 2016, Rose, Karkhanis et al. 2016) y también en los animales expuestos al estrés crónico (Karkhanis, Rose et al. 2016, Anderson, Lopez et al. 2016, Rose, Karkhanis et al. 2016). Asimismo, el bloqueo de KOR inhibe la reiniciación de la búsqueda de cocaína inducida por estrés y reduce la búsqueda de cocaína en los animales expuestos al estrés crónico (Groblewski, Zietz et al. 2015, Graziane, Polter et al. 2013, Rose, Karkhanis et al. 2016). Sin embargo, tal y como se comentó anteriormente, el uso de los antagonistas KOR es exitoso en los animales dependientes, ya que se trata de un grupo de individuos con hiperactividad KOR debido a la exposición prolongada a la droga. Además, es importante mencionar que muchos antagonistas KOR presentan el pico de su actividad varias horas después de la administración y esta puede mantenerse durante varios días (Munro, Berry et al. 2012), por lo cual se trata de un tratamiento a largo plazo. En cuanto a la recaída, otro punto crítico en el TCA, se observó que el sistema Dyn/KOR tiene un papel crucial en la búsqueda de la droga inducida por abstinencia: el uso de JD1c, antagonista KOR, bloquea la búsqueda de la droga y conductas relacionadas con la abstinencia (Schank, Goldstein et al. 2012). Asimismo, la vocalización ultrasónica post exposición alcohólica (un indicador del estado afectivo negativo) es mitigada de forma dosis dependiente por Nor-BNI (Berger, Williams et al. 2013).

1.2.VÍA NARIZ-CEREBRO

Las enfermedades neurológicas (cáncer cerebral, Alzheimer, Parkinson, trastornos por consumo de sustancias, etc.) no sólo son afecciones con prevalencia creciente en la población, sino que también son un gran reto para la farmacología y tecnología farmacéutica en términos de desarrollo e investigación de fármacos y formas farmacéuticas.

El SNC es uno de los órganos vitales y más complejos de nuestro cuerpo, por lo cual está fuertemente protegido de posibles alteraciones desde el exterior. Uno de los sistemas de defensa más importantes del SNC es la barrera hematoencefálica (BHE). Se trata de un sistema de permeabilidad selectiva entre la sangre y SNC, compuesto por las células endoteliales cerebrales (Teleanu, Chircov et al. 2018). Dichas células están conectadas entre sí mediante uniones estrechas (TJ) y uniones adherentes (AJ) (Saraiva, Praça et al. 2016, De Boer, Gaillard 2007, Pardridge 2005, Battaglia, Panciani et al. 2018). Las funciones de este sistema son el mantenimiento de la homeostasis del SNC y la regulación del flujo de sustancias hacia él. De esta forma, el SNC queda protegido de la entrada de toxinas y patógenos (Obermeier, Verma et al. 2016) y provisto de nutrientes (ej: glucosa) (Khanna, Farag 2017). El acceso de los fármacos al cerebro también está condicionado por la BHE, siendo este un factor limitante en la administración de fármacos cuyo efecto se dirige al SNC. Tan sólo moléculas altamente lipofílicas de pequeño tamaño (<500 Da) son capaces de atravesar la BHE. Por ello, menos del 1% de las macromoléculas y sólo alrededor del 2% de moléculas pequeñas de fármacos son capaces de atravesarla (Agrawal, Das et al. 2012, Khanna, Farag 2017, Pardridge 2005). De esta forma, la BHE impide el acceso del 95% de moléculas de fármacos (Krishan, Gudelsky et al. 2014), aunque aparte de ser permeable a pequeñas moléculas lipófilas, también dispone de algunos transportadores específicos (Mittal, Ali et al. 2014, Lochhead, Thorne 2012).

La existencia de la BHE es un punto crítico en el desarrollo de los tratamientos para las afecciones del SNC. La baja biodisponibilidad de los fármacos para esta vía supone el uso de dosis mayores y administradas por vías periféricas, dando lugar a mayores costes de tratamiento y a un mayor riesgo de efectos adversos y de toxicidad.

Tradicionalmente, las inyecciones intratecales, intracerebroventriculares o intraparenquimales se usaban para la administración directa al SNC de fármacos con baja

biodisponibilidad. Además, se practicó el uso de dispositivos médicos implantados para llevar a cabo una administración crónica de fármacos directamente al cerebro. Sin embargo, se trata de técnicas invasivas con riesgo de infecciones (Sgouros, Charalambides et al. 2010).

1.2.1. Cavidad Nasal

La nariz es un órgano complejo desde el punto de vista funcional y estructural y hospeda uno de los cinco sentidos que tienen los seres vivos: el olfato. El olfato es imprescindible para la detección de alimentos o depredadores en el mundo animal y también es de gran importancia para el ser humano (Crisler, Johnston et al. 2020, Axel 2005).

La estructura de la cavidad nasal del ser humano es comparable con la de los roedores, los animales usados de forma mayoritaria en los laboratorios de investigación. La cavidad nasal de un humano adulto mide unos 12-14 cm en longitud y se extiende desde las fosas nasales hasta la nasofaringe. Se divide en dos partes por el tabique nasal. La pared exterior de cada cavidad presenta tres huesos, llamados cornetes: superior, medio e inferior. Los cornetes están revestidos de mucosa y tienen una superficie de alrededor de 160 cm². La mucosa en cuestión se encarga de humidificar, filtrar y calentar el aire inhalado (Lochhead, Thorne 2012). En la cavidad nasal están presentes cuatro tipos de epitelios: escamoso, olfatorio, respiratorio y transitorio. El **epitelio transitorio** separa el epitelio escamoso del epitelio respiratorio y el epitelio respiratorio del olfatorio, y no presenta cilios.

La cavidad nasal se puede dividir en tres regiones: vestibular, respiratoria y olfatoria. Desde el punto de vista de la administración de fármacos por la vía nariz-cerebro, la región olfatoria es la de mayor interés, seguida por la región respiratoria.

El **vestíbulo nasal**, situado entre la fosa nasal y el cornete inferior, está cubierto por el epitelio escamoso. Se trata de un epitelio estratificado, su mucosa presenta glándulas sebáceas y vello, con pocos cilios o, incluso, sin ellos.

La **región respiratoria** es el área más grande (aprox. 150 cm²) y se ubica en las regiones laterales de la nariz. El epitelio respiratorio es un epitelio columnar pseudoestratificado con muy elevada vascularización. Las células que componen este epitelio son las células secretoras del moco, las células ciliadas, las células columnares no ciliadas y las células

basales. En el ser humano la región respiratoria supone un 80-90% de la superficie de cavidad nasal, mientras que en los roedores es un 50%. Una de las características importantes de esta región es la existencia del aclaramiento mucociliar.

En la región respiratoria, nos encontramos con una estructura neural de gran importancia para la administración de fármacos por la vía nariz-cerebro: el nervio trigeminal. El nervio trigeminal (V), también conocido como quinto nervio craneal, tiene tres ramas principales: nervio oftálmico (V1), nervio maxilar (V2) y el nervio mandibular (V3). Las ramas V1 y V2 inervan la mucosa nasal vía rama etmoidal (V1), nasopalatina (V2) y nasal (V3) (Bojsen-Møller 1975).

La **región olfatoria** supone unos 10 cm² en la cavidad nasal del ser humano (Chamanza, Wright 2015, Harkema, Carey et al. 2006, Mygind, Dahl 1998, Crisler, Johnston et al. 2020). El epitelio olfatorio (EO) se sitúa en la parte superior de la cavidad nasal y es la zona del primer contacto de la información ambiental (olores) con el cuerpo. Esta región es más extensa en los roedores (hasta 50%) que en los seres humanos (10%) (Crowe, Greenlee et al. 2018, Pires, Fortuna et al. 2009, Chamanza, Wright 2015). El EO presenta varios tipos celulares: las glándulas de Bowman (secretan el moco que reviste la mucosa olfatoria), las células basales horizontales y las células basales globosas (localizadas cerca de la lámina propia y actúan como las progenitoras de otros tipos celulares).

En esta región se localizan las neuronas sensoriales olfativas (NSO) que se encargan de detectar olores en el aire inhalado. Las NSO son neuronas bipolares, sin mielina y están rodeadas por las células de apoyo y células basales. En la superficie de la mucosa, las NSO disponen de cilios olfatorios, encargados de la detección de los olores. Cada neurona olfatoria expresa un único gen para ser receptora de un tipo de olor (existen más de 1000 genes para cada tipo de olor). Las neuronas que expresan el gen para el mismo olor convergen en glomérulos del bulbo olfativo para la organización de la información olfativa.

Los axones de las neuronas olfatorias pasan a través de la lámina cribiforme del hueso etmoides (el hueso que separa la cavidad nasal del cerebro) directamente al bulbo olfatorio (Keller, Merkel et al. 2022, Moon, Yoo et al. 2014). Los axones se quedan rodeados por la glía envolvente olfatoria que, a su vez, está cubierta adicionalmente por

la capa de fibroblastos neurales. La capa de los fibroblastos neurales cubre los axones de NSO hasta el bulbo olfatorio (Field, Li et al. 2003).

1.2.2. Administración de fármacos por la vía Nariz-Cerebro

La administración de los fármacos por la vía intranasal (IN) es una estrategia que ganó mucho interés en las últimas décadas en la investigación (Keller, Merkel et al. 2022). La vía intranasal presenta ventajas con respecto a otras vías de administración, incluyendo la vía oral. Se trata de una vía de administración no invasiva y asequible.

Los fármacos pueden ser administrados por la vía nasal con el fin de conseguir una acción local, una acción sistémica o una acción central. Los fármacos administrados para conseguir efecto local a nivel nasal son muy conocidos y su uso en la práctica está muy extendido. Mayoritariamente se usan para combatir los síntomas de rinitis de diferente origen (vasoconstrictores y glucocorticoides).

Los fármacos también se administran por vía nasal para la consecución de una acción sistémica en un amplio abanico de patologías: migrañas, dolores de cabeza, terapia de sustitución hormonal y tratamientos de rescate para los ataques epilépticos (Ghadiri, Young et al. 2019, Stamegna, Girard et al. 2014). Debido a la elevada vascularización de la mucosa nasal, los fármacos IN de acción sistémica presentan una rápida absorción y un inicio de acción del efecto terapéutico rápido, lo cual supone una gran ventaja. Además, para ciertos tipos de moléculas (de bajo peso molecular) la biodisponibilidad por vía IN es alta y presenta poca variabilidad (Behl, Pimplaskar et al. 1998, Costantino, Illum et al. 2007). Por otra parte, los fármacos administrados por esta vía evitan el primer paso hepático, permitiendo aumentar biodisponibilidad (Grassin-Delye, Buenestado et al. 2012, Schwarz, Merkel 2019, Pires, Fortuna et al. 2009).

Para los fármacos con acción central, la administración IN permite reducir los efectos adversos por la menor exposición periférica al fármaco y la especificidad con la que se dirige a su diana (Agrawal, Saraf et al. 2018).

Uno de los argumentos más importantes para la investigación de la vía IN en el tratamiento de las afecciones del SNC es la posibilidad de evitar el paso por la BHE. Aunque se trata de una vía de administración muy prometedora, presenta limitaciones que pueden condicionar la eficiencia de la administración. Por ello, gran parte de la

investigación en este campo, está dirigida a disminuir estos factores limitantes, tanto desde el punto de vista de las formulaciones (tecnología farmacéutica), como el de los dispositivos (Grassin-Delye, Buenestado et al. 2012, Schwarz, Merkel 2019).

El estudio de mecanismos de transporte desde la nariz hacia el cerebro gana interés con el avance en el conocimiento de las diferentes enfermedades neurológicas y ello justifica el estudio sobre esta vía de administración.

En 1991, William Frey III propuso la primera patente de administración de un fármaco por vía nasal para el tratamiento de enfermedades neurológicas a nivel cerebral (Frey 1991). Desde entonces, se han realizado numerosos estudios que muestran el gran potencial de esta vía para el tratamiento de afecciones como el Alzheimer (Rabiee, Ahmadi et al. 2021, Pang, Lin et al. 2016, Maimaiti, Anderson et al. 2016, Dubey, Lakshmi et al. 2020). Sin embargo, no se conoce con exactitud los mecanismos a través de los cuales se produce el transporte de los fármacos hacia el SNC.

Los fármacos administrados por la vía intranasal acceden al SNC a través de dos estructuras morfológicas: mucosa olfatoria y mucosa respiratoria. Existen tres rutas de transporte de sustancias desde la nariz hasta el SNC: intracelular, paracelular y transcelular (**Figura 2**).

La ruta intracelular transporta las moléculas a través de las NSO (epitelio olfatorio) o a través del nervio trigeminal (epitelio respiratorio), utilizando los mecanismos de pinocitosis y endocitosis para permitir la entrada de la sustancia a transportar al interior de la neurona (Crowe, Greenlee et al. 2018). Una vez dentro de la NSO (o nervio trigeminal), la molécula es transportada por el axón hasta llegar al bulbo olfatorio, desde donde puede ser distribuida por el cerebro. Moléculas con un amplio rango de tamaños pueden ser transportados por esta vía: se han realizado estudios de endocitosis con insulina (5,8 kDa) (Renner, Svitak et al. 2012), partículas de oro (50 nm) (De Lorenzo 2008) y sales de aluminio (Perl, Good 1987).

La ruta paracelular tiene lugar a nivel del epitelio olfatorio. En este caso, la entrada al SNC puede producirse por las uniones que rodean al tracto de las NSO (Wu, Hu et al. 2008) y es llevada hasta la lámina propia, donde tiene lugar su absorción. Otra opción es la entrada del fármaco a través de las uniones estrechas entre las células epiteliales y su llegada hasta la lámina propia. Una vez en la lámina propia, las sustancias pueden entrar

en la circulación sistémica tras ser absorbidos en los vasos sanguíneos locales, o bien dirigirse hacia la circulación linfática. Sin embargo, en la mayoría de casos son translocadas a través del espacio perineural (situado entre la glía envolvente olfatoria y los fibroblastos neurales del bulbo olfatorio). Este espacio conduce el fármaco hacia el espacio subaracnoideo del cerebro, desde donde se distribuye por el SNC (Crowe, Greenlee et al. 2018). Esta vía puede ser utilizada por los péptidos como la insulina (5,8 kDa), IGF-1 (7,5 kDa), la albumina (65 kDa) e incluso algunas células madre (Lochhead, Kellohen et al. 2019, Galeano, Qiu et al. 2018, Falcone, Salameh et al. 2014, van Velthoven, Kavelaars et al. 2010, Thorne, Pronk et al. 2004).

La vía transcelular, por su parte, consiste en la entrada de las sustancias hacia el interior de las células del soporte mediante mecanismos de endocitosis o pinocitosis. Su transporte a través del interior de la célula hasta la lámina propia, y la posterior distribución del fármaco sigue los mismos pasos que la ruta paracelular.

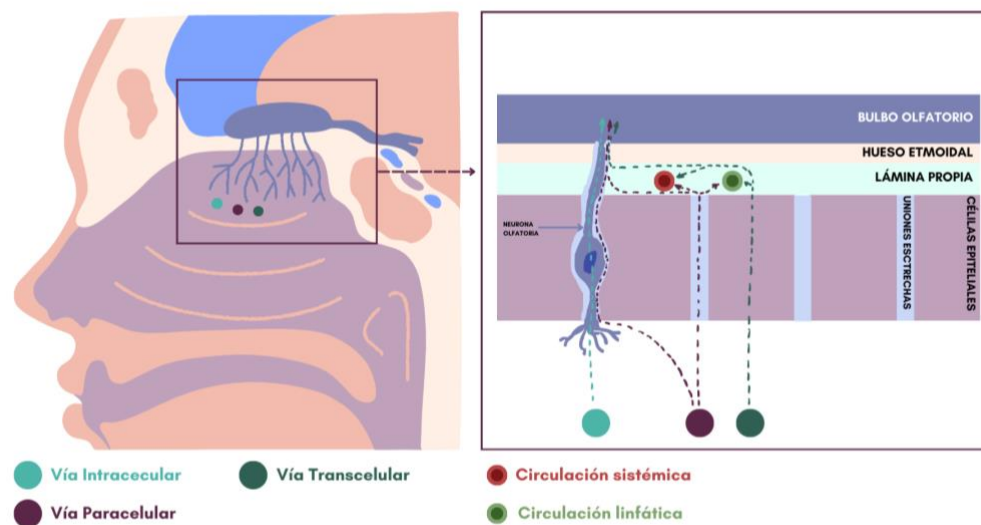


Figura 2: Rutas de transporte de sustancias por la vía Nariz-Cerebro

A) Vía intranasal: limitaciones

Aclaramiento mucociliar. El aclaramiento mucociliar es un mecanismo de defensa de gran importancia que posee la cavidad. Tiene lugar a nivel de la mucosa respiratoria. El moco producido por las células secretoras del moco atrapa en su interior los agentes xenobióticos (cuerpos extraños, alérgenos, sustancias tóxicas y etc.), mientras que el

movimiento ciliar mueve el moco hacia la nasofaringe con una velocidad aproximada de 5 mm por minuto (Shipper, Coos Verhoef et al. 1991), donde es deglutido.

El moco tiene un pH ligeramente ácido (5,5-6,5) (Khutoryanskiy 2011) y una composición compleja: 95% agua, 2% mucina, 1% sal, 1% albúminas, lisozimas, lactoferrinas, inmunoglobulinas y lípidos (Kaliner, Marom et al. 1984). El aclaramiento mucociliar es un paso limitante a tener en cuenta para los fármacos administrados por la vía intranasal: puede disminuir el tiempo de residencia del fármaco en la mucosa de interés y la deglución del fármaco supone una posible aparición de efectos adversos periféricos. Sin embargo, se trata de un mecanismo de defensa de gran importancia cuya alteración funcional podría tener gran impacto para la salud. Por ello, el aclaramiento mucociliar es un paso limitante que hay que tener en cuenta a la hora de elaborar la forma farmacéutica sin generar una alteración perjudicial para la salud del paciente.

Estado de la mucosa nasal. La capacidad de absorción de la mucosa nasal depende de su estado. Puede ser modificada por los factores ambientales, como son la temperatura y la humedad, pero también es importante tener en cuenta posibles alteraciones patológicas (infecciones de las vías respiratorias altas, alergias) y por los fármacos utilizados para el alivio de estas patologías. Estos dos últimos factores, pueden modificar la absorción a través de la mucosa nasal debido a la alteración del flujo sanguíneo que producen. Dicha alteración en la circulación de los vasos de la nariz da lugar a cambios en la humidificación y termorregulación de la cavidad nasal.

Existen varios ejemplos de fármacos usados en la práctica clínica como son los vasoconstrictores (usados para combatir la congestión nasal de procesos infecciosos y/o alérgicos) y los corticoides (usados en el tratamiento de rinitis alérgica). Ambos grupos de fármacos disminuyen el flujo sanguíneo a través de la mucosa nasal, pudiendo producir cambios en la interacción de esta mucosa con otros fármacos.

Degradación enzimática. Aunque uno de los factores que hacen que la vía intranasal sea tan interesante para la administración de los fármacos es la posibilidad de evitar las pérdidas del fármaco debidas al primer paso hepático, hemos de tener en cuenta que la propia mucosa nasal presenta un gran repertorio de enzimas. Nos podemos encontrar con diversas peptidasas, proteasas e incluso con citocromo P-450 nasal. Todos ellos pueden dar lugar a un pseudo primer paso hepático.

Pequeños volúmenes de trabajo. Hoy en día, la administración de los fármacos por la vía nariz-cerebro está limitada a las moléculas potentes. Estas se administran dispersas o disueltas en pequeños volúmenes de líquido ya que el volumen máximo a administrar por la fosa nasal es de 0,4 ml para el ser humano, 40-100 μ l para la rata y 24 μ l para el ratón (van Woensel, Wauthoz et al. 2013).

Distribución intracerebral. Una vez el fármaco administrado por la vía IN accede al SNC, se encuentra con un nuevo paso crítico: llegar a su diana terapéutica por el parénquima cerebral. A menudo los fármacos para el tratamiento de las afecciones del SNC tienen que superar grandes distancias (milimétricas) para llegar desde el punto de entrada al SNC hasta su diana terapéutica a través del espacio extracelular cerebral (Wolak, Thorne 2013, Nicholson 2001). Este hecho dificulta la posibilidad de una dosificación constante y dirigida a un lugar concreto. El espacio extracelular del cerebro supone un 20% de su volumen, por lo cual la interacción del fármaco con este espacio es de gran importancia para una distribución y dosificación correcta del mismo (Tønnesen, Inavalli et al. 2018, Wolak, Thorne 2013). Diversas características del fármaco pueden condicionar esta interacción. Sin embargo, el uso de la nanotecnología puede mejorar la distribución intracerebral del fármaco (Helmbrecht, Joseph et al. 2020).

B) Formulación problema

En los apartados anteriores se expuso la importancia de la vía de administración Nariz-Cerebro para el tratamiento de diversas afecciones del SNC. El TCA y las recaídas en el consumo de alcohol es una afección neurológica de creciente prevalencia en todo el mundo con un gran impacto en la calidad de vida de la persona afectada y en la sociedad en global.

En el caso del trastorno por consumo de sustancias, las estructuras neuronales implicadas en el proceso del desarrollo de la enfermedad y las alteraciones funcionales que producen, están suficientemente reportados. Estos conocimientos, permiten definir de forma eficiente posibles dianas para las terapias anti-TCA y anti-recaída.

En este trabajo el sistema Dyn/KOR se ha elegido como potencial diana terapéutica, ya que numerosos estudios previos han mostrado resultados exitosos del uso de antagonistas KOR en animales con dependencia ya existente. Sin embargo, como cualquier fármaco, los antagonistas KOR presentan diversas reacciones adversas, sobre todo a nivel

periférico. Uno de los efectos periféricos más importantes de los antagonistas KOR es el prurito, seguido de dispepsia y cefalea (Reed, Butelman et al. 2018, Lowe, Wong et al. 2014, Cowan, Yosipovitch 2015). La administración directa del antagonista KOR al SNC puede ser una gran oportunidad para evitar la aparición de estos efectos adversos, mejorando de esta manera la adherencia al tratamiento.

Cuando nos referimos a antagonistas KOR, nos encontramos con dos grupos principales de moléculas: los antagonistas KOR de corta duración y los antagonistas KOR de larga duración. En los de corta duración, el bloqueo de KOR se produce rápidamente ($t_{max} < 2$ h en función de la dosis empleada) y la duración del efecto es de unas pocas horas. Por otra parte, los antagonistas de larga duración tienen un inicio de efecto retardado (delayed onset, entre horas y días) incluso siendo administrados intracranealmente (Munro, Berry et al. 2012), y su duración es prolongada (hasta 28 días). La duración de efecto más larga resulta de interés para mejorar la adherencia y simplificar la posología en los pacientes (siempre y cuando se pueda minimizar los efectos adversos).

Como fármaco objeto de estudio ha sido elegido **norbinaltrofimina (Nor-BNI)**, antagonista KOR selectivo de larga duración. Se trata de una molécula con una solubilidad en agua intermedia-baja (>45 mmol/L a 25°C), ligeramente lipófila ($\text{LogD}_{7,4}$ octanol-agua=1,5) (Munro, Berry et al. 2012), con peso molecular de 734,71 g/mol, comercializada en forma de dihidrocloruro. Los estudios muestran que Nor-BNI es capaz de atravesar la BHE en cierta medida (Kishioka, Kiguchi et al. 2013). Sin embargo, el uso de nanotecnología podría mejorar la adsorción de este fármaco por la vía nariz-cerebro ya que sus características fisicoquímicas no resultan especialmente favorables para su administración en forma libre. En este estudio se decidió encapsular Nor-BNI en el interior de un liposoma convencional, ya que el uso de estos nanovectores para la administración nariz-cerebro mostró éxito según otros autores (van Woensel, Wauthoz et al. 2013).

Finalmente, para subsanar posibles pérdidas de la formulación a nivel de la mucosa nasal, se decidió incorporar los liposomas cargados de Nor-BNI a la matriz de un gel termosensible (se gelifica en respuesta al incremento de la temperatura) mucoadhesivo. La formulación del fármaco en gel permite incrementar el tiempo que está la fórmula en la mucosa de interés, favoreciendo la absorción del principio activo y evitando la deglución de altas dosis del fármaco.

1.3. LIPOSOMAS

Las vesículas lipídicas son estructuras preparadas artificialmente que presentan tamaños de escala nanométrica. Consisten en una o varias bicapas lipídicas que encierran en su interior un compartimento acuoso. Las vesículas lipídicas permiten incorporar en su interior fármacos de diferente naturaleza (tanto lipófilos, como hidrófilos). Son estructuras biodegradables y biocompatibles.

Inicialmente, las vesículas lipídicas se usaban ampliamente en la industria cosmética (Camilo, Leite et al. 2020). Con el estudio y mayor conocimiento de estas estructuras, empezó a plantearse su uso como vectores para el transporte de fármacos. Las vesículas lipídicas se usan para proporcionar una administración controlada y dirigida de los fármacos, además de permitir mejoras en biodisponibilidad (Chacko, Ghate et al. 2020), sobre todo para los fármacos con baja solubilidad (Abd, Roberts et al. 2016, Mohammed, Weston et al. 2004). Por otra parte, la incorporación de los fármacos al interior del vector lipídico permite incrementar su estabilidad (Sercombe, Veerati et al. 2015) y evitar una posible degradación por factores externos (Arsalan, Ahmad et al. 2020). Existen diversos tipos de vesículas lipídicas, pero en este trabajo nos centraremos en los liposomas convencionales.

Los liposomas se obtuvieron por primera vez en 1960 por Bangham (Bangham 1993). La bicapa lipídica de los liposomas convencionales tiene una estructura parecida a la membrana celular (Puri, Loomis et al. 2009).

Los lípidos que forman esta membrana son fosfolípidos y colesterol, al igual que pasa en las células. Las características del liposoma (tamaño, rigidez, capacidad para incorporar el fármaco, capacidad para liberar el fármaco y otros) van a depender de su composición: proporción fosfolípidos/colesterol utilizada, el tipo de fosfolípido, etc. Los fosfolípidos juegan un papel estructural, dando lugar a la bicapa lipídica del liposoma, mientras que el colesterol juega un papel estabilizador. La proporción del fosfolípido/colesterol en el liposoma puede oscilar entre 0 y 25% (w/w) (Wu, Bala et al. 2019). Las moléculas de los fosfolípidos son unas estructuras anfifílicas, es decir, presentan una cola hidrofóbica y una cabeza hidrofílica.

Gracias a la estructura de los fosfolípidos, los liposomas pueden incorporar en su interior tanto los fármacos hidrófilos, como lipófilos (Tian, Chiu 2018). Además, la presencia de

los fosfolípidos permite que los liposomas puedan dispersarse de manera espontánea en el medio acuoso. En función de los grupos funcionales de la cola no-polar y la cabeza polar de los fosfolípidos, podemos encontrarnos con diversos tipos de fosfolípidos: ácidos fosfatídicos, fosfatidil glicerol, fosfatidil colina, etc. Cada tipo de fosfolípido proporciona unas propiedades a los liposomas resultantes en cuanto a permeabilidad, estabilidad y rigidez (Ahmad, Ahsan 2020, Perumal Chandaran, Natarajan et al. 2014).

Como ya se ha comentado anteriormente, la proporción del colesterol en el liposoma también condiciona sus características finales. Por ejemplo, a mayor cantidad del colesterol, menor es la capacidad del liposoma para incorporar los fármacos lipófilos, ya que estos compiten por el sitio en la bicapa lipídica con el colesterol (Ali, Kirby et al. 2010). La rigidez del liposoma se ve afectada por el fosfolípido utilizado y por la proporción del colesterol empleada, siendo la rigidez más elevada cuanto más alta es la proporción del colesterol (Leite, Martins et al. 2018). La liberación del fármaco, a su vez, también depende de la rigidez del liposoma: a mayor rigidez, menor liberación de fármaco (Guillot, Jornet-Mollá et al. 2021). También, la rigidez de la membrana del liposoma puede condicionar la capacidad del mismo para llegar al sitio de acción. Por ejemplo, los liposomas algo más rígidos dan mejores resultados de penetración tumoral e incremento en actividad antitumoral (Wu, Yu et al. 2019).

Por otra parte, algunas de las características de los liposomas, como morfología y tamaño, no sólo dependen de la composición, sino que también del proceso de elaboración.

Las vesículas lipídicas pueden incorporar otros componentes en su estructura, las cuales modificarán sus propiedades. Un ejemplo son los agentes tensioactivos, utilizados en la fabricación de los transferosomas (Lee, Kim et al. 2005). La adición de tensioactivos proporciona mayor deformabilidad a las vesículas. Por otra parte, para la obtención de las vesículas multicapa de pequeño tamaño se fabrican los etosomas: sistemas compuestos de fosfolípidos, agua y un alcohol volátil (hasta 50% w/w). Para tratamientos tópicos, se formulan glicerosomas, que incorporan glicerol en una fase acuosa (Manca, Cencetti et al. 2016), permitiendo incrementar la flexibilidad de las vesículas y proporcionar las propiedades humectantes a la formulación final.

Los liposomas pueden incorporar componentes que proporcionan carga a la membrana, como son el ácido oleico o DOTAP. Los liposomas cargados dan mejores resultados de

estabilidad en el proceso de almacenamiento (San, Yang et al. 1993). Además, ayudan a mejorar la llegada de macromoléculas con carga a su lugar de acción. En el caso del ADN y ARN, moléculas de gran tamaño cargadas negativamente tienen bastante restringida la entrada al interior celular por difusión pasiva, sin embargo, el uso de los liposomas catiónicos ayuda a solventar este problema (Majzoub, Ewert et al. 2016). Los liposomas aniónicos, a su vez, mejoran la penetración a través del estrato córneo en las formulaciones para administración transdérmica (González-Rodríguez, Rabasco 2011). La adición de compuestos como polivinil alcohol, polietilenglicol y ácido hialurónico (Sunamoto, Iwamoto 1986) a la superficie de los liposomas estabiliza los liposomas, mejorando su distribución y acumulación en el lugar de acción (Vaage, Donovan et al. 1993, Paolino, Cosco et al. 2010, Allen 1994, Rangger, Helbok et al. 2012). Finalmente, nos podemos encontrar con los liposomas de targeting activa que incorporan ligandos y otras estructuras que actúan incrementando la selectividad del liposoma a la hora de interaccionar con el tejido u órgano diana (Nsairat, Khater et al. 2022).

1.3.1. Clasificación

Los liposomas se pueden clasificar en función de diversos parámetros. La clasificación más utilizada es en función de su estructura: número de bicapas lipídicas que contiene y tamaño. En base a ello, existen cuatro clases de liposomas: unilamelares pequeños, unilamelares grandes, multilamelares y multivesiculares (**Figura 3**).

En primer lugar, encontramos los liposomas unilamelares, los cuales contienen sólo una bicapa lipídica y un núcleo acuoso central (Joshi, Hussain et al. 2016). En función del tamaño, se dividen, a su vez, en dos grupos: los liposomas unilamelares pequeños (SUV, <100 nm) y grandes (LUV, 100-1000 nm). Las LUV presentan un núcleo acuoso de mayor tamaño, por lo cual tienen mayor capacidad para la incorporación de fármacos hidrófilos que las SUV.

Los liposomas multilamelares presentan más de una bicapa lipídica y el mismo número de compartimentos acuosos. Estos liposomas suelen ser más grandes (hasta 1 µm).

Los liposomas multivesiculares es el cuarto tipo de liposomas y consiste en una bicapa de mayor tamaño que engloba en su interior múltiples vesículas lipídicas. Para los activos hidrófilos, la eficacia de encapsulación es inversamente proporcional al número de bicapas y directamente proporcional al tamaño del liposoma (Ong, Ming et al. 2016).

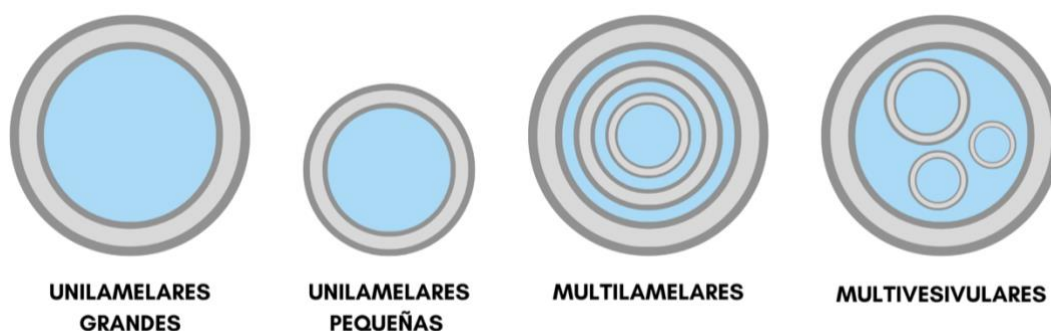


Figura 3: Clasificación de los liposomas

1.3.2. Preparación

El proceso de la elaboración del liposoma es, junto con su composición, un criterio determinante de las características del liposoma resultante (Bhupendra Pradhan, Narendra Kumar et al. 2015). Existen numerosos métodos para fabricar liposomas: evaporación de la fase reversa, inyección de disolventes, eliminación del detergente, deshidratación-rehidratación, calentamiento, cambio de pH, canal microfluídico y de fluidos supercríticos.

Para la realización de este trabajo, se ha empleado el método más clásico de elaboración de los liposomas: el método de la película fina, conocido también como el método de Bangham. En este método, los componentes hidrofóbicos (lípidos formadores de la membrana y fármacos hidrofóbicos, en su caso) se disuelven en un disolvente orgánico apropiado en un matraz de fondo redondo (Large, Abdelmessih et al. 2021). A continuación, el disolvente orgánico se evapora a baja presión atmosférica en un rotavapor, dando lugar a la formación de una película fina en las paredes del matraz (Akbarzadeh, Rezaei-Sadabady et al. 2013). Después, la película se rehidrata mediante la adición de un disolvente acuoso (puede contener un fármaco hidrófilo para su incorporación al núcleo acuoso del liposoma). Todo el proceso se lleva a cabo a la temperatura de transición del fosfolípido empleado. La velocidad de rehidratación es determinante para la eficacia de encapsulación del fármaco (Bhupendra Pradhan, Narendra Kumar et al. 2015), siendo más alta cuanto más lento es el proceso (Large, Abdelmessih et al. 2021).

El **proceso de purificación** es el siguiente paso en el proceso de la producción de los liposomas. Hablaremos brevemente de este paso, aunque ha sido obviado en este trabajo

de investigación tanto para evitar la degradación del fármaco de interés, como para aprovechar del fármaco libre para su administración.

La purificación sirve para la eliminación del exceso de componentes no incorporados (Akbarzadeh, Rezaei-Sadabady et al. 2013) y garantiza la obtención de una formulación de alta calidad (Güven, Ortiz et al. 2009). Sin embargo, este proceso presenta numerosos inconvenientes, como la disminución del rendimiento o la dilución de las vesículas (Dimov, Kastner et al. 2017).

La mayoría de los métodos empleados se basan en la diferencia del peso molecular entre las vesículas grasas y el fármaco. La elección del método de purificación más adecuado para no alterar la formulación final es un reto y se lleva a cabo teniendo en cuenta las características fisicoquímicas del fármaco y el destino final del liposoma. Los métodos más usados son: diálisis, centrifugación, ultrafiltración y cromatografía por exclusión de tamaño.

El método de **diálisis** consiste en la eliminación de moléculas libres de la dispersión liposomal mediante el empleo de una membrana semipermeable que permite el paso de estas moléculas a su través, mientras que impide el paso de los liposomas debido a su mayor tamaño (Adamala, Engelhart et al. 2015). Este método es el más adecuado para las moléculas hidrófilas, aunque también es posible aplicarlo a las hidrófobas. Se trata de un método lento, ya que se necesitan al menos 24 horas para asegurar la retirada completa del fármaco libre (Shariat, Badiie et al. 2014, Guillot, Jornet-Mollá et al. 2021).

La **centrifugación**, consiste en la aplicación de una fuerza centrífuga para la separar los componentes de la dispersión liposomal en función del peso. Los componentes libres suelen quedarse en el sobrenadante. La centrifugación excesiva puede dañar los liposomas y provocar pérdidas del fármaco incorporado.

El método de **ultrafiltración** consiste en la combinación de la centrifugación con el paso de las moléculas libres a través de una membrana semipermeable (diálisis) (Gonzalez Gomez, Syed et al. 2019). Es un método especialmente adecuado para las moléculas hidrófilas.

La **cromatografía por exclusión** de tamaño consiste en la separación de los componentes de la dispersión liposomal por la interacción de estos componentes con el relleno poroso

de la columna cromatográfica, dando lugar a diferentes tiempos de retención (Fekete, Beck et al. 2014). Los componentes de mayor tamaño no quedan retenidos en la columna ya que su tamaño es superior al tamaño de los poros, mientras que los más pequeños, como son las moléculas de fármaco libre, eluyen más tarde debido a su entrada en los poros de la columna (Grabielle-Madelmont, Lesieur et al. 2003, Ruyschaert, Marque et al. 2005).

Normalmente, los liposomas que se forman de manera espontánea son multilamelares. Los métodos de reducción de tamaño, como la **extrusión** y la **sonicación**, se usan para obtener liposomas unilamelares y modificar y/o unificar el tamaño de los liposomas. La **extrusión** consiste en el paso de la dispersión de liposomas a través de las membranas de extrusión. Estas membranas pueden ser de policarbonato o poliestersulfona y tienen un tamaño de poro uniforme que se oscila entre 0,1 y 5 μm (Schiffelers, Metselaar et al. 2005, Szoka, Olson et al. 1980, Olson, Hunt et al. 1979, Ong, Chitneni et al. 2016). El tamaño resultante dependerá del tamaño del poro, número de ciclos de extrusión, presión aplicada y la flexibilidad de los liposomas (Ong, Chitneni et al. 2016). En el caso de **sonicación**, el tamaño del liposoma se reduce y se homogeniza gracias a la energía que se le aplica al liposoma mediante el uso de los ultrasonidos de alta frecuencia.

1.3.3. Métodos para la incorporación del fármaco

Podemos clasificar los métodos de incorporación del fármaco al liposoma en dos grupos: métodos activos y métodos pasivos (Gubernator 2011).

En los **métodos pasivos**, la incorporación del fármaco al liposoma se produce en el momento de su elaboración de forma espontánea. Los fármacos hidrófilos en disolución se quedan encerrados en el núcleo acuoso del liposoma en el proceso de rehidratación de la película fina y formación consecutiva del liposoma (Magome, Takemura et al. 1997, Shelar, Dey et al. 2021). Mientras tanto, los fármacos hidrófobos se quedan integrados en la estructura de la bicapa lipídica del liposoma. La eficacia de encapsulación de los fármacos hidrófilos dependerá del tamaño del liposoma (a mayor tamaño – mayor eficacia de encapsulación) y del número de las bicapas (a mayor número – menor eficacia) (Mayer, Bally et al. 1986), mientras que la eficacia de encapsulación de los fármacos hidrófobos depende principalmente de la concentración de fosfolípidos y del número de vesículas (Schwendener, Schott 2017). La incorporación de fármacos en la estructura de

la bicapa lipídica puede tener inconvenientes: un alto coeficiente fármaco/lípido puede provocar la desestabilización de la bicapa, acelerando la liberación del fármaco desde el liposoma (Allen, Cullis 2013).

Los **métodos activos** consisten en la incubación de los liposomas vacíos con una disolución del fármaco y aplicación de una fuerza que favorece la entrada del fármaco hacia el interior del liposoma. La bicapa lipídica del liposoma debe tener cierta permeabilidad para poder usar estos métodos. La primera variante del método activo es la entrada del fármaco hacia el interior del liposoma gracias a la existencia de un gradiente de concentraciones hasta alcanzar un equilibrio entre el interior del liposoma y el medio acuoso externo (Tamam, Park et al. 2019). El uso de este método se limita a moléculas hidrófilas de pequeño tamaño. Las variantes más novedosas y eficientes de incorporación activa de fármacos consisten en la aplicación de fuerzas externas adicionales, como pueden ser el gradiente de pH o el gradiente de potencial iónico (Odeh, Nsairat et al. 2019, Hwang, Maitani et al. 1999, Allen, Cullis 2013). La incorporación del fármaco al liposoma es uno de los pasos más críticos en el proceso de elaboración del liposoma ya que condiciona en gran medida el éxito de la formulación resultante.

1.3.4. Caracterización de los liposomas

A) Tamaño y PDI (índice de polidispersidad)

El método más usado para la determinación del tamaño del liposoma y del PDI es el método de dispersión dinámica de luz (DLS, Dynamic light scattering) (Nguyen, Nguyen et al. 2017). Esta técnica se basa en el movimiento browniano de las partículas en una dispersión. Las partículas de menor tamaño se mueven a mayor velocidad que las partículas grandes. La dispersión se ilumina con un haz de luz monocromática y se registra la luz dispersada por las partículas, esta dispersión informa sobre la velocidad del movimiento de las partículas y, por lo tanto, sobre el tamaño y la distribución de los tamaños.

El **tamaño del liposoma** es uno de los parámetros más importantes para conseguir la llegada del fármaco a su sitio de acción. Para elegir un tamaño adecuado para el liposoma es necesario conocer las propiedades del lugar de administración y sus posibles vías de entrada. Por ejemplo, el tamaño de los axones olfatorios del ser humano oscila entre 0,1 y 0,7 μm , siendo este axón el más pequeño del cuerpo (Morrison, Costanzo 1990). Para

poder usar la vía intracelular para la entrada al SNC, el liposoma ha de tener un tamaño inferior al intervalo mencionado. En el apartado correspondiente (ver Cavidad Nasal 1.2.1) se describen las posibles vías de entrada del fármaco al SNC y el intervalo de tamaños aptos para cada una de las vías. Existen estudios previos que recomiendan el uso de partículas entre 10 y 300 nm para la administración de fármacos vía nariz-cerebro a través de mucosa olfatoria (Boyuklieva, Pilicheva 2022). Sin embargo, también hay evidencia del uso de liposomas cargados de olanzapina (fármaco antipsicótico) administrados vía intranasal para el tratamiento de esquizofrenia a nivel central, cuyos tamaños de oscilaban entre 380 y 410 nm (Salama, Mahmoud et al. 2012, Hong, Oh et al. 2019).

El **PDI** es un parámetro que evalúa la distribución de los tamaños en una población de partículas (Refai, Hassan et al. 2017, Verma, Verma et al. 2003). Para la obtención de una formulación adecuada, la población de los liposomas ha de ser homogénea en cuanto al tamaño. El PDI toma valores entre 0 y 1. Para los vectores lipídicos, un PDI aceptable se encuentra por debajo de 0,3, valor indicativo de una población homogénea de vesículas (Danaei, Dehghankhold et al. 2018).

B) Potencial zeta

El **potencial zeta** es un parámetro físico que mide la interacción repulsiva entre las partículas coloidales. Por ello es un buen parámetro para la predicción de la estabilidad de la dispersión de partículas lipídicas (Müller, Mäder et al. 2000). Valores superiores a 30 mV o inferiores a -30 mV, indican una repulsión alta entre las partículas gracias a la carga superficial que poseen (Iqbal, Md et al. 2012). Ello, a su vez, indica una baja agregación o floculación de las partículas en dispersión. El potencial zeta se mide por la técnica de la electroforesis laser-Doppler.

C) Eficacia de encapsulación

La **eficacia de encapsulación** puede ser determinada por dos métodos: indirecto y directo. En el método indirecto, se centrifuga la dispersión de los liposomas y se determina la cantidad de principio activo no encapsulado (presente en el sobrenadante). La cantidad del fármaco encapsulado corresponderá a la diferencia entre el fármaco total utilizado para la formulación y el fármaco no encapsulado (Cui, Zhang et al. 2004). El método directo consiste en la determinación del fármaco encapsulado en las vesículas

lípidos, para ello, los liposomas se desestabilizan (utilizando metanol o tensioactivos) para provocar la liberación del fármaco encapsulado (Volodkin, Mohwald et al. 2007, Pleguezuelos-Villa, Mir Palomo et al. 2018, Muppidi, Pumerantz et al. 2012, Guillot, Jornet-Mollá et al. 2021).

La eficacia de encapsulación es un parámetro de gran importancia para la elaboración de los liposomas ya que de él depende el éxito o el fracaso de la formulación resultante. Cuanto mejor es la eficacia de encapsulación, mayor es la probabilidad de que la formulación dé buenos resultados en la terapia para la cual se elabora (Mayer, Bally et al. 1986, Johnston, Semple et al. 2006). La eficacia de encapsulación y, por ello, el índice fármaco/lípidos, depende de varios parámetros: el método de elaboración de la vesícula, el tamaño y número de las bicapas de la vesícula resultante y de las propiedades fisicoquímicas del fármaco.

Desde el punto de vista de las propiedades fisicoquímicas, los fármacos hidrófobos generalmente suelen presentar eficacias de encapsulación más altas (>90%) que los fármacos hidrófilos (10-50%) (Nii, Ishii 2005, Jaafar-Maalej, Diab et al. 2010, Muppidi, Pumerantz et al. 2012). En el caso de los fármacos hidrófilos, la mayor parte del fármaco disuelto en medio acuoso se queda fuera del liposoma, por lo que la cantidad encapsulada es baja. El tamaño de la vesícula juega un papel determinante en la eficacia de encapsulación de los fármacos hidrófilos, ya que a mayor tamaño de liposoma mayor es el volumen del núcleo acuoso y más cantidad del fármaco disuelto puede quedarse encapsulada (Maestrelli, Capasso et al. 2009). El uso de las vesículas multilamelares mejora la eficacia de encapsulación de las moléculas hidrófilas (Schiffelers, Metselaar et al. 2005). Por el contrario, a mayor cantidad de bicapas lipídicas, mayor será la eficacia de encapsulación de los principios activos hidrófobos (Schiffelers, Metselaar et al. 2005).

Además, el método de elaboración del liposoma determina las características del liposoma: tamaño, número de bicapas, etc. Por tanto, la elección de un método u otro condicionará la eficacia de encapsulación de la vesícula resultante (Cullis, Mayer et al. 1989) por lo que resulta de gran importancia.

D) Determinación del contenido de fosfolípidos

La **determinación de los fosfolípidos** se realiza para el cálculo del índice fármaco/lípidos y puede ser llevada al cabo mediante el método enzimático (Grohgan, Ziroli et al. 2003)

o mediante el método químico (Steward, Rouser and Barlett). En este trabajo se utilizó el método químico que está descrito detalladamente en el apartado de materiales y métodos.

E) Liberación del fármaco

Los modelos matemáticos semi-empíricos de Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin y la modificación de Kim del modelo Korsmeyer-Peppas han sido elegidos en este estudio para el ajuste de los datos experimentales. El uso de diferentes modelos cinéticos permite realizar comparaciones cuantitativas y entender mejor los mecanismos mediante los cuales se produce la liberación del fármaco. Los modelos de Korsmeyer-Peppas y de Peppas-Sahlin tienen en cuenta la liberación del fármaco por difusión pasiva y por relajación (Peppas, Sahlin 1989, Ritger, Peppas 1987b, Ritger, Peppas 1987a). Por su parte, la modificación de Kim tiene en cuenta la posibilidad de existencia de una liberación masiva y rápida del fármaco en etapas iniciales del proceso (efecto “burst”) (Kim, Fassihi 1997). Para elegir el modelo al cual mejor se ajustan los datos experimentales, se evalúa el coeficiente de correlación (R^2) y el criterio informativo de Akaike (AIC). Este último es muy útil para la comparación de los modelos con diferente número de parámetros.

1.4. GELES TERMOSENSIBLES

Los hidrogeles son unos materiales poliméricos caracterizados por presentar una estructura de red tridimensional con capacidad de retener agua o fluidos biológicos en grandes cantidades en condiciones fisiológicas. Los hidrogeles se pueden utilizar como sistemas de administración de fármacos gracias a la transición solución-gel en respuesta a estímulos biológicos específicos (Agrawal, Saraf et al. 2018). Algunos geles pueden ser líquidos a temperatura ambiente lo cual presenta ventajas en el manejo durante la preparación y en el momento de la administración.

Tras la administración, se produce la transición de la solución a gel en respuesta al incremento de la temperatura. La gelificación del sistema permite incrementar el tiempo de residencia de la formulación en el lugar de administración y proporciona una liberación sostenida del fármaco (Giuliano, Paolino et al. 2018). La gelificación de los hidrogeles puede producirse en respuesta a diversos estímulos, como son la irradiación UV, cambios en el pH, cambios en la temperatura, formación de enlaces iónicos (Ruel-Gariépy, Leroux 2004). Los geles termosensibles resultan de gran interés para el uso clínico ya que no requieren del empleo de agentes externos para que la transición solución-gel se produzca. El propio hecho de administrar el fármaco supone un incremento de la temperatura hasta la temperatura corporal, induciendo de esta forma la gelificación. Por ello, en las últimas décadas, la investigación farmacéutica se ha centrado en el desarrollo de hidrogeles termosensibles para diversas aplicaciones (Agnello, Gasperini et al. 2017).

1.4.1. Pluronic®

Los Pluronic®, también conocidos como los poloxamers, son unos copolímeros no iónicos con estructura de tipo ABA, es decir, compuestos por segmentos hidrofílicos laterales de polioxietileno (POE) (A) y segmento hidrofóbico central de polioxipropileno (POP) (B) (Batrakova, Kabanov 2008, Chiappetta, Sosnik 2007, Schmolka 1994). Son moléculas anfifílicas, capaces de formar micelas, por lo cual se usan como agentes tensioactivos en muchos campos de la industria (Gagliardi, Paolino et al. 2018, Schmolka 1994). Existen diversos Pluronic® con diferentes características y estados físicos en función del peso molecular y proporción POP:POE (Batrakova, Kabanov 2008). Los Pluronic® se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica y cosmética por presentar una elevada solubilidad en agua, baja toxicidad, buena compatibilidad con

compuestos biológicos u otros excipientes y buenas características en cuanto a la liberación de los fármacos (Dumortier, Grossiord et al. 2006). Además, tienen capacidad mucoadhesiva gracias a la formación de interacciones no covalentes con las mucinas (Giuliano, Paolino et al. 2018). Se trata de unas moléculas no irritantes para las membranas biológicas y pueden gelificar en respuesta al cambio de la temperatura (termo-gelificación) gracias a su capacidad de formar micelas en solución acuosa (Alexandridis, Alan Hatton 1995).

La formación de las micelas depende de dos parámetros: la temperatura micelar crítica (TMC) y la concentración micelar crítica (CMC). La CMC es la concentración mínima del copolímero necesaria para la formación de las micelas. La CMC es directamente proporcional al número de unidades de POP, ya que los segmentos hidrófobos son principalmente responsables de la formación de las micelas (Alexandridis, Holzwarth et al. 1994). Con el incremento de la temperatura, la CMC de los Pluronicos® disminuye como consecuencia de la diferencia en solvatación de los segmentos POE y POP, disminuyendo de este modo la interacción con el disolvente. Por ello, los Pluronicos® también se caracterizan por una TMC específica (Bedrov, Ayyagari et al. 2006, Bonacucina, Spina et al. 2007). La formación de las micelas es el primer paso en el proceso de la gelificación ya que inicia la formación de la red tridimensional del hidrogel. Se trata de un fenómeno reversible: cuando la preparación se encuentra a temperaturas más bajas que la temperatura de la transición solución-gel ($T_{sol-gel}$), está en forma líquida. Sin embargo, cuando está a temperaturas superiores se produce la gelificación (Giuliano, Paolino et al. 2018).

Uno de los Pluronicos® más utilizados es el Pluronic® F127 (Poloxamer 407), también utilizado para este trabajo de investigación. Posee una estructura POE101-POP56-POE101 y un peso molecular de alrededor de 12,6 kDa (12600 g/mol). Se trata de un compuesto bastante hidrófilo por su contenido de alrededor del 70% en POE (Fakhar-ud-Din, Khan 2019). Este polímero está autorizado por la FDA para el uso farmacéutico como excipiente (Monti, Burgalassi et al. 2010, Fakhar-ud-Din, Khan 2019, Dumortier, Grossiord et al. 2006) y presenta baja toxicidad, buena compatibilidad con las células y fluidos corporales, alta solubilidad y buena compatibilidad con muchos compuestos químicos (Almeida, Amaral et al. 2012, Dumortier, Grossiord et al. 2006). En respuesta al incremento de la temperatura, tal y como se ha descrito para los Pluronicos® en general, Pluronic® F127 forma micelas. A mayor incremento de temperatura las micelas se

organizan en una estructura cúbica y adquieren una configuración hexagonal (Escobar-Chávez, López-Cervantes et al. 2006). Pluronic ® F127 se ha utilizado para la preparación de diversas formas farmacéuticas para conseguir diferentes fines: incrementar el tiempo de la anestesia local gracias a la liberación sostenida de lidocaína (Ricci, Lunardi et al. 2005, Ricci, Bentley et al. 2002); liberación prolongada de peroxicam en inyección intramuscular (Xuan, Balakrishnan et al. 2010); o bien la liberación controlada de antibióticos desde un gel termosensible y mucoadhesivo para el tratamiento de periodontitis (Bansal, Mittal et al. 2018). Aunque Pluronic ® P127 presenta numerosas ventajas, tiene también un gran inconveniente: tiempo de residencia corto debido a su rápida disolución en medio acuoso o fluidos biológicos (Moreno, Schwartz et al. 2014, Akash, Rehman 2015). Este problema se puede resolver combinándolo con otros polímeros o agentes controladores de pH y de fuerzas iónicas (Choi, Lee et al. 1999, Koffi, Agnely et al. 2006, Ur-Rehman, Tavelin et al. 2011).

1.4.2. Geles para administración de fármacos vía Nariz-Cerebro

Diversos principios activos fueron formulados en geles termosensibles mucoadhesivos para el tratamiento de afecciones del SNC. Por ejemplo, rasagilina (fármaco usado para el tratamiento de Parkinson y que tiene baja biodisponibilidad por vía oral) fue formulada en un gel de mezcla de Pluronic ® F127, Pluronic ® F68 carbopol y chitosan (Ravi, Aditya et al. 2015). La administración de rasagilina en este formato permitió mejorar la biodisponibilidad del fármaco: los valores altos de C_{max} indican rápida absorción del principio activo desde la formulación, mientras que valores de AUC_{0-inf} elevados sugieren que la absorción del fármaco desde el gel fue completa (Ravi, Aditya et al. 2015). Por otra parte, Chen y colaboradores mejoraron el targeting de la curcumina en las diferentes áreas cerebrales para el tratamiento del Alzheimer. Lo consiguieron al formularla en un gel con Pluronic ® F127 y F68 (Chen, Zhi et al. 2013). La rivastigmina, otro fármaco empleado para el tratamiento del Alzheimer, mostró mejor distribución cerebral al ser administrado en un gel intranasal que por vía intravenosa (Abouhoussein, Khattab et al. 2018).

Finalmente, muchos otros fármacos utilizados para el tratamiento de enfermedades neurológicas (migrañas, Alzheimer, Parkinson, depresión, esquizofrenia, ...) mostraron resultados satisfactorios y beneficiosos al ser administrados por la vía intranasal en formato de geles termosensibles (Aderibigbe 2018).

2. OBJETIVOS

La presente tesis ha consistido en el desarrollo de una forma farmacéutica en formato de gel termosensible con liposomas cargados de Nor-BNI, antagonista de los receptores KOR, para la administración de este fármaco por la vía Nariz-Cerebro. Dicha forma farmacéutica se postula como un potencial tratamiento novedoso, seguro y de manejo sencillo para la dependencia alcohólica y recaídas en el consumo de alcohol, siendo el sistema Dyn/KOR la diana terapéutica. Con el objeto de lograr dicho fin, se plantearon los siguientes objetivos:

- **Objetivo 1:** Desarrollo de métodos analíticos por cromatografía líquida de alta precisión acoplada a un detector electroquímico (HPLC-ECD), válidos para la detección y cuantificación de los analitos de interés (Nor-BNI y dopamina).
- **Objetivo 2:** Desarrollo y caracterización de liposomas con Nor-BNI que posean propiedades adecuadas para la penetración de la fórmula en el epitelio de la mucosa nasal y así conseguir una acción central del fármaco (eficacia de encapsulación, tamaño y liberación del fármaco).
- **Objetivo 3:** Desarrollo de un gel termosensible con una composición polimérica que asegure propiedades fisicoquímicas y reológicas adecuadas para un almacenamiento y administración cómodos, gelificación rápida en contacto con la mucosa nasal gracias al cambio de la temperatura y estabilidad de estas propiedades frente a la interacción del gel con el principio activo y con los liposomas (temperatura de gelificación y viscosidad).
- **Objetivo 4:** Desarrollo de la fórmula con un perfil de liberación controlada, que facilitaría el éxito en el tratamiento por la simplificación en la pauta.
- **Objetivo 5:** Comprobación de la eficacia de la formulación administrada por la vía Nariz-Cerebro mediante la evaluación de los niveles de dopamina extracelular en el NAc de las ratas (estudio de microdiálisis) y la detección de Nor-BNI en diferentes áreas cerebrales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. COMPUESTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS

3.1.1. Líquido Cerebroespinal Artificial (LCEa)

El experimento de microdiálisis se realizó usando el LCEa como solución de perfusión. Su preparación fue como la del tampón fosfato 0,1 mM: NaCl 147 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgCl₂ 1 mM. El pH fue ajustado a 7,4 (Santiago, Westerink 1990).

3.1.2. Tampón Fosfato Salino pH 7,4 (PBS pH 7,4)

El PBS utilizado para este trabajo se preparó utilizando la siguiente receta: 8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na₂HPO₄ y 0,24 g/L de KH₂PO₄ en agua bidestilada. El pH del tampón fue ajustado a 7,4.

3.1.3. Norbinaltorphimina (Nor-BNI)

Nor-BNI (Sigma-Aldrich®, dihidrocloruro) es un antagonista de los receptores opioides con alta selectividad por los receptores KOR (Portoghese, Lipkowski et al. 1987). Se trata de un dímero de la naltrexona (**Figura 4**). Nor-BNI presenta un peso molecular de 734,71 g/mol, una solubilidad en agua intermedia-baja (>45 mmol/L a 25°C) y un carácter ligeramente lipófilo (LogD_{7,4} octanol-agua=1,5) (Munro, Berry et al. 2012).

Para el desarrollo del método de detección del Nor-BNI mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ECD), se preparó la disolución 1 (26,448 mg/mL). Para ello, 10 mg de Nor-BNI fueron disueltos en 378 µL de la fase móvil del Nor-BNI (ver apartado 3.2). La disolución 1 se dividió en alícuotas (V=37,8 µL) para su almacenamiento a -20 °C hasta su uso. La disolución madre (200 µg/mL) se preparó añadiendo la fase móvil a las alícuotas de la disolución 1. A su vez, las disoluciones patrón se prepararon a partir de la disolución madre.

Por otra parte, para la elaboración de los liposomas, Nor-BNI se disolvió en el metanol junto con otros componentes de la bicapa lipídica (ver apartado 3.5.1). Los liposomas obtenidos en este estudio tuvieron un contenido de 0,538 mg/mL de Nor-BNI, mientras que su concentración en el gel fue de 0,588 mg/mL. La dosis de Nor-BNI administrada a los animales fue de 0,37 mg/kg.

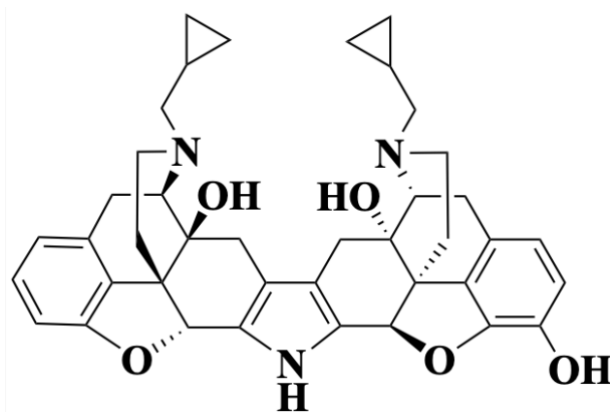


Figura 4: Estructura química de Nor-BNI (peso molecular: 734,71 g/mol)

3.1.4. Cianocobalamina (Vitamina B12)

Cianocobalamina (Acofarma ®), también conocida como vitamina B12, es una vitamina esencial para el ser humano. Este compuesto presenta un peso molecular de 1355,38 g/mol y es soluble en agua y disolventes orgánicos (metanol). El log P de Vitamina B12 es de 1,87. En este trabajo de investigación, la vitamina B12 fue utilizada por su similitud lipofílica con Nor-BNI debido a la rotura de stock prolongada (8 meses) del Nor-BNI tras la pandemia por COVID-19. La estructura química de la Vitamina B12 está presentada en la **Figura 5**.

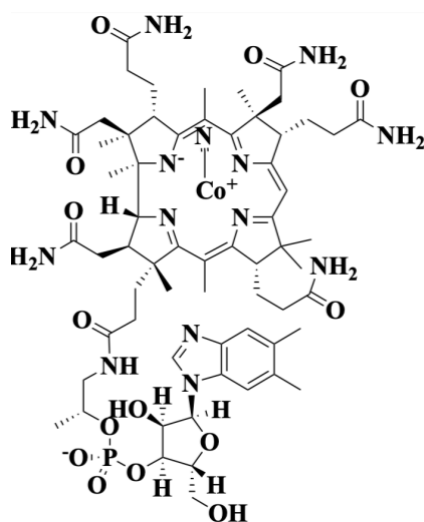


Figura 5: Estructura química de cianocobalamina (peso molecular 1355,38 g/mol)

3.1.5. Dopamina (DA)

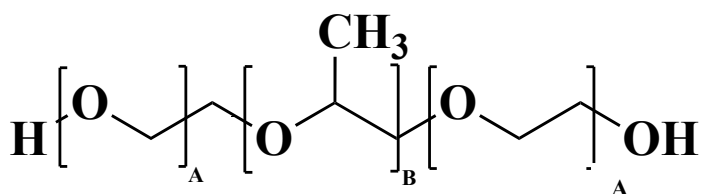
Hidrocloruro de dopamina se adquirió de Sigma-Aldrich®. Para el desarrollo del método de determinación de la DA por HPLC-ECD, se utilizó la disolución acuosa de hidrocloruro de dopamina.

3.1.6. U-50448

U-50448 (Sigma-Aldrich ®) es un agonista de los receptores KOR (Szmuszkowicz, Jacob 1999). Este fármaco se diluyó en el suero salino estéril para obtener una concentración adecuada del mismo para su administración subcutánea (0,5 mg/kg en 0,5 mL).

3.1.7. Pluronic ® I y Pluronic ® II

Pluronic ® I y II (Sigma-Aldrich) se utilizaron en este trabajo. Pluronic ® I, conocido también como Poloxamer I, presenta una fórmula química POE**I**-PO**I**-POE**I** ([REDACTED], **Figura 6**) y peso molecular de aproximadamente 12600 g/mol. Pluronic P-I se utiliza en combinación con II con el fin de mejorar sus características. Pluronic ® II (Poloxamer II) tiene una formula química POE**II** -PO**II** -POE**II** y un peso molecular de 8624 g/mol (Emanuele, Balasubramaniam 2014). Ambos polímeros son sólidos a temperatura ambiente y presentan alta solubilidad en agua y en PBS (pH 7,4).



Polyethylene oxide - Polypropylene oxide - Polyethylene oxide
PEO-PPO-PEO

Figura 6: Estructura química general de los Pluronic ® (A: PEO; B:PPO)

3.1.8. Componentes de los liposomas

Phospholipon ® 90 G y Cholesterol se utilizaron como componentes de la bicapa lipídica de los liposomas. El fosfolípido Phospholipon ® 90 G es una fosfatidilcolina estabilizada con palmitato ascórbico 0,1%. El colesterol es un lípido de tipo esteroide, siendo el esteroide más abundante en el cuerpo de los animales. En la naturaleza, ambos compuestos tienen un papel importante: son componentes de las membranas celulares y actúan como

precursores de la síntesis endógena de otras moléculas, entre otras funciones. En la Tecnología Farmacéutica, estos compuestos se utilizan para diversos fines y resultan de gran interés gracias a su biocompatibilidad. Para este estudio, el colesterol fue adquirido de Acofarma (Madrid, España), mientras que Phospholipon ® 90G fue donado por Lipoid (Steinhausen, Suiza).

3.1.9. Soluciones de homogenización (SH) y de estabilización (SE) para Nor-BNI

Para evitar la oxidación del Nor-BNI y asegurar su correcta cuantificación, las muestras cerebrales fueron tratadas con SH antes de ser homogenizadas. Por cada gramo del tejido cerebral se añadieron 1,5 mL de SH. La SH se preparó como mezcla de suero salino con la solución estabilizadora (SE) en proporción 1:2. La SE, a su vez, se preparó disolviendo 0,043 g de citrato de diamonio y 1 g de ácido metafosfórico en 10 mL del agua bidestilada (Bergstrom, Kay et al. 1981, Kreuzig, Frank 1981). La solución estabilizadora se renovó semanalmente.

3.1.10. Otros reactivos

Todos los demás compuestos y reactivos usados para llevar a cabo diferentes experimentos de este trabajo fueron adquiridos con el mayor nivel de calidad disponible en el mercado.

3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS: Nor-BNI Y Dopamina

La cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ECD) fue empleada para la determinación de Nor-BNI (Kishioka, Kiguchi et al. 2013) y DA (Hipólito, Sánchez-Catalán et al. 2009) en muestras. El equipo de HPLC está compuesto por una bomba isocrática Waters 515 conectada al detector electroquímico (Decade II, Antec, Leyden, Países Bajos). El potencial utilizado fue de +0,56 V (ISAAC cell, Antec, Leyden, Países Bajos). Las muestras fueron inyectadas a la columna LiChroCART® 125-4 Li-Chrospher® 100 RP-18 (5 µm) con el bucle de muestra de 50 µL.

La fase móvil de Nor-BNI fue el tampón ácido cítrico/citrato (0,1 M, pH=3,9) y contenía 3 mg/L de EDTA, 100 mg/L del ácido 1-octanesulfónico, 2 mM de Cl⁻ (como KCl) y 350 ml/L de metanol. A su vez, la fase móvil de DA fue el tampón del acetato sódico/ácido acético (0,1 M, pH=4,1) con 4,1 g/L de NaCl, 100 mg/L de EDTA, 100 mg/L del ácido 1-octanosulfónico y 70 ml/L de metanol. La fase móvil fue bombeada a través de la columna a una velocidad de flujo de 0,7 mL/min para la determinación del Nor-BNI y 0,4 mL/min para la DA. El análisis de los cromatogramas se llevó a cabo con el programa informático AZUR 4.2 (Datalys, Francia).

3.2.1. Validación de los Métodos Analíticos

Ambos métodos fueron validados en términos de cumplimiento con los criterios de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

En el caso del Nor-BNI, la regresión lineal por mínimos cuadrados se obtuvo presentando las áreas de los picos cromatográficos frente a las concentraciones de las disoluciones patrón (**Ecuación 1**). Para la DA, la regresión lineal se obtuvo presentando las alturas de picos cromatográficos frente a las concentraciones de las disoluciones patrón (**Ecuación 2**).

$$\text{Area} = b \cdot C \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] + a$$

Ecuación 1: Regresión lineal por mínimos cuadrados para el método analítico de Nor-BNI

$$\text{Altura Pico (mV)} = b \cdot C [\text{nM}] + a$$

Ecuación 2: Regresión lineal por mínimos cuadrados para el método analítico de Dopamina

En **Ecuación 1** y **Ecuación 2**, b es la pendiente de la recta y a es el punto de intersección con el eje y . Se utilizó Microsoft Excel 2019 ® para ejecutar los cálculos.

Linealidad. El coeficiente de correlación (R^2) es el parámetro que se utilizó para evaluar la linealidad de ambos métodos. R^2 se obtuvo a partir de las regresiones lineales y representa la dependencia que existe entre las áreas/alturas de los picos y las concentraciones de los patrones. Para cumplir con el criterio de linealidad, el valor del R^2 tiene que ser $>0,95$.

La **sensibilidad** de un método analítico es su capacidad de distinguir entre pequeñas diferencias de concentración del analito y se expresa como la pendiente de la curva de calibración y su desviación estándar ($b \pm SD$).

El **límite de cuantificación** (LC, **Ecuación 3**) se define como la cantidad más pequeña de un analito que se puede cuantificar confiablemente, mientras que el **límite de detección** (LD, **Ecuación 4**) es la concentración mínima del analito que puede ser detectada con fiabilidad por el método analítico en cuestión.

$$LC = \frac{10 \times SD}{b}$$

Ecuación 3

$$LD = \frac{3 \times SD}{b}$$

Ecuación 4

En estas ecuaciones, SD es la desviación estándar de la intersección con el eje Y , y b es la pendiente de la recta.

La **precisión** del método analítico refleja en qué medida los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí (Castillo Aguilar, González Hernández 1996). El coeficiente de variación (CV) del promedio de las concentraciones calculado para los ensayos interdía e intradía se utilizó para evaluar la precisión del método. El CV (%) interdía se calculó utilizando los valores de las áreas/alturas del pico obtenidos tras la inyección de las soluciones patrón en tres días diferentes. Por otra parte, para el cálculo del CV (%) intradía fueron utilizados los

valores obtenidos tras la inyección de patrones durante el mismo día (**Ecuación 5**, **Ecuación 6**).

Para que se cumpla el criterio de precisión, el CV (%) ha de ser inferior al 10% tanto para los ensayos interdía, como para los intradía.

$$VC(\%) = \frac{SD}{Area} \times 100$$

Ecuación 5

$$VC(\%) = \frac{SD}{Altura\ Pico} \times 100$$

Ecuación 6

La **exactitud** del método indica su capacidad para obtener resultados los más próximos posibles al valor verdadero (Castillo Aguilar, González Hernández 1996). Para la evaluación de exactitud, se utilizó el error relativo (Er, **Ecuación 7**), calculado para los patrones de diferente concentración en base a tres rectas patrón realizadas durante tres días diferentes.

Para que se cumpla el criterio de exactitud, Er (%) ha de ser inferior al 10%, donde C_{exp} es la concentración experimental y C_e es la concentración teórica (calculada utilizando la regresión lineal obtenida).

$$Er(\%) = \frac{(C_{exp} - C_e)}{C_e} \times 100$$

Ecuación 7

3.3. GEL INTRANASAL TERMOSENSIBLE

Varias combinaciones de polímeros fueron estudiadas para elegir la composición del gel más apropiada. En primer lugar, para conseguir una gelificación termosensible en contacto con la mucosa nasal (37°C), se seleccionaron cuatro combinaciones de polímeros con las temperaturas de gelificación semejantes a la deseada (25-35°C) en base a los resultados de las investigaciones previas (Zhang, Shi et al. 2015). A continuación, las propiedades fisicoquímicas y reológicas de relevancia fueron estudiadas para los geles seleccionados. Estos estudios se realizaron para los *Geles Blancos* (GB, sólo polímeros), *Geles Cianocobalamina* (GC, con vitamina B12) y *Geles Liposomasles Blancos* (GLB, con liposomas sin fármaco). De esta forma, se pretendió determinar la influencia del fármaco libre y de los componentes del liposoma en el comportamiento de los geles. Además, el estudio de liberación del fármaco desde el gel se llevó a cabo en los geles GC. Las composiciones de los geles estudiados se encuentran detalladas en las **Tablas 2-4**. Finalmente, cuando se eligió la composición más adecuada del gel, el gel con liposomas cargados con Nor-BNI fue elaborado siguiendo la receta resumida en la **Tabla 5**.

Tabla 2: Composición de los geles blancos

Gel	P-I, % (p/p)	P-II, % (p/p)	PBS (pH 7.4)
G1	20	10	c.s.p.
G2	20	0	
G3	10	10	
G4	10	5	

Tabla 3: Composición de los geles con Vitamina B12

Gel	P-I, % (p/p)	P-II, % (p/p)	Vit B12, % (p/p)	PBS (pH 7.4)
G1	20	10	1	c.s.p.
G2	20	0	1	
G3	10	10	1	

Tabla 4: Composición de los geles con liposomas blancos

Gel	P-I, % (p/p)	P-II, % (p/p)	Liposomas, % (v/v)	PBS (pH 7.4)
G1	20	10	10	c.s.p.
G2	20	0	10	

Tabla 5: Composición de la formulación problema (gel intranasal con liposomas cargados de Nor-BNI)

	P-I, % (p/p)	P-II, % (w/w)	Liposomas, % (v/v)	PBS (pH 7.4)
%	20	10	70	10
Cantidad	1,428 g	0,714 g	4,2 mL	0,8 mL

3.3.1. Preparación de geles

Diferentes cantidades de Pluronic® **I** y **II** se disolvieron en PBS (pH 7,4) para la preparación de los GB, mientras que una solución de Vitamina B12 y una dispersión liposomal en PBS (pH 7,4) se utilizaron para los GC y GBL, respectivamente. La mezcla resultante fue sometida a agitación durante 24 h a 10°C. Finalmente, los geles formados se quedaron en reposo a 10°C durante por lo menos 24 h antes de la realización de los ensayos. Todos los procesos se llevaron a cabo en oscuridad.

3.3.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas de los geles: temperatura de gelificación

La temperatura de gelificación o la temperatura de transición solución-gel se determinó por el método de Miller-Donovan (Miller, Donovan 1982, Hosny, Rizg et al. 2020), también conocido como el método de inversión del tubo (**Figura 7**). La solución polimérica en estudio se depositó (V=2 mL) en dos tubos de ensayo. Uno de los tubos fue utilizado para el control de la temperatura, mientras que otro para el control de la gelificación. El baño de agua se utilizó para el calentamiento de los geles. La temperatura a la cual la solución de estudio dejó de fluir tras la inversión del tubo en 90°, fue registrada como temperatura de gelificación.

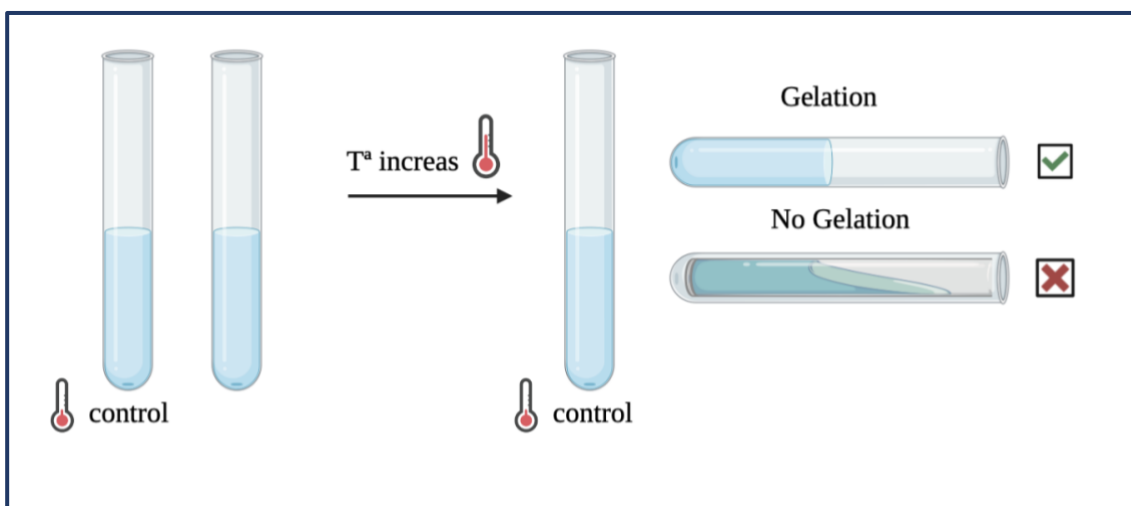


Figura 7: Método de Miller-Donovan para la determinación de la temperatura de gelificación.

3.3.3. Determinación de las propiedades reológicas del gel: viscosidad

La viscosidad de diferentes formulaciones basadas en Pluronic® **I** y **II** se estudió utilizando el viscosímetro rotatorio Brookfield® RVDV-I PRIME (Brookfield Engineering LABS. Inc. MiddleBoro, MA, USA). Se trata de un instrumento de precisión que determina la viscosidad de un fluido usando la resistencia mecánica que actúa en sentido contrario al movimiento rotacional del husillo. Como resultado, se genera una fuerza de torque que el aparato detecta y lo convierte en un valor de viscosidad. Los husillos tipo RV/HA/HB en forma de disco se utilizaron para la medición de la viscosidad. La velocidad de corte a la que giran los husillos fue de 60 rpm. El tamaño del husillo se ajustó según la necesidad de cada fluido para conseguir que la fuerza de torque se encontrara dentro del rango de trabajo. El baño de agua se utilizó para incrementar la temperatura de los geles. El valor de la viscosidad fue tomado cuando este se mantuvo constante durante, al menos, 30 segundos. Las medidas se realizaron por triplicado.

3.4. ESTUDIO DE LIBERACIÓN DEL FÁRMACO Y EL AJUSTE AL MODELO CINÉTICO

El estudio de liberación *in vitro* se realizó en este trabajo para:

- a) estudiar la influencia de la composición del gel en la liberación del principio activo (Vitamina B12).
- b) estudiar la liberación del Nor-BNI desde la dispersión liposomal y desde el gel con liposomas cargados de Nor-BNI.

El ensayo se realizó en las células de difusión de Franz (n=4) (**Figura 8**) con un área de difusión activa de 1,76 cm². El compartimento receptor de las células de Franz fue rellenado con 12 mL de PBS pH 7,4, mientras que en el compartimento dador se depositaron 500 µL de cada formulación. Para evitar la evaporación del disolvente, el compartimento dador y el brazo de muestreo se taparon con Parafilm®. La membrana Spectra/Por® molecular porosa se utilizó para separar los compartimentos de la célula. El ensayo se llevó al cabo a 32°C. Muestras con volumen de 400 µL fueron recogidas a las horas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 24 del ensayo para la Vitamina B12 y 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48 y 72 para Nor-BNI. Tras la recogida de cada muestra, el volumen fue reemplazado con PBS fresco (32°C) para mantener las condiciones “sink” y un volumen constante (Nava, Piñón et al. 2011).

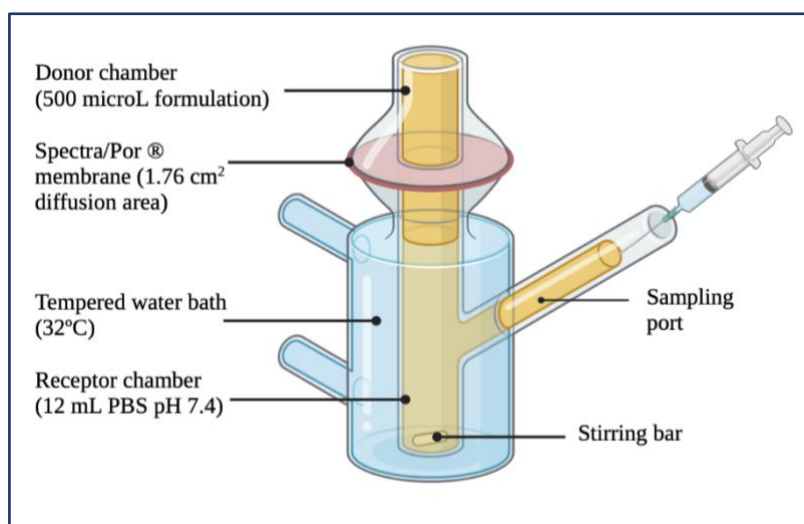


Figura 8: Célula de difusión de Franz.

La cianocobalamina liberada fue cuantificada mediante HPLC-UV/Vis (Guillot, Jornet-Mollá et al. 2021), mientras que para la cuantificación del Nor-BNI se empleó el HPLC-ECD. Las cantidades acumuladas del fármaco en función del tiempo fueron calculadas.

Diferentes modelos cinéticos se ajustaron a los perfiles de liberación obtenidos en ambos ensayos: Korsmeyer-Peppas, Kim y Peppas-Sahlin. Mediante el Criterio de Información de Akaike (AIC, **Ecuación 8**) se determinó el mejor modelo cinético para cada caso (Akaike, Hamilton, Ghert et al. 2015).

$$AIC = n \cdot \ln(SSr) + 2 \cdot p$$

Ecuación 8

Donde n es el número de datos experimentales; SSr es la suma residual de cuadrados y p es el número de parámetros en el modelo matemático utilizado.

El modelo de Korsmeyer-Peppas asume que la liberación puede tener lugar por procesos de difusión pasiva, relajación o ambos, y es descrito por la **Ecuación 9**.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n$$

Ecuación 9

En la **Ecuación 9**, M_t es la cantidad del fármaco liberada a tiempo t , M_∞ es la cantidad máxima liberada del fármaco, M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberada al tiempo t . La constante que explica las características del sistema de liberación es k y n el exponente que indica el mecanismo de liberación. Valores de $n < 0,5$ indican que el proceso de liberación del fármaco ocurre por difusión pasiva; valores de $0,85 < n < 1$ indican que el proceso de liberación principal es la relajación; valores de n entre 0,5 y 0,85 indican la presencia de ambos fenómenos.

La variación de Kim (Kim, Fassihi 1997) de la ecuación de Korsmeyer-Peppas propone una modificación que permite tener en cuenta la presencia del efecto “bust”: una liberación masiva y rápida del fármaco en las fases iniciales del ensayo y es descrita por la **Ecuación 10**:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n + b$$

Ecuación 10

Donde b es el parámetro correspondiente al efecto “bust”.

El modelo de Peppas-Sahlin tiene en cuenta tanto la liberación por difusión pasiva, como la liberación por relajación. Cada uno de los procesos se representa con su propia constante (**Ecuación 11**) (Peppas, Sahlin 1989):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \cdot t^n + k_2 \cdot t^n$$

Ecuación 11

k_1 y k_2 son constantes asociadas a los procesos de liberación del fármaco por difusión pasiva y por relajación, respectivamente; n es la exponente del proceso de liberación.

3.5. LIPOSOMAS

3.5.1. Preparación de los liposomas

Tanto los liposomas cargados de Nor-BNI como los liposomas blancos se prepararon por el método de la película fina (**Figura 9**) (Castoldi, Herr et al. 2017, Ahad, Al-Saleh et al. 2017). La composición cuantitativa de los liposomas, las condiciones de los procesos de reconstitución y purificación utilizados se resumen en la **Tabla 6**. En el caso de los liposomas cargados con Nor-BNI, el fármaco se disolvió en el metanol junto con los componentes formadores de la bicapa lipídica, Phospholipon® 90G (P90G) y colesterol. El disolvente se evaporó a vacío en el rotavapor (BUCHI R-210, Büchi AG; Flawil, Switzerland) a una presión de 250 mbar, una velocidad de rotación de 120 rpm y a 50°C de temperatura hasta la formación de una película fina en las paredes del matraz de fondo redondo. Una vez se observó la formación de la película, la presión se fijó en 100 mbar y la extracción del disolvente continuó hasta la mañana del día siguiente. La película fina se rehidrató con PBS pH 7,4 y se dejó en agitación durante 1 hora a 50°C hasta la obtención de una dispersión liposomal. El tamaño de los liposomas obtenidos se redujo mediante sonicación (Elmasonic S60H, Elma; Singen, Germany), filtración (para los liposomas cargados de Nor-BNI), y extrusión (LiposoFsst-Basic Extruder, Avestin; Ottawa, Canada) (El Maghraby, Williams et al. 2000). Los liposomas con Nor-BNI se sonicaron a temperatura ambiente durante 1 hora, mientras que para los liposomas blancos el proceso duró 2 horas a 50°C. Después de enfriar a 4°C, los liposomas blancos fueron extruidos a través de una membrana de 200 nm (Avestin Inc, Ottawa, Canada) a 30°C (20 veces). En el caso de los liposomas con Nor-BNI, primero se filtraron a través de los filtros de 0,45 µm (5 veces) y 0,22 µm (5 veces) y se fueron extruidos con el mismo método a temperatura ambiente. La dispersión liposomal obtenida se conservó a 4°C protegida de la luz.

Tabla 6: Composición cuantitativa, disolvente de rehidratación y método de purificación de los Liposomas blancos y cargados de Nor-BNI. *PBS: Phosphate Buffer Saline. C: centrifugación*

Componentes	Formulaciones liposomasles	
	Liposomas con Nor-BNI	Liposomas Blancos
P90G (g)		4.5
Colesterol (g)		0.135
Nor-BNI (g)		-
Disolvente de rehidratación (mL)	PBS 10	PBS 10
Método de purificación	-	C

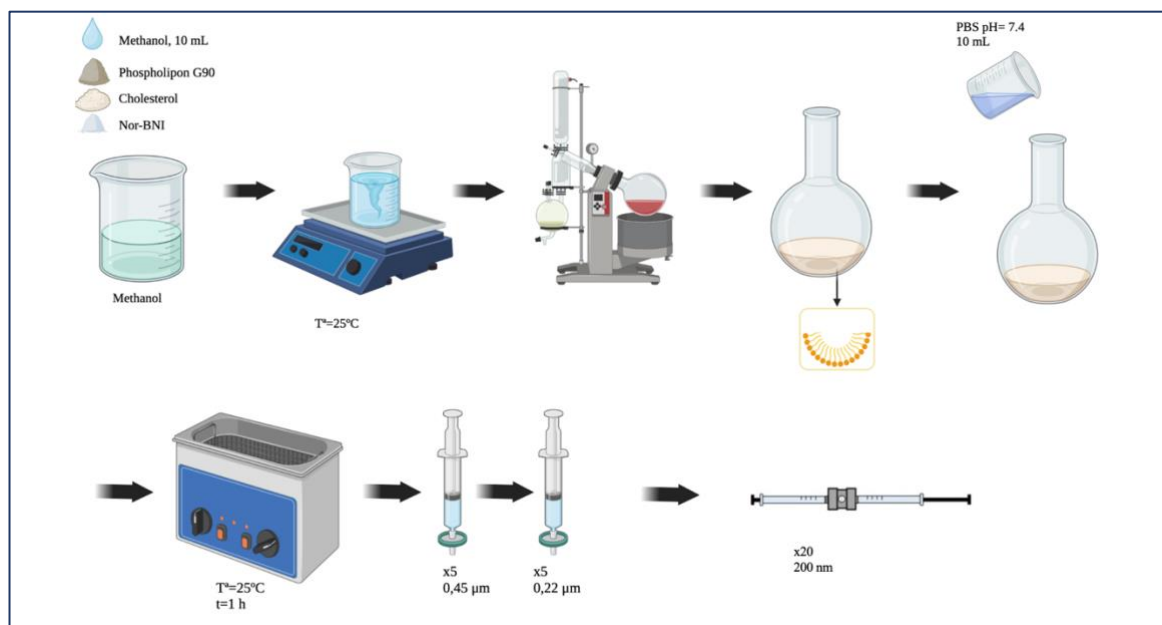


Figura 9: El proceso de preparación de los liposomas cargados con Nor-BNI

3.5.2. Caracterización de los liposomas

A) Tamaño, Índice de Polidispersidad (PDI) y Potencial Zeta

El tamaño de liposomas (media de diámetros), índice de polidispersidad (PDI) y potencial Zeta se midieron utilizando el aparato Malvern Nano Zetasizer (Malvern Panalytical; Malvern, UK). Todos los ensayos se realizaron a 25 °C y las muestras se analizaron por triplicado. La técnica de electroforesis laser-Doppler se utilizó para la determinación del potencial zeta, mientras que para la medición del PDI y del tamaño del liposoma se aplicó la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) (Sabeti, Noordin et al. 2014).

B) Determinación del contenido de fosfolípidos

La determinación de fosfatidilcolina incorporada en los liposomas se realizó por el método de Rouser (Rouser, Fleischer et al. 1970). Primero, tres muestras de 150 µL de dispersión acuosa de liposomas en tubos de cristal se calentaron a 270 °C durante 20 minutos para evaporar el disolvente. Después, se añadieron 450 µL de HClO₄ (70% v/v) y la mezcla resultante se calentó a 250°C durante 30 minutos. Tras enfriar los tubos durante 15 minutos en un recipiente con agua fría, se añadieron 3,5 mL de agua mili-Q, 500 µL de molibdato de amonio (2,5% p/v) y 500 µL del ácido ascórbico (10% p/v). A continuación, la mezcla resultante se agitó en vortex y se incubó a 100°C durante 7

minutos. Tras enfriar los tubos, se midió la absorbancia de las disoluciones obtenidas (HITACHI U-2900 spectrophotometer, Hitachi High-Tech Corp.; Tokyo, Japan).

Previamente, se elaboró una recta patrón con las concentraciones conocidas de fosfatidilcolina.

C) Determinación de la Eficacia de Encapsulación

La Eficacia de Encapsulación (EE) es la cantidad del fármaco encapsulado en los liposomas respecto a la dosis total del fármaco en el sistema, EE se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{Q_e}{Q_t} \cdot 100$$

Ecuación 12

Donde Q_e es la cantidad del Nor-BNI encapsulada y Q_t es la cantidad de Nor-BNI total utilizada para la preparación de los liposomas.

Para realizar este ensayo, 0,5 mL de la dispersión de liposomas se incubaron durante 1 hora con una mezcla de agua:metanol:dodecilsulfato sódico 1% (45:45:10) para disolver las vesículas lipídicas (Igarashi, Shoji et al. 2012, Borrell, Pons et al. 1990, Keller, Heerklotz et al. 2006). La mezcla resultante se filtró y el contenido en Nor-BNI se analizó mediante HPLC-ECD. El ensayo se realizó por triplicado.

3.6. ANIMALES

Ratas de raza Sprague-Dawley de ambos sexos (Envigo, $n_{\text{female}}=12$ and $n_{\text{male}}=12$) se utilizaron para los estudios farmacológicos y neuroquímicos. En el momento de la cirugía y de los experimentos, los animales pesaban entre 250-300 g en el caso de las hembras y entre 300-360 g en el caso de los machos. Antes de la cirugía y de los experimentos, los animales se alojaron en grupos de tres individuos en jaulas de plástico (48 x 38 x 21 cm³), con acceso a la comida y bebida *ad libitum*, bajo condiciones de temperatura (22°C) y humedad controlados y con el ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas (encendido a las 08:00, apagado a las 20:00). Después de la cirugía y durante la realización de los experimentos, los animales se alojaron individualmente en el mismo tipo de jaulas y bajo las mismas condiciones. Las jaulas con animales se situaron de forma contigua para evitar el estrés por aislamiento. Todos los procesos se llevaron a cabo de acuerdo con el EEC Council Directive 86/609, la legislación española (RD 53/2013) y las políticas de bienestar animal. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Experimentación y Bienestar Animal de la Universitat de València y por el gobierno regional.

3.7. ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

3.7.1. Estudio de Microdiálisis (MD)

Para estudiar el efecto que ejerce el tratamiento con gel intranasal con liposomas cargados de Nor-BNI sobre los niveles de DA en NAc en los animales se utilizó la técnica de microdiálisis *in vivo*. Este método analítico se desarrolló y validó bajo las condiciones experimentales utilizadas en los grupos de investigación NeuroPharad y DOREAL (de las que se formó parte hasta mayo del 2023) durante las últimas décadas. El método de microdiálisis permite detectar los cambios en los niveles extracelulares de DA, evitando alteraciones significativas en los volúmenes intra y extracelulares del área cerebral en estudio.

Este método permite una medida continua del analito en un área cerebral concreta gracias a la implantación de una sonda provista de la membrana de diálisis. En función del tipo de membrana utilizada, el agua y ciertas moléculas de pequeño tamaño pueden pasar a su través (Cano-Cebrián, Zornoza et al. 2005). La membrana se queda rodeada de dos compartimentos acuosos: el espacio extracelular del cerebro y el líquido de perfusión (LCEa) en el interior de la sonda. LCEa fluye a través de la zona a una velocidad constante y conocida. El intercambio de las moléculas entre el espacio extracelular cerebral y el líquido de perfusión se produce gracias a la existencia de un gradiente de concentraciones.

A) Fundamento

El estudio de MD se realiza con el fin de estudiar el efecto de la administración IN de Nor-BNI en los niveles de DA extracelular. Nor-BNI es un antagonista KOR de larga duración con un inicio de efecto retardado. De hecho, tal y como se menciona en el apartado “Introducción”, se trata de un efecto que puede tardar horas en aparecer y dura días e incluso semanas. Por ello, se decidió que la administración del fármaco se realizaría días antes de la sesión de MD. La administración se llevó a cabo en varias sesiones para asegurarnos que el fármaco se administró con éxito.

Al tratarse de un antagonista, su efecto se evaluó mediante el uso de un agonista. U-50488 es un agonista KOR de efecto de acción rápido y corto. La administración de U-50488 conlleva una disminución de los niveles de DA extracelulares gracias a la activación KOR. Sin embargo, en los animales tratados con Nor-BNI tiene lugar un bloqueo KOR

por la acción de este fármaco, por ello, se espera que la administración de agonista no conducirá al descenso de los niveles de DA.

B) Proceso experimental (Figura 10)

- Día 1: Cirugía estereotáxica.
- Día 2-5: Administración de la formulación 1/24 horas, 4 días (1ª sesión - 24 horas después de la cirugía).
- Día 7: Sesión de MD.
- Día 8: Sacrificio y extracción del encéfalo.



Figura 10: Cronograma del proceso experimental

La organización de la sesión de MD está presentada esquemáticamente en la **Figura 12**. El equipo CMA 120 System for freely moving animals (CMA by Harvard Bioscience Inc, South Natick, MA, USA) se utilizó en este experimento (**Figura 11**). Para llevar a cabo el ensayo, el animal, conectado a un brazo móvil con un collar, se situó en el interior del bol previamente limpio. El fondo del bol fue cubierto de serrín del mismo tipo que usa el animal en su jaula. Las sondas implantadas en la cabeza del animal fueron conectadas mediante tubos tipo FEP a la bomba de perfusión de jeringa (jeringas Hamilton 2,5 mL, CMA 4004 Syringe Pump, Harvard instruments, South Natick, MA, USA). La perfusión de LCEa a través de las sondas fue a una velocidad constante de 3,5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La recogida de muestras empezó después de un periodo de lavado (1h). Las muestras fueron recogidas cada 20 minutos y la determinación de DA en ellas se realizó mediante el método HPLC-ECD. Las muestras 1-5 se utilizaron para determinar los niveles basales de DA en el espacio extracelular, mientras que las muestras 6-13 sirvieron para estudiar el efecto de la administración de la formulación con Nor-BNI. La inyección subcutánea del U-50488 se llevó a cabo en el minuto 10 de la recogida del 5º dializado.

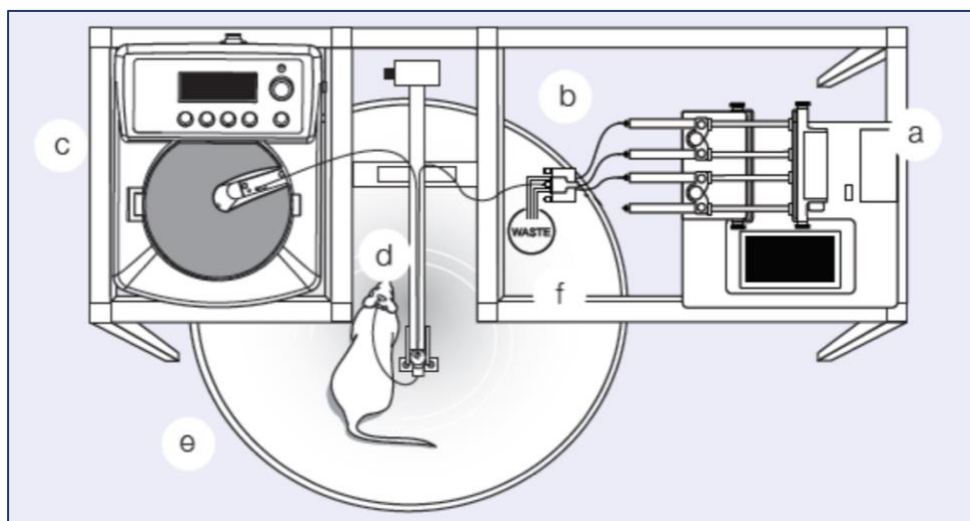


Figura 11: El esquema del sistema “CMA 120 System For Freely Moving Animals”: a) Bomba de jeringas Hamilton CMA 4004; b) Interruptor de nivel líquido CMA 110; c) Colector-Refrigerador de muestras; d) Brazo móvil; e) Bol CMA; f) Mesa instrumental (Fuente: Manual “CMA 120 System For Freely Moving Animals” de Harvard Bioscience, Inc.)

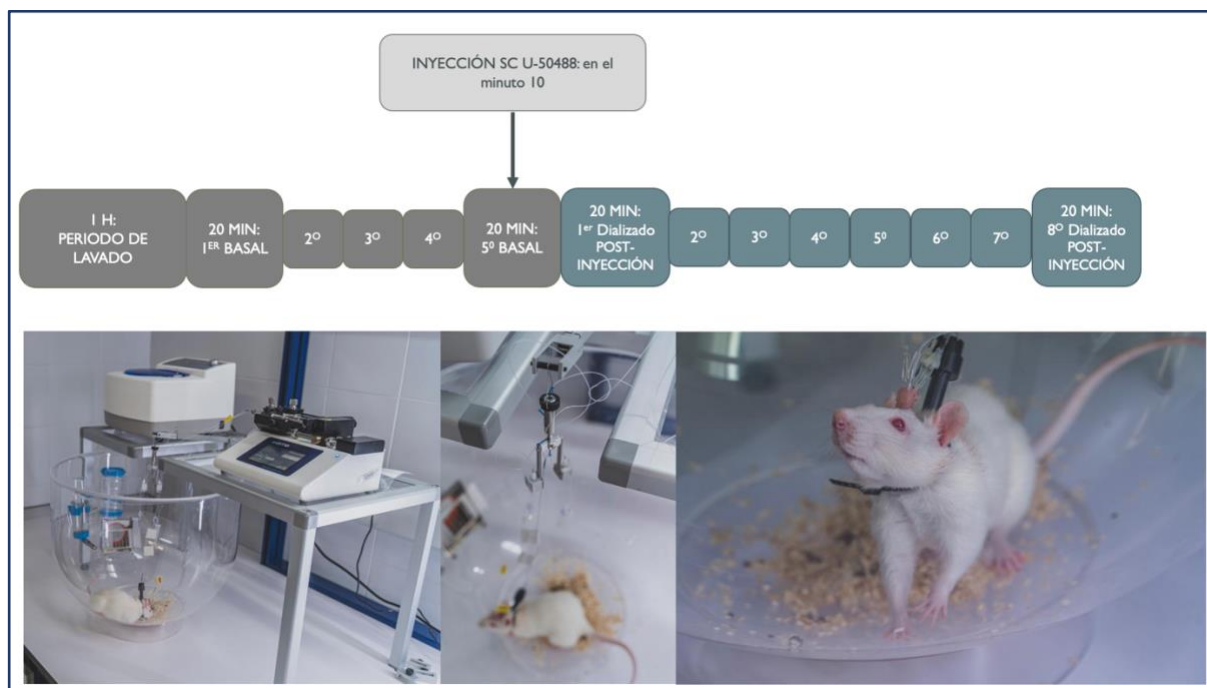


Figura 12: Cronograma del ensayo de microdialisis. Fotografías de la rata en “CMA 120 System For Freely Moving Animals”

C) Sondas de MD

Sondas verticales concéntricas con 2 mm de membrana activa (**Figura 13**) se fabricaron manualmente de acuerdo con el protocolo de Santiago y Westernink para realizar este estudio (Santiago, Westerink 1990). Los materiales utilizados para la fabricación de las sondas fueron los siguientes:

- Membranas Hospal de poliacrilonitrilo (AN69), con el cut-off molecular de 60000 Da (Bologne, Italy), con diámetro interno de 200 μm y externo de 300 μm .
- Tubos de sílice con diámetro interno de 75 μm y externo de 150 μm .
- Tubos no estériles de polietileno (Portex limited, England) con diámetro interno de 0,38 mm y externo de 1.09 mm.
- Las agujas 25 G de 22 mm de largo.
- Resinas Arladit © y Poxipol © y pegamento Cyanoacrylate (Loctite ©).

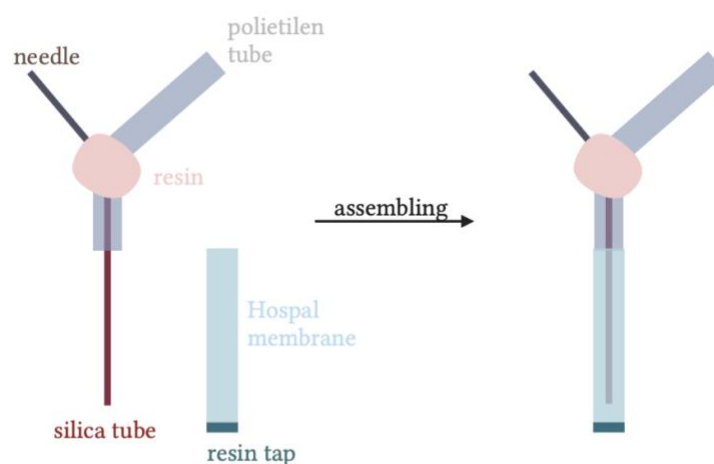


Figura 13: Esquema de fabricación de las sondas de microdiálisis

D) Cirugía

Para proporcionar la analgesia, antes de la cirugía se administró una dosis de 5mg/kg de carprofeno 50 mg/ml (Le Vet Beheer B.V., Oudewater, Netherlands). Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (ESTEVE veterinary) (1,5 MAC, inhalatory VetMet). Una vez se estableció una anestesia profunda, los animales fueron desplazados al aparato estereotáxico (Stoelting, USA). El cuero cabelludo rapado de los animales se desinfectó con una solución de povidona yodada (10%) y clorhexidina (1%) por triplicado antes de realizar el corte de unos 8-10 mm.

Las sondas de MD verticales concéntricas se implantaron en ambos hemisferios de los animales respetando las siguientes coordenadas: anteroposterior +1,4 mm, mediolateral $\pm 1,5$ mm, dorsoventral -7,8 mm desde el bregma para machos y anteroposterior +1,2mm, mediolateral $\pm 1,4$ mm, dorsoventral -7,6 mm desde el bregma para hembras (Paxinos, Watson 2007). Las sondas se fabricaron según el protocolo de Santiago y Westerink 1990 y presentaban 2 mm de membrana activa (Hospal AN69; cutoff 60,000 Da). Una vez instaladas, las sondas se fijaron con cemento dental (**Figura 14**).

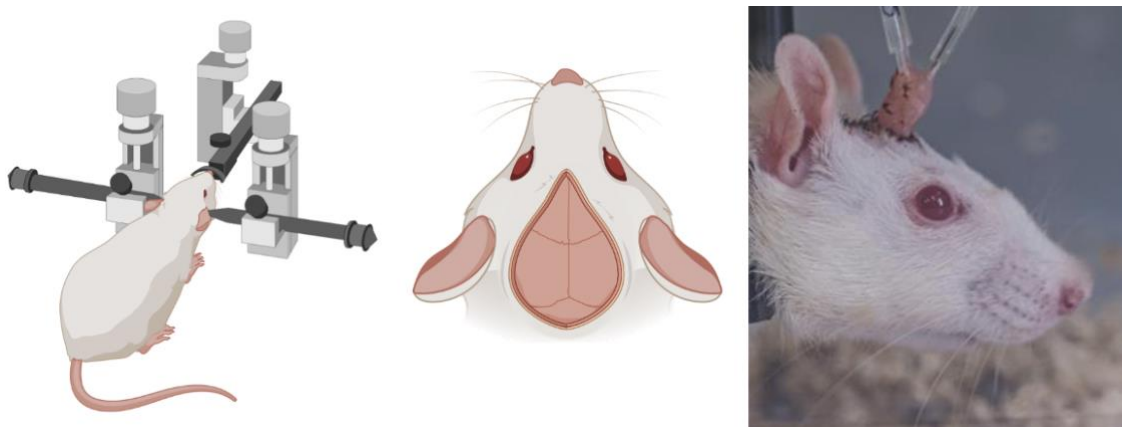


Figura 14: Cirugía estereotóxica y sondas de microdiálisis implantadas

E) Administración intranasal del gel

La administración intranasal del gel se llevó a cabo bajo una anestesia corta con isoflurano (ESTEVE veterinary) (1,5 MAC, inhalatory VetMet) con el fin de reducir el estrés en el animal y mejorar la dosificación. Tanto el gel con Nor-BNI, como el gel blanco se conservaron en nevera (10°C) antes de la sesión de administración para mantener la fluidez de la fórmula. Se administraron 20 μ L de gel por la fosa nasal con la ayuda de micropipeta (Eppendorf Research ® plus pipette) (**Figura 15**). La dosis administrada a cada animal después de los 4 días de tratamiento fue de 0,376 mg/kg.



Figura 15: Administración intranasal del gel en rata

F) Análisis de datos

Los niveles basales de la dopamina se expresaron como (mean $\pm$ SEM) nM. El nivel basal de DA para cada animal se calculó como la media de tres valores basales. La línea base se define como el valor medio de los niveles de DA en tres muestras consecutivas que difieren entre sí en menos del 10% del contenido de DA. Los niveles de dopamina fueron transformados al porcentaje de la línea base para cada animal individualmente. Después, se llevó a cabo el análisis estadístico de estos datos mediante el ANOVA de dos vías para medidas repetidas, donde el grupo (Blanco o Nor-BNI) fue el factor intersujeto y el tiempo fue intrasujeto. A continuación, la interacción significativa del tiempo por grupo se analizó mediante el análisis de las medias de Bonferroni para comparaciones múltiples. El efecto significativo de tiempo fue analizado en cada grupo de forma individual mediante la prueba de ANOVA de una vía para medidas repetidas, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los valores post-tratamiento fueron comparados con la última medida de la línea base. El programa utilizado para los análisis estadísticos fue el SPSS en su versión 24.0.

G) Histología y posicionamiento de sondas

Al concluir todos los experimentos, se realizó el posicionamiento de las sondas mediante un análisis histológico. Se administró sobredosis de pentobarbital (65 mg/kg) a los animales. Los encéfalos se extrajeron rápidamente y se congelaron en isopentano. Los encéfalos congelados se conservaron a -25 °C hasta su análisis histológico. Para llevar a cabo el estudio histológico, los cortes cerebrales de 40 μ m de espesor se obtuvieron con la ayuda de un criostato. Los cortes obtenidos se fijaron en los portaobjetos gelatinizados

y se sometieron a la tinción de violeta de cresilo, siguiendo el protocolo estándar. El posicionamiento de las sondas se realizó mediante la microscopía óptica empleando como referencia el libro “Rat Brain Atlas” (Paxinos, Watson 2007).

3.7.2. Determinación de Nor-BNI en tejido cerebral

A) Soluciones de estabilización y de homogenización

Las SE y de SH se utilizaron para evitar la oxidación de Nor-BNI y promover la precipitación de las proteínas en las muestras cerebrales (ver 3.1.9).

B) Preparación de muestras

Las regiones cerebrales del córtex, corteza prefrontal, cerebelo y mesencéfalo fueron el objeto del estudio. Primero, el tejido cerebral se pesó y se depositó en el fondo de un Eppendorf. A continuación, se añadió 1,5 mL de SH por cada gramo del tejido. El tejido cerebral se homogenizó mecánicamente durante 2 minutos. Después, la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 13.200 rpm en cámara fría (4°C). La determinación de Nor-BNI en el sobrenadante se llevó a cabo por HPLC-ECD.

C) Análisis estadístico de datos

Para comparar los picos obtenidos a partir del análisis cromatográfico de las muestras cerebrales de los animales tratados con Nor-BNI y con Blanco, se empleó la prueba T-student para muestras independientes, si bien previamente se llevó a cabo una prueba de Levene para evaluar la igualdad de varianzas. El programa utilizado para los análisis estadísticos fue el SPSS en su versión 24.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

La determinación de Nor-BNI y de DA, mediante el método HPLC-ECD bajo las condiciones descritas, dio como resultado un único pico cromatográfico bien definido con un tiempo de retención de 8,60 y 13,72 minutos, respectivamente. Los cromatogramas se muestran en la **Figura 16**.

La relación entre las áreas de los picos cromatográficos y las concentraciones de Nor-BNI se estudió en el rango de concentraciones de 6 a 120 $\mu\text{g/mL}$. Por su parte, para la DA, la relación entre las alturas de los picos y las concentraciones de DA se estudió en el rango de concentraciones comprendido entre 0,429 y 6,5 nM. Los resultados obtenidos se muestran en las **Tablas 7-10**. La presentación gráfica de la regresión lineal para las curvas de concentración interdía e intradía de ambos compuestos se encuentran en las **Figuras 17-20**.

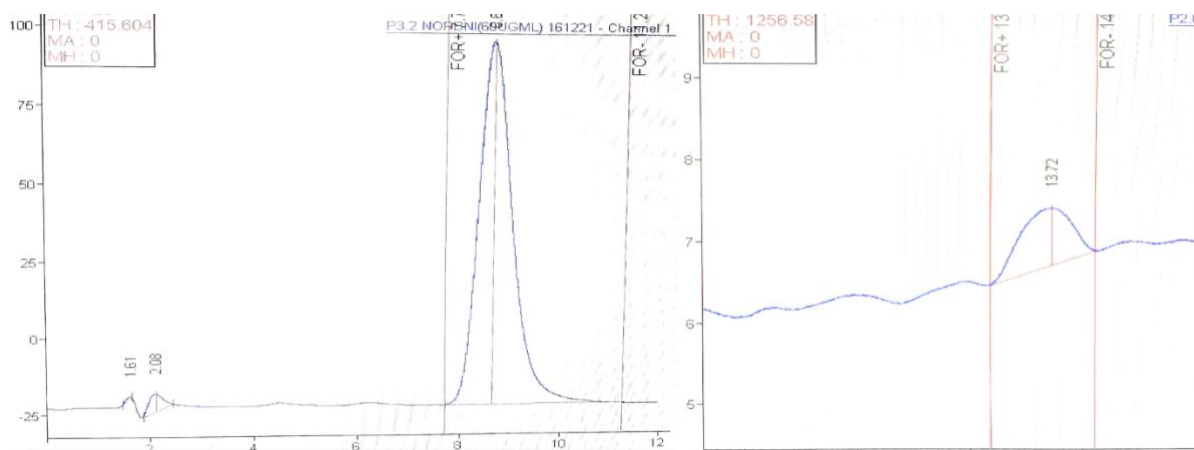


Figura 16: Picos cromatográficos de Nor-BNI (60 $\mu\text{g/mL}$) (izq.) y DA (6 nM) (dcha.)

Tabla 7: Curvas de calibrado (CC) intradía de Nor-BNI. Intervalo concentraciones: 6 - 120 µg/mL

NOR-BNI: CURVAS CALIBRADO INTRADÍA				
Concentración (µg/mL)	Área (CC1.1)	Área (CC1.2)	Área (CC1.3)	Media (media±SD)
120	128,23	126,28	123,05	125,85±2,62
60	57,12	54,95	53,91	55,33±1,64
30	28,41	26,55	28,97	27,98±1,27
15	15,27	14,67	14,12	14,69±0,58
6	6,12	6,52	6,65	6,43±0,28

Tabla 8: Curvas de calibrado (CC) interdía de Nor-BNI. Intervalo concentraciones: 6 - 120 µg/mL

NOR-BNI: CURVAS CALIBRADO INTERDÍA				
Concentración (µg/mL)	Área (CC1)	Área (CC2)	Área (CC3)	Media (media±SD)
120	125,85	113,92	118,93	119,57±5,60
60	55,33	57,68	56,49	56,50±1,18
30	27,98	33,46	31,58	31,01±2,79
15	14,69	15,36	14,87	14,97±0,35
6	6,43	5,49	5,49	5,80±0,54

Tabla 9: Curvas de calibrado (CC) intradía de DA. Intervalo concentraciones: 0,429 - 6,5 nM

DOPAMINA: CURVAS CALIBRADO INTRADÍA				
Concentración (nM)	Altura (CC1.1)	Altura (CC1.2)	Altura (CC1.3)	Media (media±SD)
6,5	4,1	4,18	3,88	4,05±0,16
2,6	1,97	1,86	1,74	1,86±0,12
1,3	0,99	0,89	0,92	0,93±0,05
0,429	0,53	0,52	0,52	0,52±0,006

Tabla 10: Curvas de calibrado (CC) interdía de DA. Intervalo concentraciones: 0,429 - 6,5 nM

DOPAMINA: CURVAS CALIBRADO INTRADÍA				
Concentración (nM)	Altura (CC1)	Altura (CC2)	Altura (CC3)	Media (media±SD)
6,5	4,03	4,05	4,03	4,04±0,01
2,6	1,89	1,86	1,79	1,85±0,05
1,3	1,01	0,93	1,02	0,99±0,05
0,429	0,53	0,52	0,53	0,53±0,004

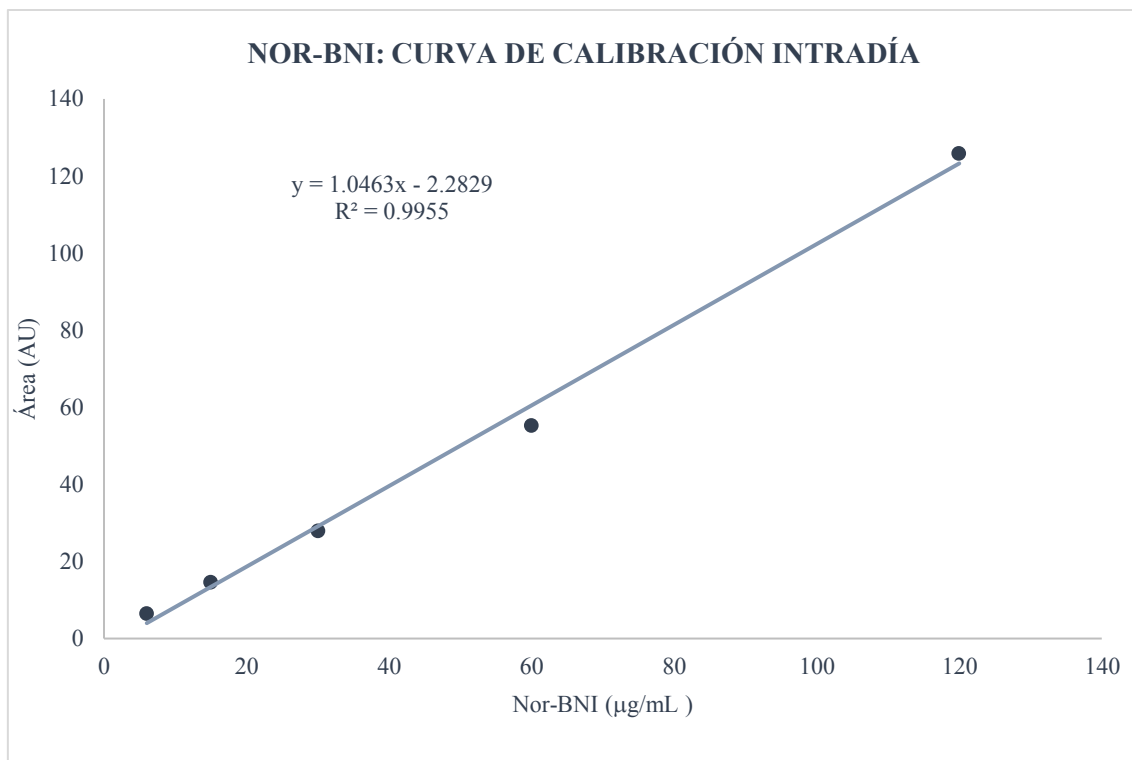


Figura 17: CC intradía de Nor-BNI. Promedio de las CC intradía vs. Concentraciones 6-120 µg/mL

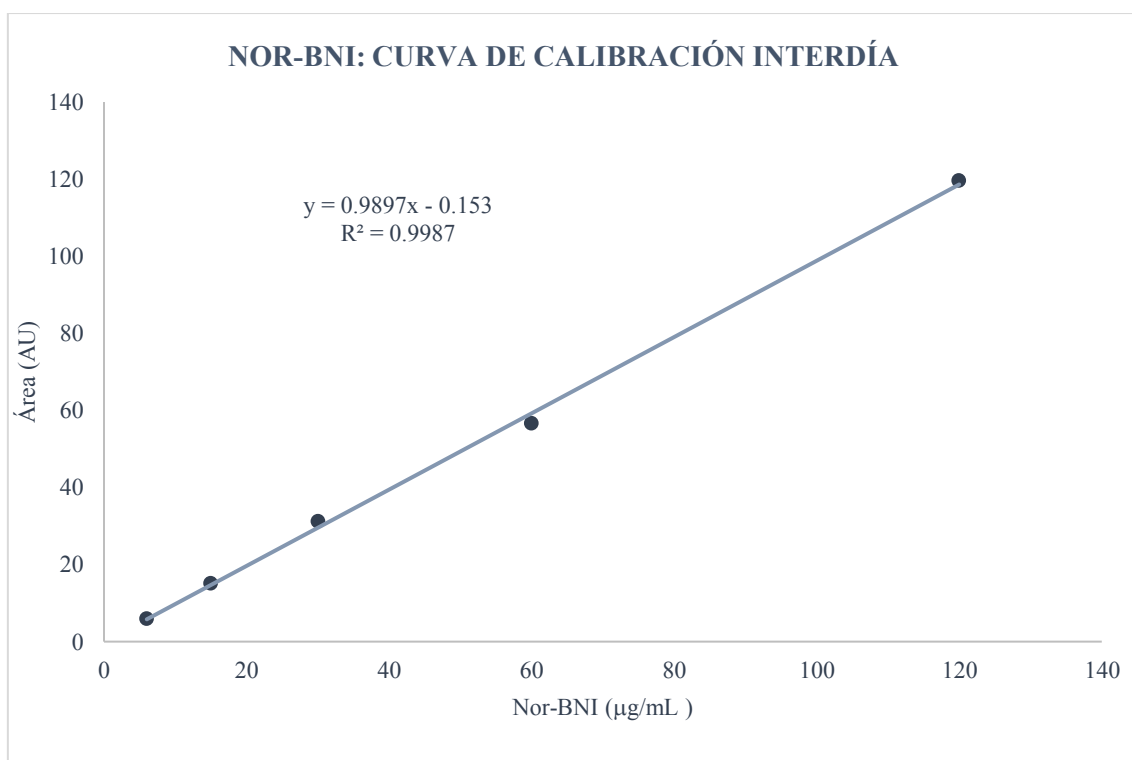


Figura 18: CC interdía de Nor-BNI. Promedio de las CC interdía vs. Concentraciones 6-120 µg/mL

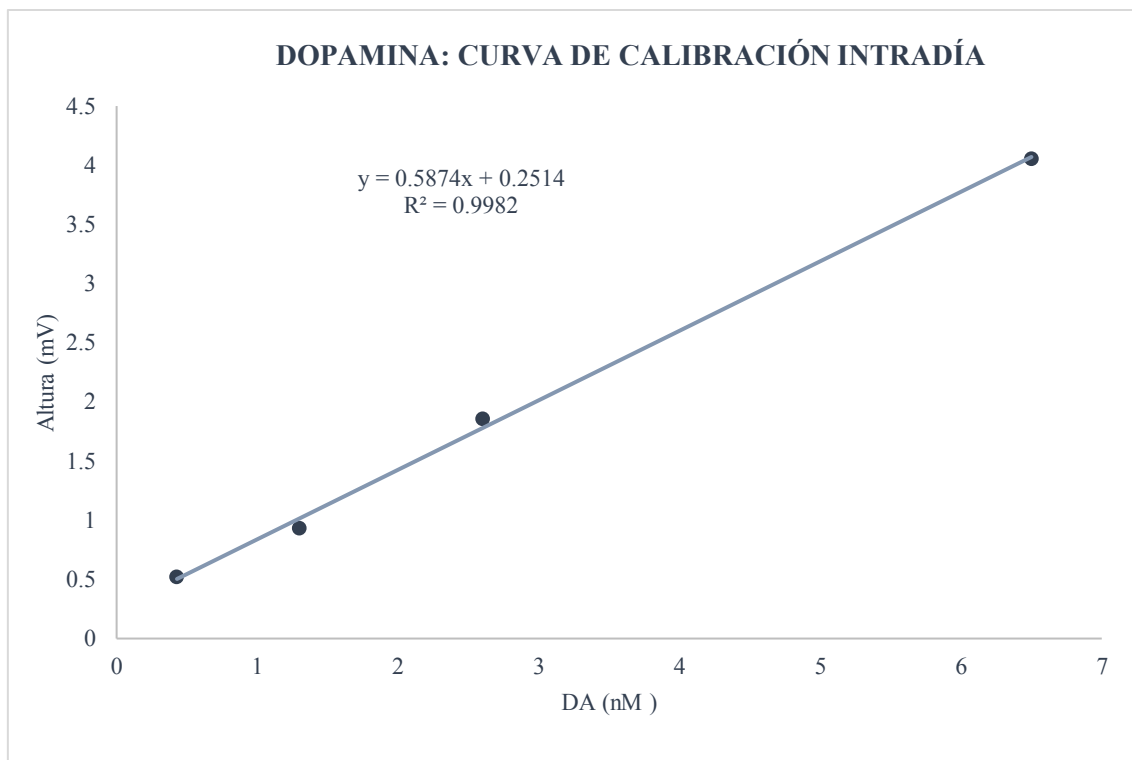


Figura 19: CC intradía de DA. Promedio de las CC intradía vs. Concentraciones 0,429-6,5 nM

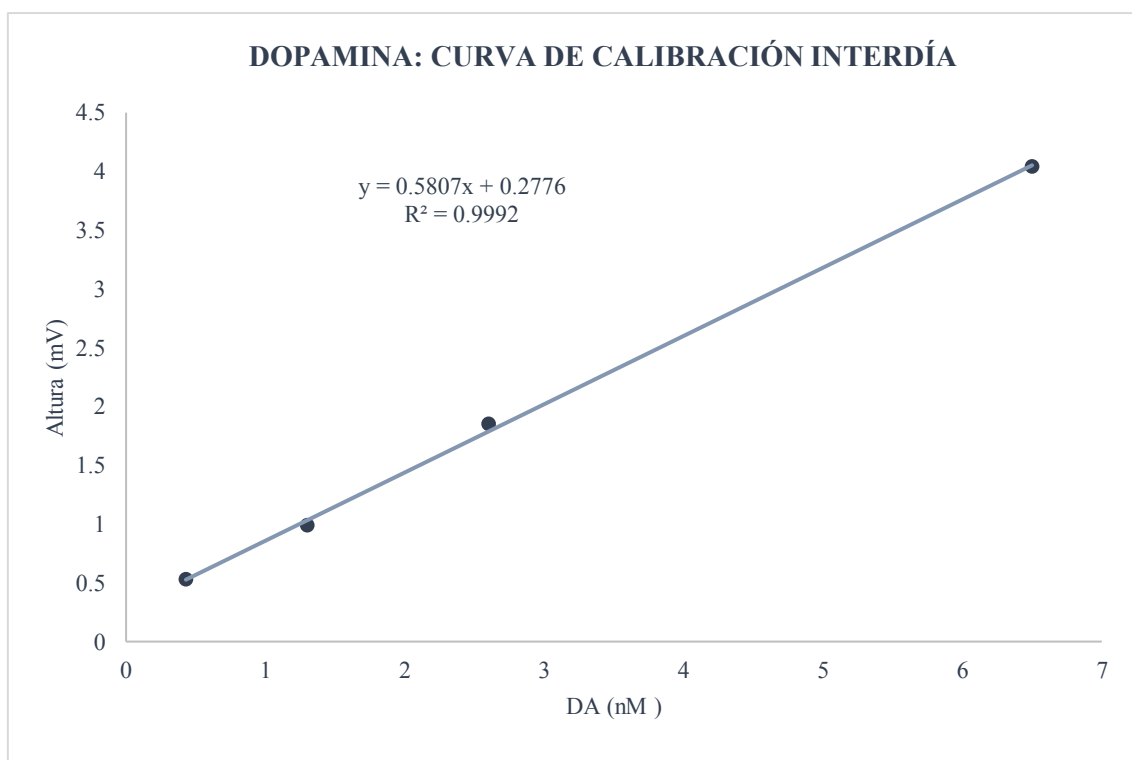


Figura 20: CC interdía de DA. Promedio de las CC interdía vs. Concentraciones 0,429-6,5 nM

La **linealidad** de los métodos se demostró mediante la evaluación de los coeficientes de determinación (R^2) de las regresiones lineales. En todos los casos, el R^2 fue superior al 0,95 (**Tabla 11, Tabla 12**). Por ello, *ambos métodos analíticos cumplen con el criterio de linealidad*.

Los **límites de detección (LD)** y de **cuantificación (LC)** calculados a partir de los valores obtenidos para tres curvas patrón realizadas en tres días diferentes fueron de **0,2730 nM** y **0,9103 nmol**, respectivamente, para la DA. A su vez, en el caso del Nor-BNI, el LD y el LC fueron de **5,699 µg/mL** y **18,995 µg**, respectivamente. La **sensibilidad** del método fue de **0,9897±1,88 µg/mL** para Nor-BNI y de **0,5807±0,0528 nM** para DA.

El coeficiente de variación (CV) y el error relativo (Er) se calcularon para la evaluación de la **precisión** y la **exactitud** de los métodos analíticos, respectivamente. Los resultados obtenidos se representan en las **Tablas 13-18**. Todos los valores calculados se encontraron por debajo del 10%, por lo cual se puede considerar que *ambos métodos cumplen con los criterios de exactitud y de precisión* (Bioanalytical method validation).

En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que *ambos métodos analíticos desarrollados son satisfactorios y válidos para la determinación y cuantificación de los analitos de interés*.

Tabla 11: CCs Nor-BNI. Parámetros del ajuste (a – intercepto; b – pendiente) y coeficientes de determinación

CURVAS CALIBRADO NOR-BNI			
Curva	a	b	R ²
CC1.1	-2,3274	1,0683	0,9963
CC1.2	-2,7955	1,0517	0,9943
CC1.3	-1,725	1,0187	0,9953
CC2	1,8529	0,9379	0,9978
CC3	0,029	0,9849	0,9986
CC Intradía	-0,153	0,9897	0,9987
CC Interdía	-2,2829	1,0463	0,9955

Tabla 12: CCs Dopamina. Parámetros del ajuste (a – intercepto; b – pendiente) y coeficientes de determinación

CURVAS CALIBRADO DOPAMINA			
Curva	a	b	R ²
CC1.1	0,2985	0,5906	0,9965
CC1.2	0,2034	0,6128	0,9977
CC1.3	0,2524	0,5887	0,9992
CC2	0,3018	0,5774	0,9986
CC3	0,2797	0,5773	1
CC Intradía	0,2514	0,5874	0,9982
CC Interdía	0,2776	0,5807	0,9992

Tabla 13: Nor-BNI: Determinación del VC (%) intradía

NOR-BNI: COEFICIENTE DE VARIACIÓN INTRADÍA						
Concentración (µg/mL)	Área (CC1.1)	Área (CC1.2)	Área (CC1.3)	Media (mean)	SD	VC (%)
120	128,23	126,28	123,05	125,85	2,62	2,08
60	57,12	54,95	53,91	55,33	1,64	2,96
30	28,41	26,55	28,97	27,98	1,27	4,52
15	15,27	14,67	14,12	14,69	0,58	3,91
6	6,12	6,52	6,65	6,43	0,28	4,30

Tabla 14: Nor-BNI. Determinación del VC (%) interdía

NOR-BNI: COEFICIENTE DE VARIACIÓN INTERDÍA						
Concentration (µg/mL)	Area (CC1)	Area (CC2)	Area (CC3)	Average (mean)	SD	VC (%)
120	125.85	113.92	118.93	119.57	5.60	5.01
60	55.33	57.68	56.49	56.50	1.18	2.08
30	27.98	33.46	31.58	31.01	2.79	8.99
15	14.69	15.36	14.87	14.97	0.35	2.33
6	6.43	5.49	5.49	5.80	0.54	9.35

Tabla 15: Nor-BNI: Determinación del Er (%)

NOR-BNI: EVALUACIÓN DE EXACTITUD				
C_{exp} (µg/mL)	Área(media todas CC)	SD	C_e (µg/mL)	Er (%)
120	122,08	5,76	121,79	-1,47
60	56,03	1,56	56,18	6,80
30	29,79	2,73	30,12	-0,40
15	14,86	0,50	15,28	-1,86
6	6,05	0,55	6,54	-8,23

Tabla 16: Dopamina: determinación del VC (%) intradía

DOPAMINA: COEFICIENTE DE VARIACIÓN INTRADÍA						
Concentración (nM)	Altura (CC1.1)	Altura (CC1.2)	Altura (CC1.3)	Media (media)	SD	VC (%)
6,5	4,1	4,18	3,88	4,05	0,16	3,83
2,6	1,97	1,86	1,74	1,86	0,12	6,19
1,3	0,99	0,89	0,92	0,93	0,05	5,50
0,429	0,53	0,52	0,52	0,52	0,006	1,10

Tabla 17: Dopamina: determinación del VC (%) interdía

DOPAMINA: COEFICIENTE DE VARIACIÓN INTERDÍA						
Concentración (nM)	Altura (CC1)	Altura (CC2)	Altura (CC3)	Media (media)	SD	VC (%)
6,5	4,03	4,05	4,03	4,04	0,01	0,33
2,6	1,89	1,86	1,79	1,85	0,05	2,76
1,3	1,01	0,93	1,02	0,99	0,05	4,80
0,429	0,53	0,52	0,53	0,53	0,004	0,73

Tabla 18: Dopamina: Determinación del Er (%)

DOPAMINA: EVALUACIÓN DE EXACTITUD				
C_{exp} (nM)	Altura (media todas CC)	SD	C_e (µg/mL)	Er (%)
6,5	4,04	0,11	6,48	0,305
2,6	1,85	0,09	2,7	-3,84
1,3	0,966	0,06	1,18	9,94
0,429	0,526	0,01	0,43	0,91

4.2. GEL INTRANASAL TERMOSENSIBLE: DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y REOLÓGICAS

4.2.1. Geles Blancos

Las temperaturas de gelificación para cada composición de Geles Blancos determinadas por el método de Miller-Donovan están resumidas en la **Tabla 19**.

La **temperatura de gelificación** (temperatura de transición solución-gel) parece estar relacionada con la composición de los geles. Cuanto mayor es la concentración de polímeros, menor es la temperatura de gelificación. Además, a mayor proporción de Pluronic® **I**, polímero con peso molecular más alto que **II**, también se produce la transición solución-gel a temperaturas inferiores. De este modo, el GB1 (20% **I**, 10% **II**) presenta la temperatura de gelificación más baja: $23,3 \pm 0,58^{\circ}\text{C}$. A pesar de que la proporción total de polímeros es de un 20% en los geles GB2 y GB3, el GB2 muestra una temperatura de gelificación más baja ($26,7 \pm 0,58^{\circ}\text{C}$) que el GB3 ($47,3 \pm 0,58^{\circ}\text{C}$) gracias a su mayor proporción en **I**. El GB4, gel con la menor proporción de polímeros (10% **I**, 5% **II**), gelifica a temperaturas muy altas ($>100^{\circ}\text{C}$).

Del mismo modo, la **viscosidad** de los geles también parece estar relacionada con su composición. El incremento de viscosidad lugar a temperaturas tanto más bajas cuanto mayor es la proporción de polímeros. Además, geles con **I**, presentaron mayores incrementos de viscosidad a baja temperatura ($\text{GB1} > \text{GB2} > \text{GB3} > \text{GB4}$) (**Figura 21**).

En base a los resultados obtenidos, el gel GB4 fue excluido de los estudios posteriores ya que sus características físicoquímicas y reológicas (temperatura de gelificación alta, viscosidad baja) no se corresponden con las buscadas en el desarrollo del trabajo.

Tabla 19: Temperatura de gelificación de Geles blancos determinada por el método de Miller-Donovan

Gel	GB1	GB2	GB3	GB4
$T_g^a \pm \text{SD}, ^{\circ}\text{C}$	$23,3 \pm 0,58$	$26,7 \pm 0,58$	$47,3 \pm 0,58$	>100

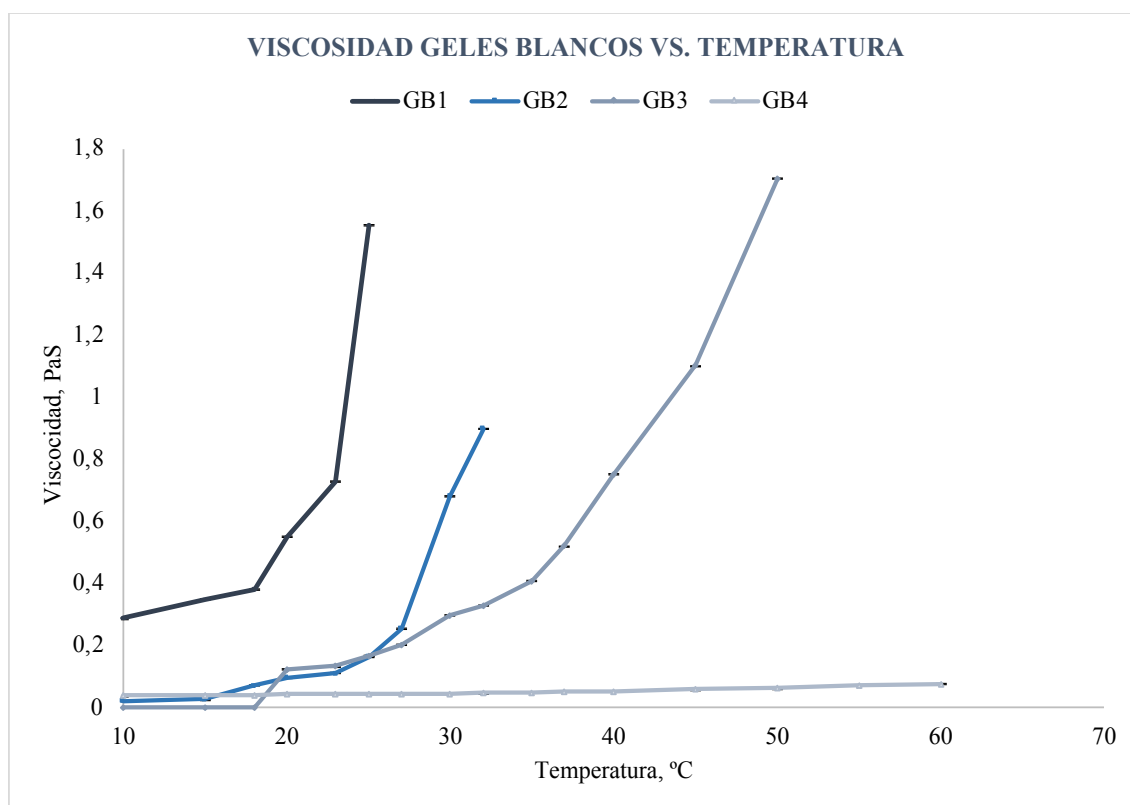


Figura 21: Geles Blancos. Viscosidad en función de temperatura

4.2.2. Geles cianocobalamina

La **temperatura de gelificación** para los geles con cianocobalamina (Vitamina B12) o GC, se determinó mediante el método de Miller-Donovan. En la **Tabla 20**, se presentan las temperaturas de gelificación para los diferentes tipos de geles.

El comportamiento fisicoquímico de los geles GC parece estar condicionado no sólo por su composición polimérica, sino también por la presencia del fármaco libre y por su interacción con los polímeros. Parece ser, que la interacción de la Vitamina B12 con el Pluronic **I** incrementa la capacidad de gelificación del polímero. Como resultado, los geles GC con alta proporción de **I** gelifican a temperaturas más bajas que los GB (GB2 vs GC2: 20% **I**, $\Delta T^a = -8^\circ\text{C}$; GB1 vs GC1: 20% **I** y 10% **II**, $\Delta T^a = -2^\circ\text{C}$). Por otra parte, parece ser que la presencia de **II** en la mezcla de polímeros contrarresta este efecto de la cianocobalamina sobre **I**. Puede ser debido al secuestro de Vitamina B-12 por **II** que conduce al incremento del **I** libre o, bien, a la interacción entre los polímeros. De esta manera, podemos observar que el descenso de la temperatura del gel tipo G1 es menos pronunciada (GB1 vs GC1: 20% **I** y 10% **II**, $\Delta T^a = -2^\circ\text{C}$) que en el caso del gel tipo G2, compuesto sólo por **I** (GB2 vs GC2: 20% **I**, $\Delta T^a = -8^\circ\text{C}$). De hecho, para el gel tipo G3,

donde la proporción de polímeros es 1:1, se observa un incremento de temperatura de gelificación (GB3 vs GC3: 10% **I** y 10% **II**, $\Delta T^a = +8^\circ\text{C}$).

La **viscosidad** de los geles GC se estudió con la ayuda del viscosímetro rotatorio. Los resultados obtenidos se pueden observar en las **Figuras 22-25**. La influencia que ejerce la presencia de Vitamina B12 en los geles observados en este experimento va acorde con las tendencias del estudio de temperaturas de gelificación. En presencia de cianocobalamina, la capacidad de gelificación del polímero **I** incrementa, por lo cual la viscosidad del gel GC2 incrementa a temperaturas más bajas que en el gel GB2. De hecho, podemos observar que este incremento se produce bruscamente, de manera que a temperaturas inferiores a 15°C GC2 es tan líquido como una solución acuosa y su viscosidad no es medible (en las condiciones de este ensayo), sin embargo, en el rango de temperaturas de $15\text{--}18^\circ\text{C}$, la viscosidad incrementa bruscamente, produciéndose una gelificación completa a los 18°C .

Por otro lado, la presencia del **II** en la mezcla contrarresta el incremento de viscosidad del **I** en presencia de la Vitamina B12. Por ello, la viscosidad del GC1 incrementa a las temperaturas ligeramente más altas que en caso del GB1. De hecho, altas proporciones del **II** en geles conduce a la disminución de la viscosidad de los geles en presencia de la Vitamina B12 (GC3 vs. GB3).

Tabla 20: Temperatura de gelificación de Geles cianocobalamina determinada por el método de Miller-Donovan

Gel	GC1	GC2	GC3
$T_g \pm \text{SD}, ^\circ\text{C}$	$21,3 \pm 0,58$	$18,7 \pm 0,58$	$55,3 \pm 0,58$

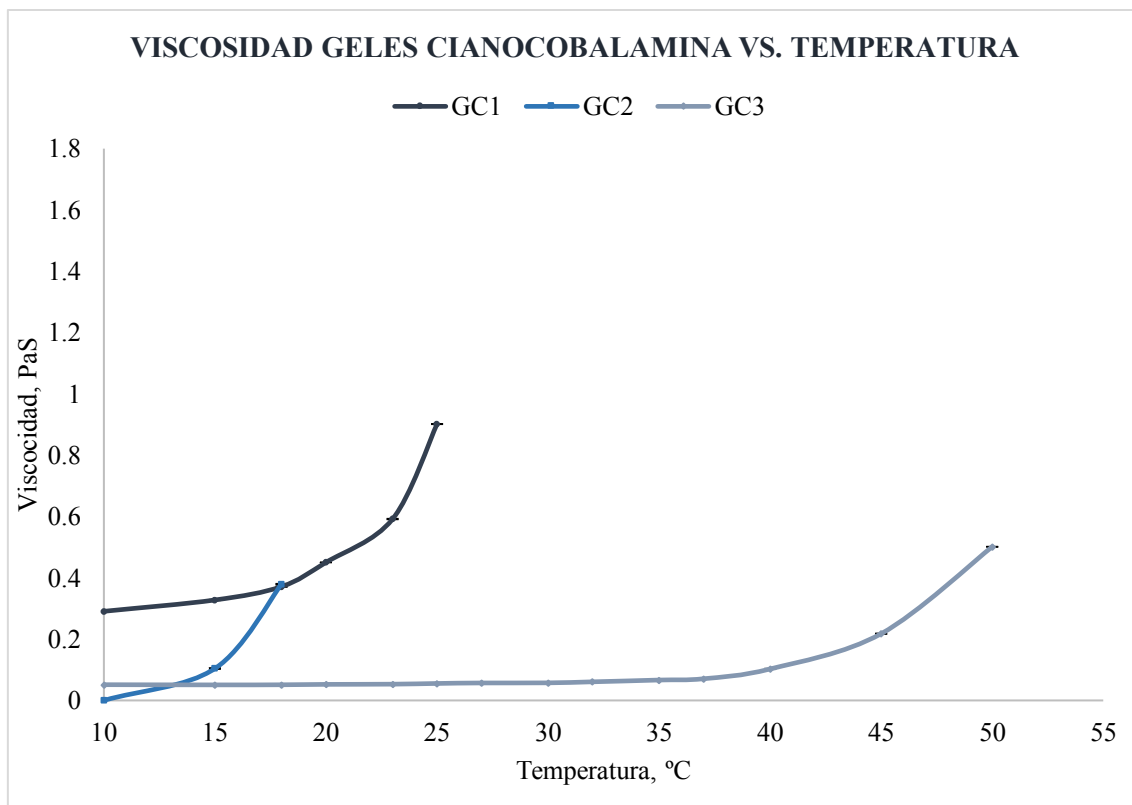


Figura 22: Geles Cianocobalamina. Viscosidad en función de temperatura

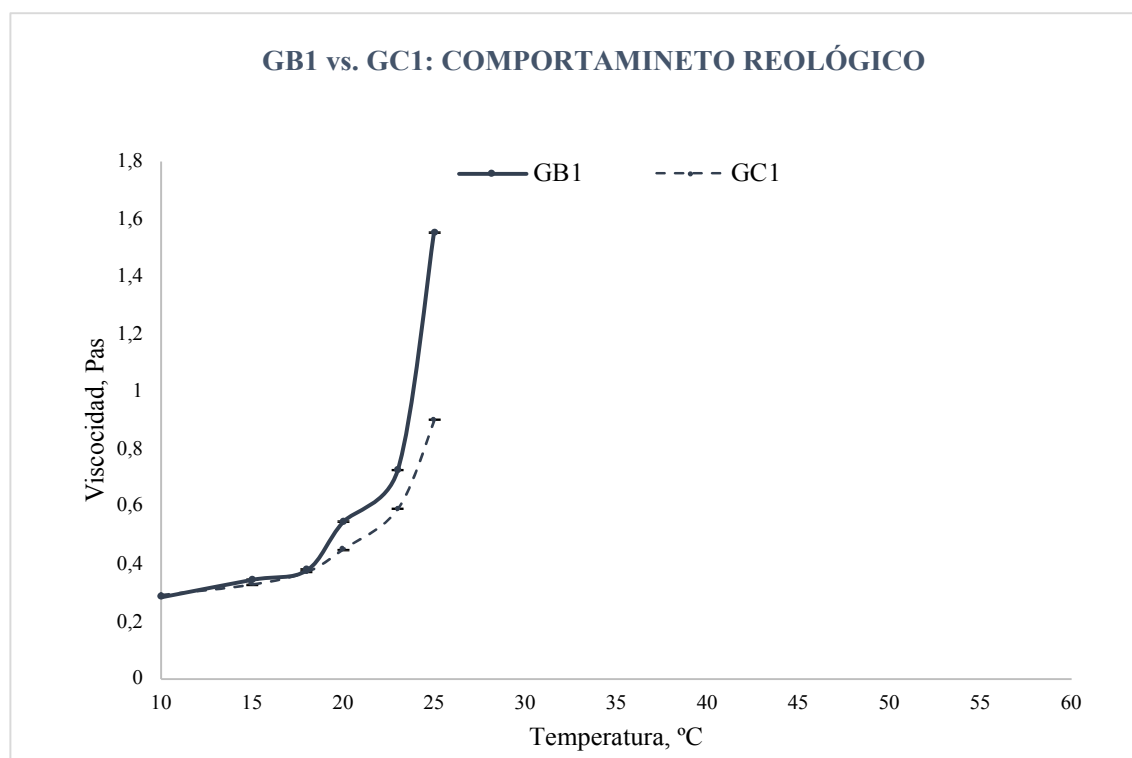


Figura 23: Geles GB1 vs. GC1: influencia de la cianocobalamina en el comportamiento reológico del gel tipo G1

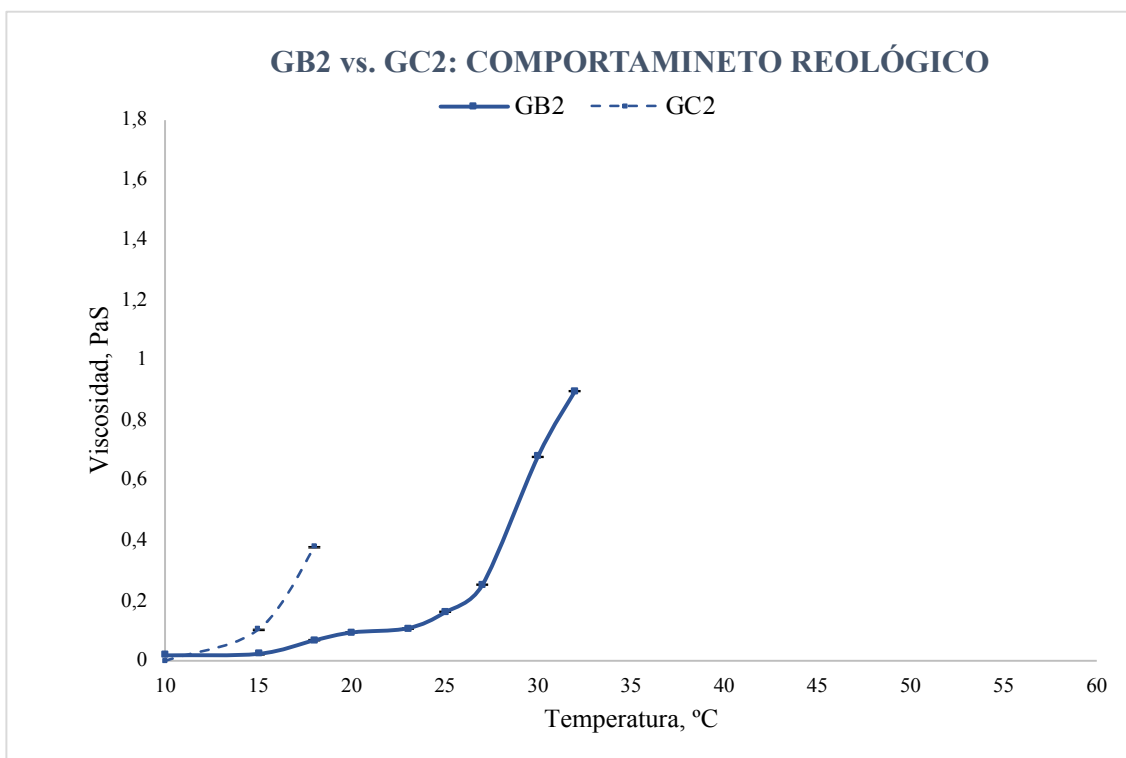


Figura 24: Geles GB2 vs. GC2: influencia de la cianocobalamina en el comportamiento reológico del gel tipo G2

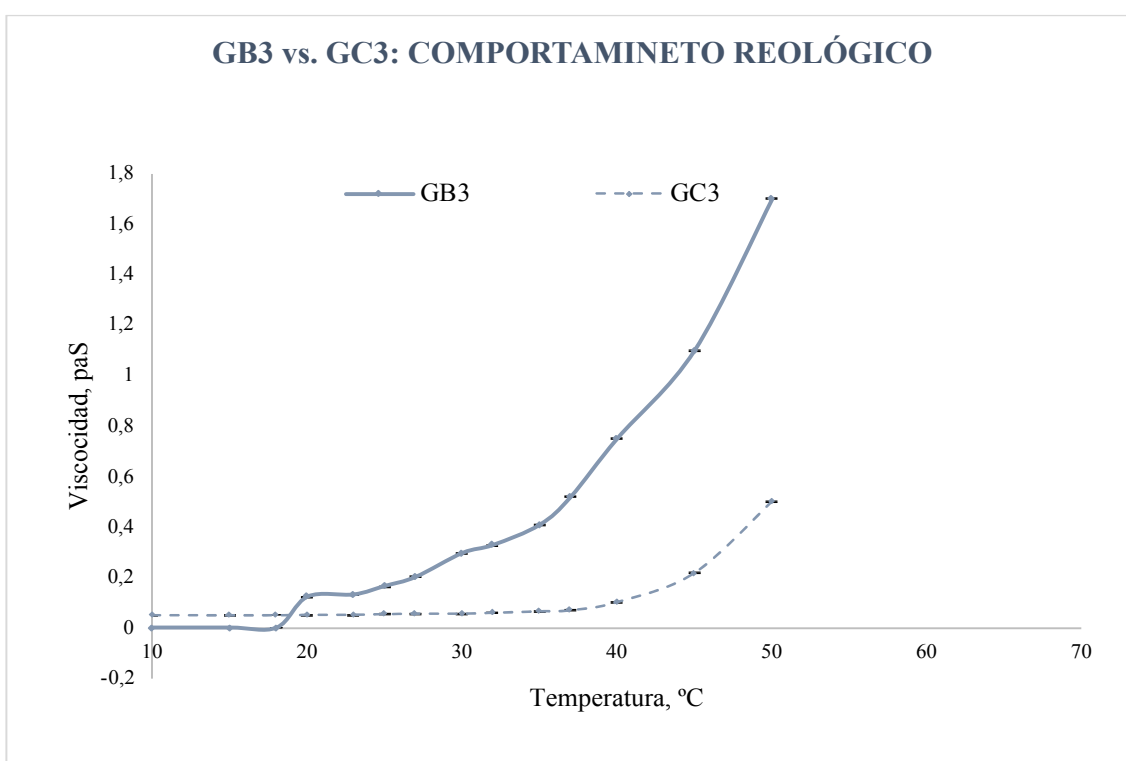


Figura 25: Geles GB3 vs. GC3: influencia de la cianocobalamina en el comportamiento reológico del gel tipo G3

Finalmente, se llevó a cabo el **estudio de liberación para los geles GC**. La solución acuosa de vitamina B12 se utilizó como control, ya que representa el perfil de difusión del fármaco en ausencia de limitaciones. Todas las formulaciones estudiadas mostraron perfiles de liberación controlada del fármaco (**Figura 26**). La liberación de la vitamina B12 desde las formulaciones objeto de estudio, se produjo de forma más rápida en las etapas iniciales del proceso gracias a la existencia de un gradiente de concentraciones entre los medios receptor y dador (Gulati, Kant et al. 2015). Al principio del ensayo, la cantidad de fármaco detectada en el medio receptor fue más elevada para la solución acuosa de la Vitamina B12 que para los geles. Se observaron las diferencias en el proceso de liberación del fármaco desde los geles. Estas diferencias van acordes con sus propiedades fisicoquímicas y reológicas: cuanto más baja es la temperatura de gelificación del gel y más alta es su viscosidad, menor es la velocidad de liberación del fármaco ($GC2 < GC1 < GC3$). Por tanto, la resistencia que pone el gel a la liberación del fármaco parece depender de su composición polimérica y las interacciones existentes entre los polímeros y el fármaco. Probablemente, la cantidad de fármaco liberada a largo plazo también se ve afectada por la composición del gel y sus propiedades fisicoquímicas y reológicas: la menor cantidad liberada de la Vitamina B12 corresponde al GC2, mientras que la mayor al GC3.

Se ajustaron diferentes modelos matemáticos a los datos experimentales de la liberación de vitamina B12: Korsmeyer-Peppas, Kim and Peppas-Sahlin. La realización del modelado matemático es recomendable, ya que ayuda al diseño de futuros modelos *in vivo* para el estudio de las formulaciones (Lu, ten Hagen 2020). Para la elección del mejor ajuste, se utilizó el AIC (**Tabla 21**). Los parámetros de ajuste de cada modelo están representados en la **Tabla 22**.

Los valores más bajos de AIC se obtuvieron para el modelo Korsmeyer-Peppas en el caso de las formulaciones en gel, indicando el mejor ajuste a los datos experimentales. Sin embargo, para la solución de la vitamina B12 el mejor modelo cinético fue la modificación de Kim del modelo de Korsmeyer-Peppas. Para la solución acuosa de la vitamina B12 y las formulaciones GC1 y GC2, los modelos cinéticos elegidos indican que la liberación del fármaco se produce por mecanismo mixto: tienen lugar tanto el fenómeno de difusión, como el de la relajación ($0,5 < n < 0,85$). En el caso del GC3, la liberación se produjo mayoritariamente por el proceso de relajación ($0,85 < n < 1$).

En base a los resultados obtenidos para las formulaciones GC, el gel con composición tipo G3 fue excluido de los estudios posteriores debido a su baja viscosidad y alta temperatura de gelificación en presencia del principio activo.

Tabla 21: Valores de AIC de diferentes modelos cinéticos para cada formulación

Formulación	GC1	GC2	GC3	Solution
AIC Kormsmeier-Peppas	47,09	19,58	50,68	67,66
AIC Kim	54,70	24,75	58,47	64,85
AIC Peppas-Sahlin	55,70	20,83	59,65	72,78

Tabla 22: Parámetros cinéticos de diferentes modelos matemáticos obtenidos para cada formulación

Formulación	GC1	GC2	GC3	Solution
Kormsmeier-Peppas				
n	0,8463	0,8406	0,8545	0,5147
k	3,9599	2,9303	4,8139	19,738
Kim				
n	0,8472	0,8586	0,8509	0,5116
k	3,9071	2,7423	4,8325	19,96
Peppas-Sahlin				
n	0,8240	0,8226	0,8319	0,5078
k ₁	2,1346	1,5670	2,5980	10,1537
k ₂	2,1346	1,5670	2,5980	10,1537

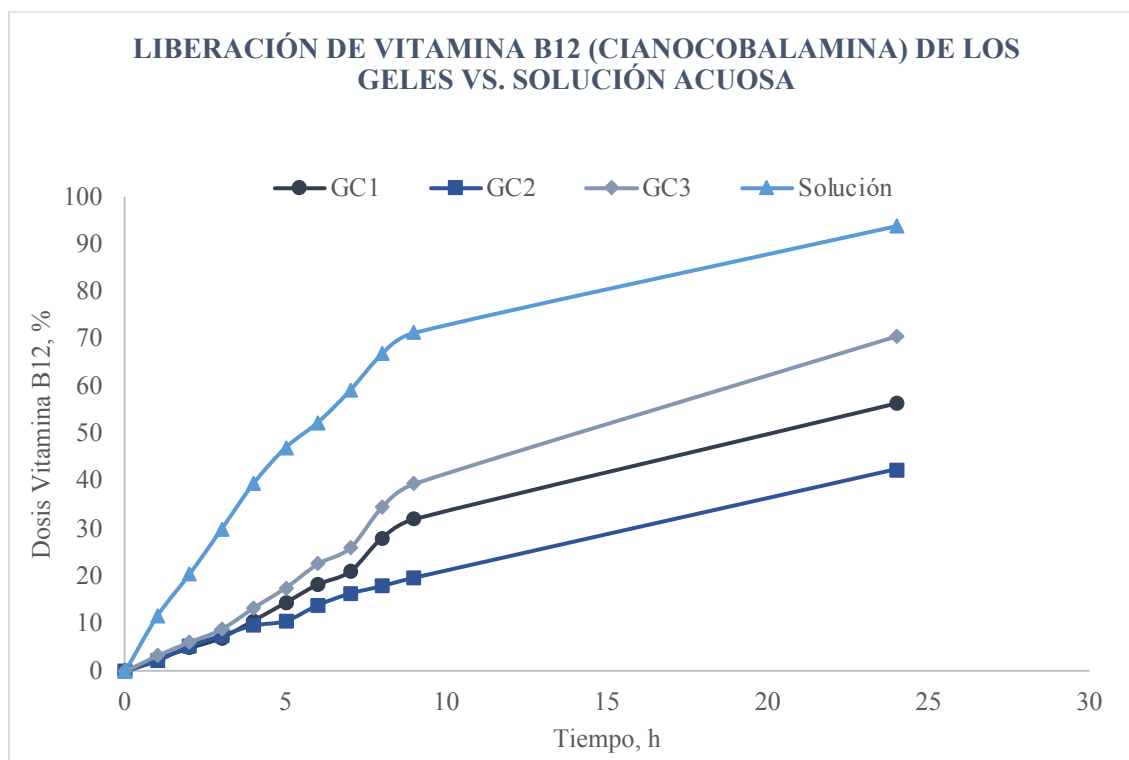


Figura 26: Perfiles de liberación de Vitamina B12 de los geles y de la solución

4.2.3. Geles Liposomasles Blancos

La temperatura de gelificación de los geles liposomales blancos (GLB) parece estar influenciada por la presencia de los liposomas. Los resultados obtenidos mediante el método de Miller-Donovan se encuentran resumidos en la **Tabla 23**.

Pluronic **I** en presencia de los liposomas, parece disminuir la temperatura de gelificación respecto al gel blanco (GLB2 vs. GB2: 20% P-127, $\Delta T^a = -2^\circ\text{C}$). Sin embargo, la interacción que se produce entre los liposomas y mezcla de polímeros **I** y **II** conduce a un incremento de la temperatura de gelificación del GLB1 respecto al GB1 (GLB1 vs GB1: 20% **I** y 10% **II**, $\Delta T^a = +4^\circ\text{C}$).

Las **Figuras 27-29** resumen los resultados obtenidos en el estudio de viscosidad de los geles GLB. Para el polímero **I**, la tendencia observada es similar a la del estudio de temperatura de gelificación: en presencia de los liposomas, el incremento de la viscosidad del gel se produce más rápidamente. De hecho, la gelificación es tan repentina que por debajo de los 23°C el gel se comporta como una solución y su viscosidad no es medible en las condiciones de este ensayo. Una vez se alcanza una temperatura de 23°C , se produce la gelificación completa del GLB2. Mientras tanto, la viscosidad del GLB1 se incrementa a temperaturas ligeramente más bajas con respecto al GB1. Por ello, la presencia de los liposomas parece alterar ligeramente el comportamiento del gel tipo G1: el incremento de viscosidad se produce ligeramente más rápido y la gelificación completa tiene lugar a una temperatura más elevada.

En base a los resultados obtenidos en los experimentos, la composición del gel G1 fue elegida como la más apropiada para cumplir con la finalidad de este estudio. Se trata de una formulación con unas características fisicoquímicas y reológicas adecuadas para conseguir una gelificación rápida a nivel de la cavidad nasal. Además, el gel con esta composición no se ve afectado de manera importante por la presencia de fármaco libre ni por la presencia de los liposomas. Finalmente, es un gel bastante fluido a 10°C (almacenamiento en nevera), lo que convierte esta formulación en un candidato de interés para ser administrado en forma de gotas por la vía intranasal.

Tabla 23: Temperatura de gelificación de Geles Liposomales Blancos determinada por el método de Miller-Donovan

Gel	GLB1	GLB2
$T_g \pm SD, ^\circ C$	$27,3 \pm 0,58$	$24,7 \pm 0,58$

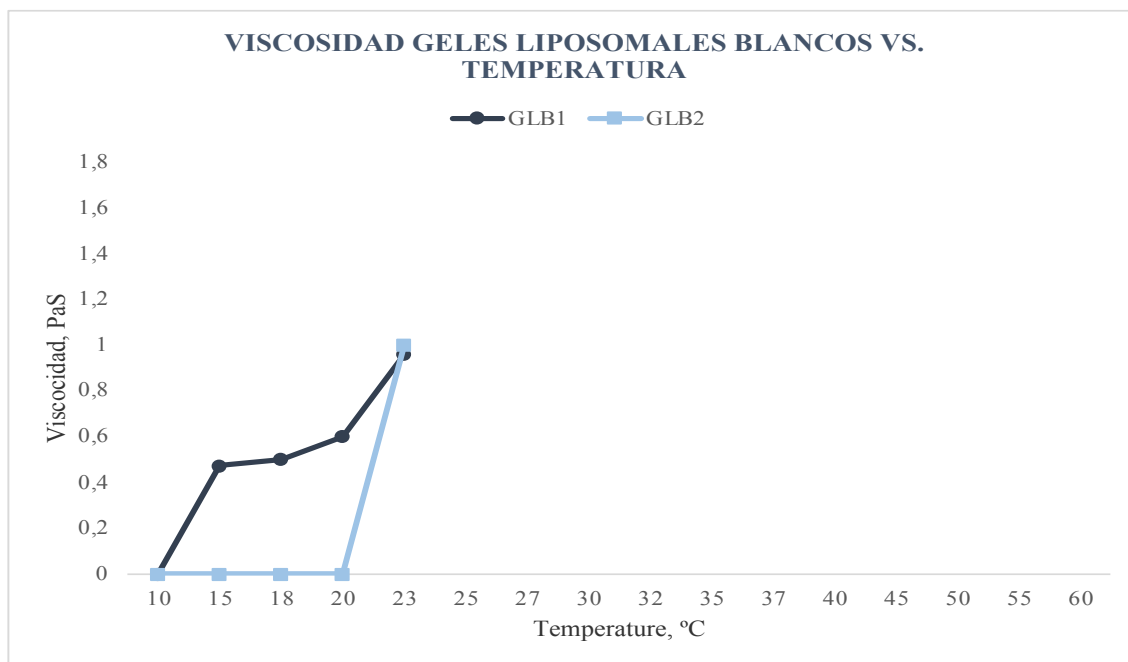


Figura 27: Geles liposomales blancos. Viscosidad en función de temperatura

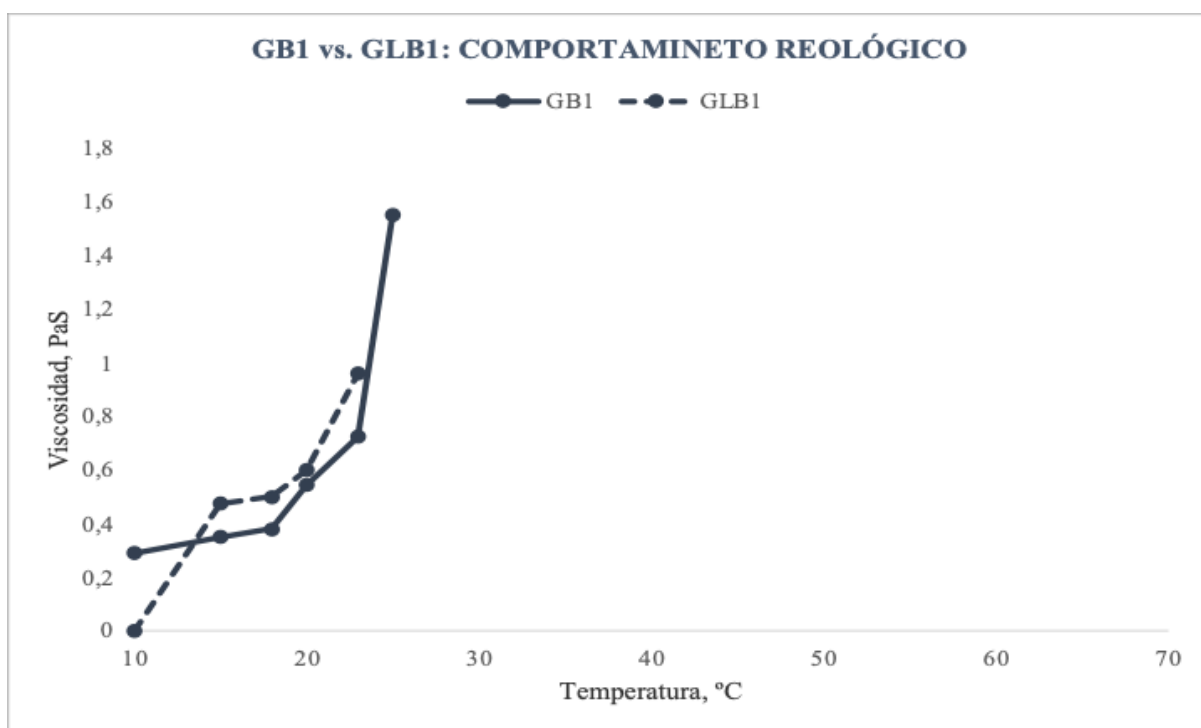


Figura 28: Geles GB1 vs. GLB1: influencia de los liposomas en el comportamiento reológico del gel tipo G1

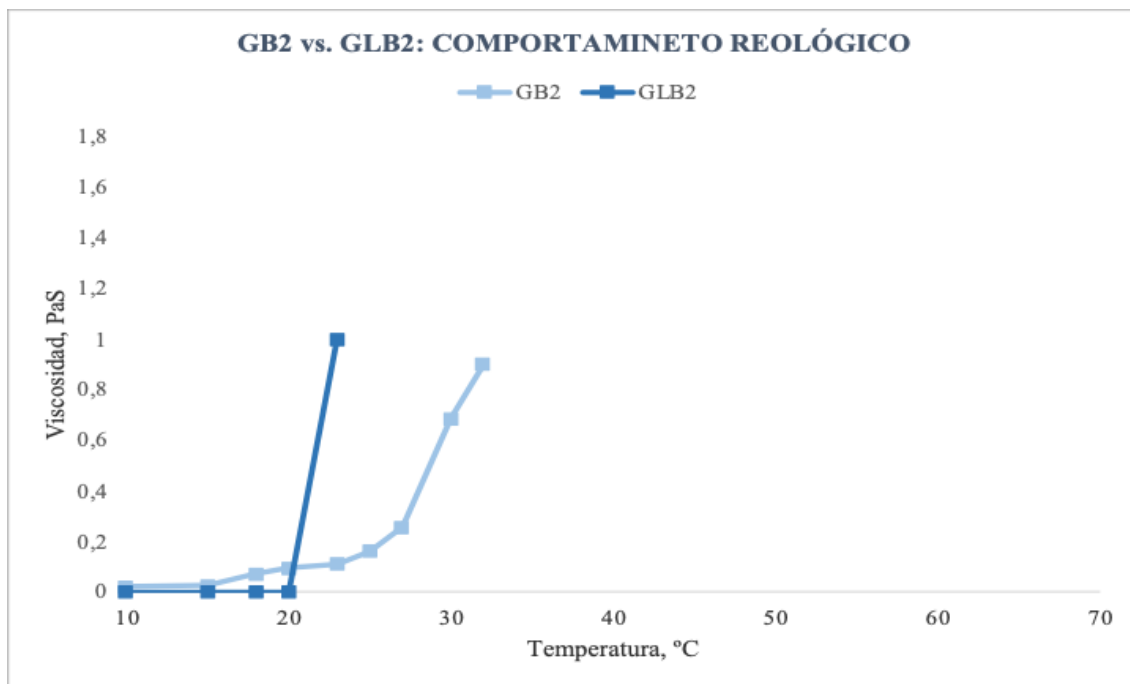


Figura 29: Geles GB2 vs. GLB2: influencia de los liposomas en el comportamiento reológico del gel tipo G2

4.3. LIPOSOMAS

4.3.1. Caracterización: Tamaño de la Partícula, Potencial Zeta, Índice de Polidispersidad, Contenido en Fosfolípidos y Eficacia de Encapsulación

El **tamaño de los liposomas** es un criterio de gran importancia para conseguir que el fármaco llegue a su lugar de acción. Como ya se ha mencionado en el apartado “Introducción”, es necesario conocer las características de la vía de administración para elegir el tamaño de liposoma deseado. Los liposomas obtenidos para este estudio presentaron un tamaño de **381,03±10,38 nm**. Además, los liposomas obtenidos parecen presentar una flexibilidad importante ya que mantuvieron su tamaño a pesar de ser filtrados (filtros 0,45 µm y 0,22 µm) y extruidos (0,200 µm). *Este tamaño de liposoma resulta satisfactorio para la administración del fármaco por la vía Nariz-Cerebro ya que coincide con los tamaños de los liposomas utilizados en los estudios de otros grupos de investigación* (ver apartado 1.2.1).

El valor del **PDI** como medida de la variabilidad de tamaños en las poblaciones de partículas fue **0,204±0,12**. Este valor se encuentra por debajo del 0,3, valor indicativo de una población homogénea de vesículas lipídicas (Chen, Han et al. 2010, Danaei, Dehghankhold et al. 2018).

El **potencial Zeta** obtenido fue de **2,62±4,42 mV**, indicando que la dispersión liposomal presenta una tendencia a floculación rápida. El flóculo formado se redispersa con facilidad mediante una agitación suave, los liposomas redispersados mantienen sus características. De hecho, las suspensiones y dispersiones que floculan o sedimentan rápidamente y se redispersan con facilidad, son usadas muy ampliamente en la industria farmacéutica (por ejemplo: los antibióticos pediátricos para la administración oral).

La **eficacia de encapsulación** obtenida en este estudio fue de **53,85%**. En el caso de Nor-BNI, se trata de un fármaco con ligero carácter lipófilo. Por lo cual, la eficacia de encapsulación obtenida está de acuerdo con la esperada (40-50%).

Finalmente, el **contenido en fosfolípidos** fue de **87,63±7,46%**.

Los liposomas obtenidos poseen las características adecuadas para ser utilizadas por la vía de administración deseada.

4.3.2. Estudio de liberación de Nor-BNI

El ensayo de liberación de Nor-BNI se llevó a cabo en dos tipos de formulaciones: dispersión de liposomas cargados de Nor-BNI (D-Nor-BNI) y gel con liposomas cargados de Nor-BNI (G-Nor-BNI) (**Figura 30**). En este caso, la formulación D-Nor-BNI se utilizó como control para valorar las limitaciones que supone la matriz del gel en el proceso de liberación del principio activo.

Ambas formulaciones mostraron una liberación controlada del Nor-BNI, siendo esta más rápida en las fases iniciales del proceso gracias a la existencia de un gradiente de concentraciones entre los medios receptor y dador. En el caso de la formulación G-Nor-BNI, podemos observar que en las primeras etapas del ensayo (0-0,75 h) no se produce la liberación del fármaco. Sin embargo, a partir de la primera hora (1 h) la liberación del Nor-BNI desde el gel es mayor que desde la dispersión de los liposomas. Es posible que este hecho se deba a la acumulación del principio activo en la matriz del gel durante las horas 0-0,75 seguida de su liberación masiva a partir de la hora 1. Esta liberación desde el gel que se produce a partir de la primera hora del ensayo puede estar relacionada con el deterioro del gel debido al contacto constante con el medio acuoso del ensayo. El porcentaje de fármaco liberado a largo plazo también es superior en el caso del G-Nor-BNI que en D-Nor-BNI y, de igual manera, puede ser debido a los fenómenos descritos anteriormente. El porcentaje de dosis liberado fue de un 16,45% en D-Nor-BNI y de un 21,75% en G-Nor-BNI.

Para entender mejor los perfiles de liberación, se realizó el ajuste de diversos modelos cinéticos a los datos experimentales: Korsmeyer-Peppas, Kim y Peppas-Sahlin. El parámetro AIC se utilizó para determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos. Los parámetros de ajuste para cada modelo y los valores de AIC obtenidos se encuentran representados en las **Tablas 24 y 25**. Los valores más bajos de AIC, identificativos del mejor ajuste matemático, correspondieron a la ecuación de Korsmeyer-Peppas para ambas formulaciones. Por otra parte, tanto para D-Nor-BNI como para G-Nor-BNI, los valores de n fueron inferiores al 0,5, mostrando que la liberación del

fármaco desde ambas formulaciones se produjo mayoritariamente por el proceso de difusión pasiva.

La forma farmacéutica obtenida en este trabajo da lugar a una liberación del fármaco controlada. Es una característica de interés dado que puede simplificar la pauta de administración del tratamiento, favoreciendo de esta forma la adherencia en los pacientes. Sin embargo, se puede valorar la realización de modificaciones en la composición de la formulación con el fin de conseguir mayor liberación del fármaco a largo plazo.

Tabla 24: Dispersión de liposomas cargados con Nor-BNI. Parámetros cinéticos y AIC para cada modelo matemático

D-Nor-BNI				
Formulación	L1	L2	L3	L4
Korsmeyer-Peppas				
n	0,2085	0,1916	0,1889	0,1612
k	7,7930	8,5849	8,0530	8,8810
AIC	61,2573	61,33818	58,6993	67,9574
Kim				
n	0,2117	0,1941	0,1915	0,1629
k	7,5982	8,4078	7,8765	8,7299
AIC	61,3939	65,5613	58,8098	63,7569
Peppas-Sahlin				
n	0,2085	0,1917	0,1889	0,1612
k ₁	3,8966	4,2924	4,0265	4,4405
k ₂	3,8966	4,2924	4,0265	4,4405
AIC	63,2573	67,43376	64,6064	65,6936

Tabla 25: Gel con liposomas cargados de Nor-BNI. Parámetros cinéticos y AIC para cada modelo matemático

G-Nor-BNI				
Formulación	L1	L2	L3	L4
Korsmeyer-Peppas				
n	0,2540	0,2672	0,2678	0,2641
k	8,0062	7,9365	7,9270	7,9701
AIC	83,2923	82,4701	82,4196	82,6921
Kim				
n	0,2575	0,2710	0,2718	0,2679
k	7,7929	7,7128	7,7015	7,7478
AIC	83,4333	82,6317	82,5746	82,8430
Peppas-Sahlin				
n	0,2540	0,2672	0,2678	0,2641
k ₁	4,003	3,9682	3,9635	3,9851
k ₂	4,003	3,9682	3,9635	3,9851
AIC	85,2923	84,4701	84,4196	84,6920

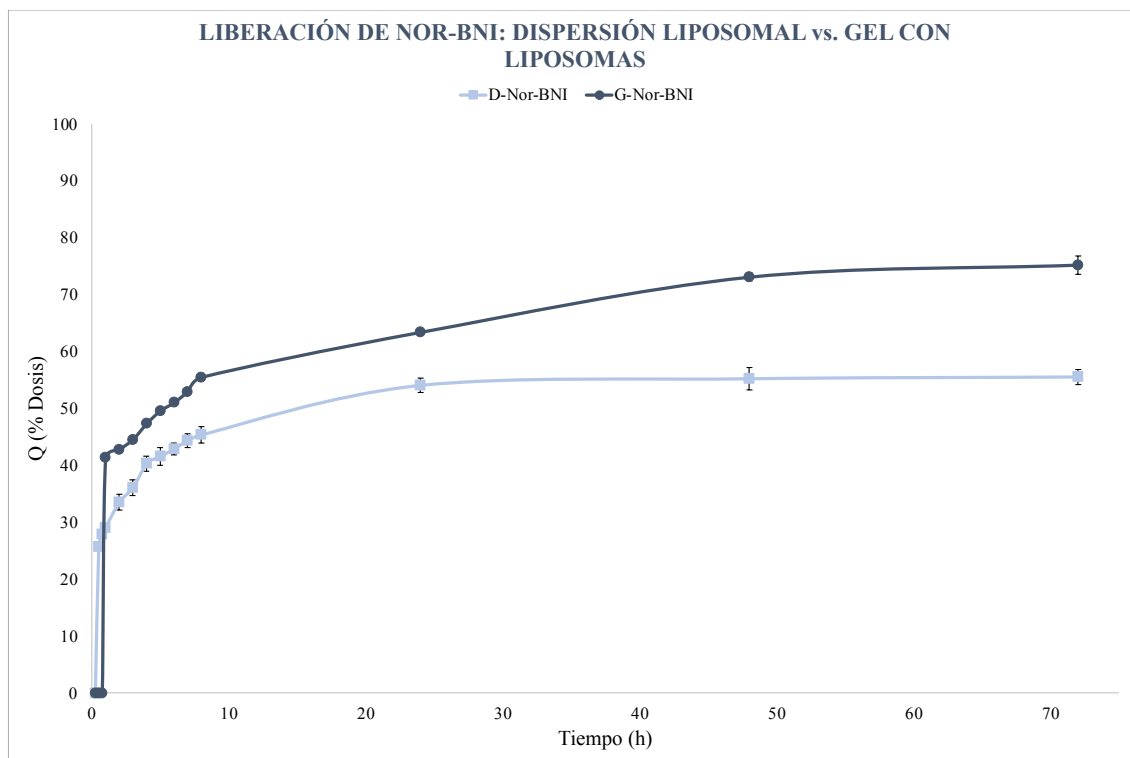


Figura 30: Perfiles de liberación de Nor-BNI desde dispersión de liposomas vs. gel con liposomas

4.4. ENSAYOS NEUROQUÍMICOS

4.4.1. Estudio de microdiálisis

A) Validación del posicionamiento de las sondas

La validación del posicionamiento de las sondas en el NAc se llevó al cabo mediante análisis histológico. La posición de la región activa de la membrana de la sonda de microdiálisis está representada esquemáticamente para todos los animales incluidos en el estudio en la **Figura 31**. Las comparaciones estadísticas se realizaron tan sólo con los datos de los animales que presentaron el posicionamiento correcto de las sondas.



Figura 31: Representación esquemática de las sondas de microdiálisis con membranas activas en NAc de las ratas. Grupos experimentales: ratas Blanco (gris), ratas Nor-BNI (azul marino). La distancia desde bregma está indicada con números. Adaptado al atlas Paxinos and Watson (2007).

B) Niveles basales de DA (baseline)

Los niveles basales de DA (media $\pm$ SEM), calculados con el empleo de la recta de calibrado interdía fueron $101,50 \pm 3,03$ nM y $101,19 \pm 1,92$ nM para los animales tratados con Nor-BNI y con Blanco, respectivamente. La prueba T-Student para muestras independientes indicó que el tratamiento aplicado no tiene efecto significativo en los niveles basales de la DA extracelular (n=67; t-test, p=0,933).

C) Efecto de la administración intranasal de la formulación con Nor-BNI en los niveles extracelulares de DA en NAc

Como ya se explicó en el aparato de los materiales y métodos, para la evaluación del efecto del Nor-BNI en los niveles de DA en NAc, se llevó a cabo una inyección subcutánea del U-50488. Tal y como se muestra en la **Figura 32**, la administración del U-50488 produce un descenso en la liberación de la DA en NAc (Maisonneuve, Archer et al. 1994) en los animales tratados con el Gel Blanco en el intervalo de tiempo desde 20 al 160 min del experimento. Este descenso es significativo con respecto a los valores basales en los tiempos 20, 60 y 100 min (Dunnet-test).

Tal y como se esperaba, el efecto de U-50488 fue anulado en las ratas tratadas con Nor-BNI. Incluso se observó un incremento no significativo en los niveles de DA con respecto a los valores basales (Dunnet-test).

En primer lugar, la prueba de Levene se aplicó a los datos experimentales para la comprobación de la igualdad de las varianzas ($p > 0,05$), luego, se realizaron el ANOVA para medidas repetidas y las pruebas analíticas subsecuentes. El ANOVA de dos vías para medidas repetidas detectó diferencias entre los grupos Blanco y Nor-BNI (efecto grupo inter-sujeto: $F(1;21)=22,973$, $p=0,001$, $\eta_p^2=0,522$ e interacción tiempo x grupo intra-sujeto: $F(10;210)=2,576$, $p=0,006$, $\eta_p^2=0,109$). Sin embargo, no se detectó un efecto significativo del tiempo (efecto tiempo inter-sujeto: $F(10; 210)=1,201$, $p=0,292$, $\eta_p^2=0,054$). Por otro lado, la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples entre grupos detectó la existencia de diferencias significativas en la liberación de DA en NAc entre los animales tratados con Nor-BNI y con Blanco a los tiempos 20, 40, 60, 80 y 160 minutos (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, Bonferroni para comparaciones múltiples entre grupos, $p_{20}=0,029$, $p_{40}=0,005$, $p_{60}=0,018$, $p_{80}=0,008$, $p_{160}=0,012$).

Tras observar los resultados obtenidos en la prueba de microdiálisis, podemos concluir que Nor-BNI administrado por la vía intranasal llega a su diana (las neuronas DA del NAc), ejerciendo en ellos la acción esperada: bloqueo de los recetores KOR que se traduce en el impedimento de la unión del agonista KOR U-50488 a ellos. Como resultado, observamos una ausencia en el descenso de niveles de DA extracelular en los animales tratados con Nor-BNI. Este descenso, sin embargo, sí que se observa en el grupo control (Blanco). La diferencia en la liberación de DA post-inyección del U-50488 que

se manifiesta entre los grupos tratados con Nor-BNI y Blanco es debida al tratamiento, ya que los niveles basales de DA no presentan diferencias significativas entre los dos grupos. Sin embargo, para poder concluir qué vía de acceso a su diana utilizó Nor-BNI administrado por la vía intranasal, hacen falta estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos adicionales.

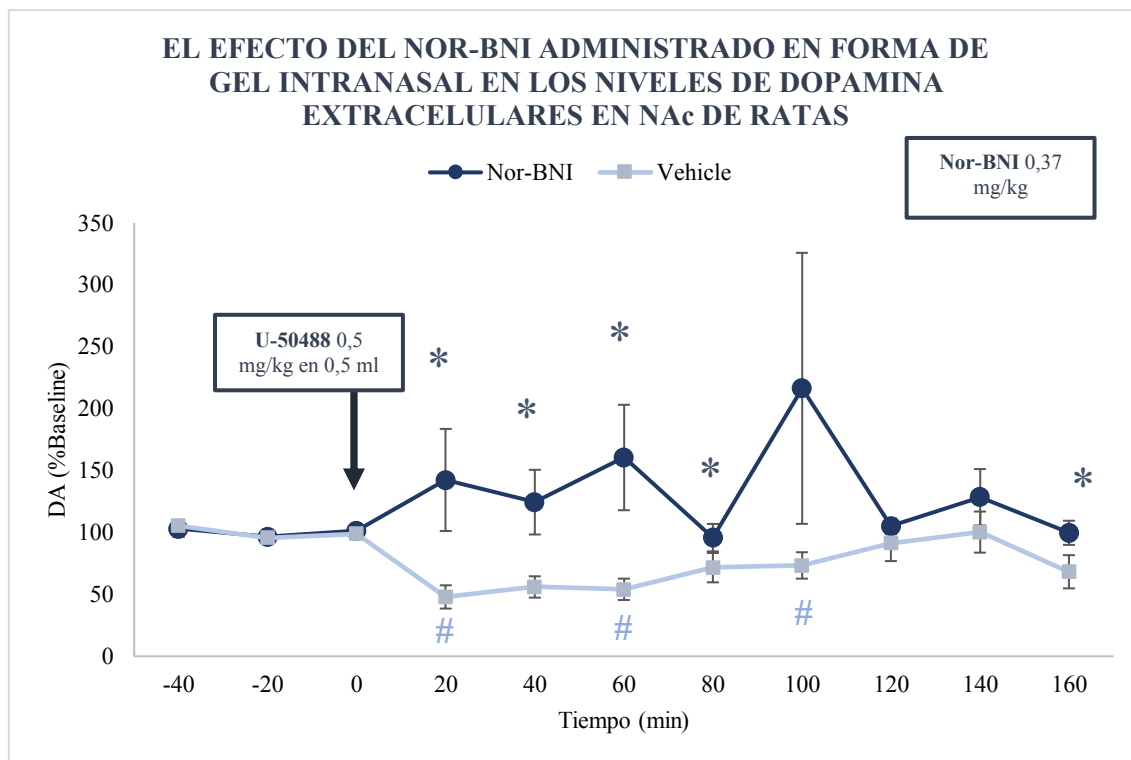


Figura 32: El efecto del Nor-BNI administrado en forma de gel intranasal en los niveles de dopamine extracelulares en NAc de ratas. Los datos experimentales (media $\pm$ SEM) están representados como porcentaje de los niveles basales en **puntos azul marino (●)** para el grupo tratado con Nor-BNI y **cuadrados grises (■)** para el grupo Blanco; $n_{\text{Nor-BNI}}=12$ $n_{\text{Vehicle}}=11$. $*=p<0.05$, diferencias significativas entre grupos en los tiempos señalados (prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples); $\#=p<0.05$, diferencias significativas con respecto al nivel basal en los puntos indicados para el grupo Blanco (Dunnet test).

4.4.2. Determinación de Nor-BNI en tejido cerebral

Para evaluar los niveles de Nor-BNI en las muestras cerebrales, se estudiaron y se compararon los picos cromatográficos obtenidos en el análisis de diferentes áreas cerebrales (cerebelo, cortex, corteza prefrontal y mesencéfalo) para los grupos Blanco y Nor-BNI (**Figura 33**). En las muestras procedentes del cerebelo no se observaron picos medibles. Por otra parte, los datos obtenidos a partir de las muestras de cortex, corteza prefrontal y mesencéfalo se compararon con la ayuda de la prueba T-Student para muestras independientes para realizar las comparaciones entre los dos tratamientos

(Figura 34). La prueba de Levene detectó la ausencia de igualdad de varianzas ($p=0,002$), por lo cual, se utilizó la prueba de T-Student para muestras independientes para el análisis de los datos. No se observaron diferencias significativas entre los grupos Nor-BNI y Blanco en los niveles de Nor-BNI en cortex y corteza prefrontal. Por otra parte, en el mesencéfalo, los niveles del analito detectados en los animales tratados con Nor-BNI fueron significativamente superiores a los niveles detectados en los animales del grupo Blanco ($p=0,043$, Student T test).

En base a estos resultados, podemos decir que Nor-BNI solo fue detectado a nivel del mesencéfalo. A nivel de otras áreas cerebrales no fue posible observar la presencia del fármaco en cantidades suficientes para ser medidas por el método analítico utilizado. Con esto podemos afirmar que *se produjo la distribución del fármaco a nivel cerebral*. Para conocer mejor el proceso de distribución de Nor-BNI administrado por la vía intranasal tanto a nivel cerebral, como a nivel de otros tejidos, son necesarios estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos adicionales.

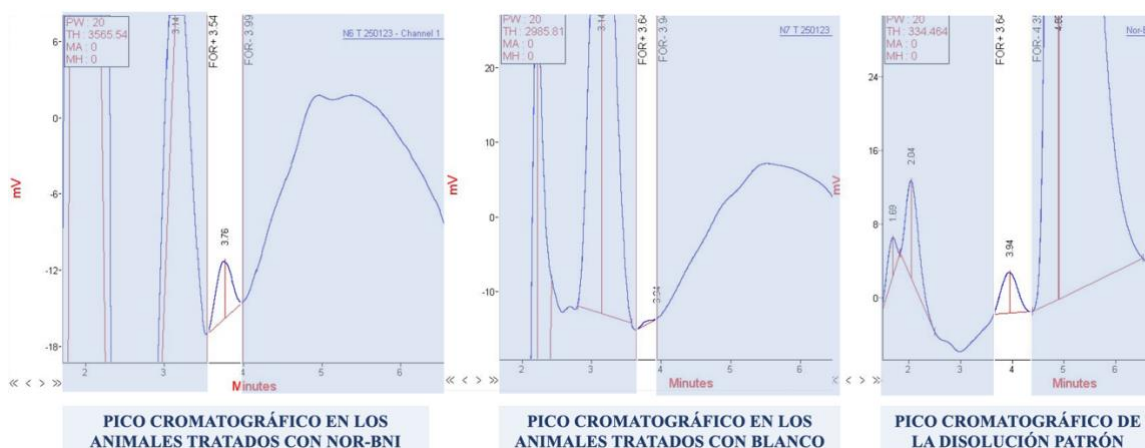


Figura 33: Ejemplos de Picos cromatográficos del Nor-BNI obtenidos en el mesencéfalo de los animales del grupo Nor-BNI, grupo Blanco y pico cromatográfico de la solución patrón

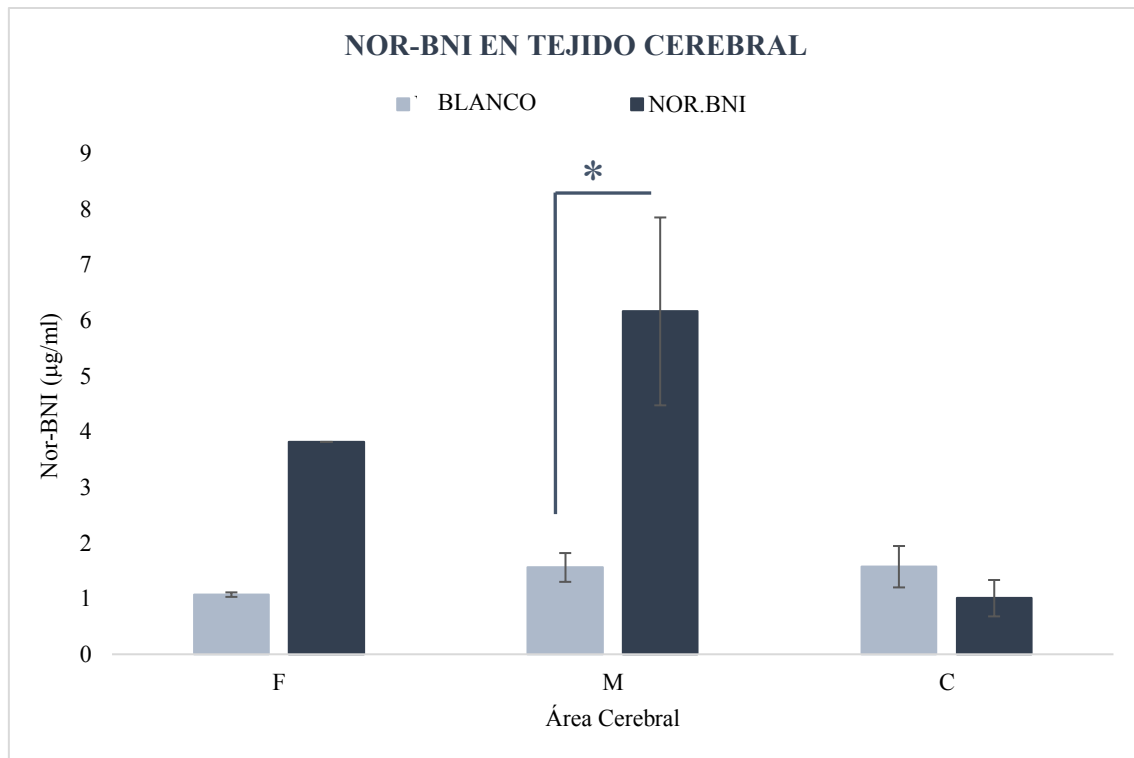


Figura 34: Nor-BNI en tejido cerebral. La figura representa los niveles (media $\pm$ SEM) de Nor-BNI ($\mu\text{g/ml}$) en tres áreas cerebrales: “F”= corteza prefrontal, “M” = mesencéfalo, “C” = corteza. Los datos del grupo tratado con Nor-BNI está representado en azul oscuro, mientras que los del grupo Blanco – en gris. *= $p < 0.05$, diferencias significativas entre los niveles de Nor-BNI de los grupos Blanco y Nor-BNI, detectadas mediante la prueba de T-student

5. CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos en este trabajo, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- **Conclusión 1:** La dopamina y el Nor-BNI se pueden cuantificar de forma válida mediante el HPLC-ECD.
- **Conclusión 2:** El Nor-BNI se puede incorporar en los liposomas de la formulación planteada. Además, los liposomas presentan propiedades óptimas para la administración del fármaco por la vía Nariz-Cerebro.
- **Conclusión 3:** La formulación presenta una viscosidad adecuada para su cómoda administración y almacenamiento en la nevera (10°C), y gelifica rápidamente en respuesta a la elevación de temperatura en la cavidad nasal. Sus propiedades físicoquímicas y reológicas se mantienen en presencia del principio activo y de los liposomas.
- **Conclusión 4:** La forma farmacéutica elaborada presenta una liberación del fármaco controlada en el tiempo.
- **Conclusión 5:** Se observa efecto a nivel central tras la administración de la fórmula con Nor-BNI por la vía intranasal. El procesamiento de los resultados del estudio de microdiálisis confirma el bloqueo de KOR en el NAc por la ausencia del descenso en los niveles extracelulares de dopamina en el área de estudio tras la administración del agonista KOR. La presencia de Nor-BNI a nivel del mesencéfalo reafirma la distribución del fármaco a nivel central.

6. BIBLIOGRAFÍA

ABD, E., ROBERTS, M.S. and GRICE, J.E., 2016. A Comparison of the Penetration and Permeation of Caffeine into and through Human Epidermis after Application in Various Vesicle Formulations. *Skin pharmacology and physiology*, **29**(1), pp. 24-30.

ABOUHUSSEIN, D.M.N., KHATTAB, A., BAYOUMI, N.A., MAHMOUD, A.F. and SAKR, T.M., 2018. Brain targeted rivastigmine mucoadhesive thermosensitive In situ gel: Optimization, in vitro evaluation, radiolabeling, in vivo pharmacokinetics and biodistribution. *Journal of drug delivery science and technology*, **43**, pp. 129-140.

ADAMALA, K., ENGELHART, A.E., KAMAT, N.P., JIN, L. and SZOSTAK, J.W., 2015. Construction of a liposome dialyzer for the preparation of high-value, small-volume liposome formulations. *Nature protocols*, **10**(6), pp. 927-938.

ADERIBIGBE, B.A., 2018. In Situ-Based Gels for Nose to Brain Delivery for the Treatment of Neurological Diseases. *Pharmaceutics*, **10**(2), pp. 40.

AGNELLO, S., GASPERINI, L., MANO, J.F., PITARRESI, G., PALUMBO, F.S., REIS, R.L. and GIAMMONA, G., 2017. Synthesis, mechanical and thermal rheological properties of new gellan gum derivatives. *International journal of biological macromolecules*, **98**, pp. 646-653.

AGRAWAL, A.K., DAS, M. and JAIN, S., 2012. In situ gel systems as 'smart' carriers for sustained ocular drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, **9**(4), pp. 383-402.

AGRAWAL, M., SARAF, S., SARAF, S., ANTIMISIARIS, S.G., HAMANO, N., LI, S., CHOUGULE, M., SHOYELE, S.A., GUPTA, U., AJAZUDDIN and ALEXANDER, A., 2018. Recent advancements in the field of nanotechnology for the delivery of anti-Alzheimer drug in the brain region. *Expert opinion on drug delivery*, **15**(6), pp. 589-617.

AHAD, A., AL-SALEH, A.A., AL-MOHIZEA, A.M., AL-JENOABI, F.I., RAISH, M., YASSIN, A.E.B. and ALAM, M.A., 2017. Formulation and characterization of novel soft nanovesicles for enhanced transdermal delivery of eprosartan mesylate. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **25**(7), pp. 1040-1046.

AHMAD, A. and AHSAN, H., 2020. Lipid-based formulations in cosmeceuticals and biopharmaceuticals. *Biomedical dermatology*, **4**(1), pp. 1.

AKAIKE, H., Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. *Breakthroughs in Statistics*. New York, NY: Springer New York, pp. 610-624.

AKASH, M.S.H. and REHMAN, K., 2015. Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. *Journal of controlled release*, **209**, pp. 120-138.

AKBARZADEH, A., REZAEI-SADABADY, R., DAVARAN, S., JOO, S.W., ZARGHAMI, N., HANIFEHPOUR, Y., SAMIEL, M., KOUHI, M. and NEJATI-KOSHKI, K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, **8**(1), pp. 102.

ALEXANDRIDIS, P. and ALAN HATTON, T., 1995. *Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous*

solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. Amsterdam: Elsevier B.V.

ALEXANDRIDIS, P., HOLZWARTH, J.F. and HATTON, T.A., 1994. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules*, **27**(9), pp. 2414-2425.

ALI, M.H., KIRBY, D.J., MOHAMMED, A.R. and PERRIE, Y., 2010. Solubilisation of drugs within liposomal bilayers: alternatives to cholesterol as a membrane stabilising agent. *Journal of pharmacy and pharmacology*, **62**(11), pp. 1646-1655.

ALLEN, T.M., 1994. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Advanced drug delivery reviews*, **13**(3), pp. 285-309.

ALLEN, T.M. and CULLIS, P.R., 2013. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews*, **65**(1), pp. 36-48.

ALMEIDA, H., AMARAL, M.H., LOBÃO, P. and LOBO, J.M.S., 2012. Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): Main Features and their Applications in Topical and Transdermal Administration of Drugs. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*, **15**(4), pp. 592-605.

ANDERSON, R.I. and BECKER, H.C., 2017. Role of the Dynorphin/Kappa Opioid Receptor System in the Motivational Effects of Ethanol. *Alcoholism, clinical and experimental research*, **41**(8), pp. 1402-1418.

ANDERSON, R.I., LOPEZ, M.F. and BECKER, H.C., 2016. Stress-Induced Enhancement of Ethanol Intake in C57BL/6J Mice with a History of Chronic Ethanol Exposure: Involvement of Kappa Opioid Receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **10**, pp. 45.

ARSALAN, A., AHMAD, I., ALI, S.A., QADEER, K., MAHMUD, S., HUMAYUN, F. and BEG, A.E., 2020. The kinetics of photostabilization of cyanocobalamin in liposomal preparations. *International journal of chemical kinetics*, **52**(3), pp. 207-217.

AXEL, R., 2005. Scents and Sensibility: A Molecular Logic of Olfactory Perception (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International ed.)*, **44**(38), pp. 6110-6127.

BALS-KUBIK, R., ABLEITNER, A., HERZ, A. and SHIPPENBERG, T.S., 1993. Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **264**(1), pp. 489-495.

BANGHAM, A.D., 1993. Liposomes: the Babraham connection. *Chemistry and physics of lipids*, **64**(1), pp. 275-285.

BANSAL, M., MITTAL, N., YADAV, S.K., KHAN, G., GUPTA, P., MISHRA, B. and NATH, G., 2018. Periodontal thermoresponsive, mucoadhesive dual antimicrobial loaded in-situ gel for the treatment of periodontal disease: Preparation, in-vitro characterization

and antimicrobial study. *Journal of oral biology and craniofacial research (Amsterdam)*, **8**(2), pp. 126-133.

BARISELLI, S., GLANGETAS, C., TZANOULINO, S. and BELLONE, C., 2016. Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *J Neurochem*, **139**(6), pp. 1071-1080.

BATRAKOVA, E.V. and KABANOV, A.V., 2008a. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of controlled release*, **130**(2), pp. 98-106.

BATRAKOVA, E.V. and KABANOV, A.V., 2008b. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of controlled release*, **130**(2), pp. 98-106.

BATTAGLIA, L., PANCIANI, P.P., MUNTONI, E., CAPUCCHIO, M.T., BIASIBETTI, E., DE BONIS, P., MIOLETTI, S., FONTANELLA, M. and SWAMINATHAN, S., 2018. Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. *Expert opinion on drug delivery*, **15**(4), pp. 369-378.

BEDROV, D., AYYAGARI, C. and SMITH, G.D., 2006. Multiscale Modeling of Poly(ethylene oxide)–Poly(propylene oxide)–Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer Micelles in Aqueous Solution. *Journal of chemical theory and computation*, **2**(3), pp. 598-606.

BEHL, C.R., PIMPLASKAR, H.K., SILENO, A.P., DEMEIRELES, J. and ROMEO, V.D., 1998. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, **29**(1), pp. 89-116.

BERGER, A.L., WILLIAMS, A.M., MCGINNIS, M.M. and WALKER, B.M., 2013. Affective Cue-Induced Escalation of Alcohol Self-Administration and Increased 22-kHz Ultrasonic Vocalizations during Alcohol Withdrawal: Role of Kappa-Opioid Receptors. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **38**(4), pp. 647-654.

BERGER, N., SACHSE, A., BENDER, J., SCHUBERT, R. and BRANDL, M., 2001. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International journal of pharmaceutics*, **223**(1), pp. 55-68.

BERGSTROM, R.F., KAY, R.D. and WAGNER, J.G., 1981. The pharmacokinetics of penicillamine in a female mongrel dog. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, **9**(5), pp. 603-621.

BERMAN, Y., MZHAVIA, N., POLONSKAIA, A., FURUTA, M., STEINER, D.F., PINTAR, J.E. and DEVI, L.A., 2000. Defective Prodynorphin Processing in Mice Lacking Prohormone Convertase PC2. *Journal of neurochemistry*, **75**(4), pp. 1763-1770.

BÉRUBÉ, P., LAFOREST, S., BHATNAGAR, S. and DROLET, G., 2013. Enkephalin and dynorphin mRNA expression are associated with resilience or vulnerability to chronic social defeat stress. *Physiology & behavior*, **122**, pp. 237-245.

BHUPENDRA PRADHAN, NARENDRA KUMAR, SUMAN SAHA and AMIT ROY, 2015. Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application. *Journal of applied pharmaceutical research*, **3**(3), pp. 1.

Bioanalytical method validation | European Medicines Agency 2023-last update. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation> [11/01/, 2022].

BJÖRKLUND, A. and DUNNETT, S.B., 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in neurosciences (Regular ed.)*, **30**(5), pp. 194-202.

BOJSEN-MØLLER, F., 1975. Demonstration of terminalis, olfactory, trigeminal and perivascular nerves in the rat nasal septum. *Journal of comparative neurology (1911)*, **159**(2), pp. 245-256.

BONACUCINA, G., SPINA, M., MISICI-FALZI, M., CESPI, M., PUCCIARELLI, S., ANGELETTI, M. and PALMIERI, G.F., 2007. Effect of hydroxypropyl β -cyclodextrin on the self-assembling and thermogelation properties of Poloxamer 407. *European journal of pharmaceutical sciences*, **32**(2), pp. 115-122.

BORRELL, J.H., PONS, M., JUAREZ, J.C. and ESTELRICH, J., 1990. The action of Triton X-100 and sodium dodecyl sulphate on lipid layers. Effect on monolayers and liposomes. *Journal of microencapsulation*, **7**(2), pp. 255-259.

BOUDARINE, M., YEGOROV, O., STERLING-DUBROVSKY, A., DEVI, L.A. and BERMAN, Y., 2002. Developmental changes in opioid peptides and their receptors in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice lacking peptide processing enzyme carboxypeptidase E. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **303**(3), pp. 1317-1324.

BOYUKLIEVA, R. and PILICHEVA, B., 2022a. Micro- and Nanosized Carriers for Nose-to-Brain Drug Delivery in Neurodegenerative Disorders. *Biomedicines*, **10**(7), pp. 1706.

BOYUKLIEVA, R. and PILICHEVA, B., 2022b. Micro- and Nanosized Carriers for Nose-to-Brain Drug Delivery in Neurodegenerative Disorders. *Biomedicines*, **10**(7), pp. 1706.

BRISCHOUX, F., CHAKRABORTY, S., BRIERLEY, D.I. and UNGLESS, M.A., 2009. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, **106**(12), pp. 4894-4899.

BRITT, J.P. and BONCI, A., 2013. Optogenetic interrogations of the neural circuits underlying addiction. *Current opinion in neurobiology*, **23**(4), pp. 539-545.

BRUCHAS, M., SCHINDLER, A., SHANKAR, H., MESSINGER, D., MIYATAKE, M., LAND, B., LEMOS, J., HAGAN, C.E., NEUMAIER, J., QUINTANA, A., PALMITER, R. and CHAVKIN, C., 2011. Selective p38 α MAPK Deletion in Serotonergic Neurons Produces Stress Resilience in Models of Depression and Addiction. *Neuron*, **71**(3), pp. 498-511.

BRUCHAS, M.R., LAND, B.B., LEMOS, J.C. and CHAVKIN, C., 2009. CRF1-R Activation of the Dynorphin/Kappa Opioid System in the Mouse Basolateral Amygdala Mediates Anxiety-Like Behavior. *PLoS ONE*, **4**(12), pp. e8528.

CAMILO, C.J.J., LEITE, D.O.D., SILVA, A.R.A., MENEZES, I.R.A., COUTINHO, H.D.M. and COSTA, J.G.M., 2020. Lipid vesicles: applications, principal components and methods used in their formulations: A review. *Acta biológica colombiana*, **25**(2), pp. 339-352.

CANO-CEBRIÁN, M.J., ZORNOZA, T., POLACHE, A. and GRANERO, L., 2005. Quantitative In Vivo Microdialysis in Pharmacokinetic Studies: Some Reminders. *Current drug metabolism*, **6**(2), pp. 83-90.

CARLEZON JR, W.A. and KRYSTAL, A.D., 2016. Kappa-Opioid Antagonists for Psychiatric Disorders: From Bench to Clinical Trials. *Depression and anxiety*, **33**(10), pp. 895-906.

CARLEZON, J., William A, BÉGUIN, C., DINIERI, J.A., BAUMANN, M.H., RICHARDS, M.R., TODTENKOPF, M.S., ROTHMAN, R.B., MA, Z., LEE, D.Y. and COHEN, B.M., 2006. Depressive-Like Effects of the κ -Opioid Receptor Agonist Salvinorin A on Behavior and Neurochemistry in Rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **316**(1), pp. 440-447.

CARR, D.B. and SESACK, S.R., 2000. GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse (New York, N.Y.)*, **38**(2), pp. 114-123.

CARR, G.V. and LUCKI, I., 2010. Comparison of the kappa-opioid receptor antagonist DIPPA in tests of anxiety-like behavior between Wistar Kyoto and Sprague Dawley rats. *Psychopharmacology*, **210**(2), pp. 295-302.

CASHMAN, J.R. and AZAR, M.R., 2014. Potent Inhibition of Alcohol Self-Administration in Alcohol-Preferring Rats by a κ -Opioid Receptor Antagonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **350**(1), pp. 171-180.

CASTILLO AGUILAR, B. and GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, R., 1996. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista cubana de farmacia*, **30**(1),.

CASTOLDI, A., HERR, C., NIEDERSTRASSER, J., LABOUTA, H.I., MELERO, A., GORDON, S., SCHNEIDER-DAUM, N., BALS, R. and LEHR, C., 2017a. Calcifediol-loaded liposomes for local treatment of pulmonary bacterial infections. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, **118**, pp. 62-67.

CASTOLDI, A., HERR, C., NIEDERSTRASSER, J., LABOUTA, H.I., MELERO, A., GORDON, S., SCHNEIDER-DAUM, N., BALS, R. and LEHR, C., 2017b. Calcifediol-loaded liposomes for local treatment of pulmonary bacterial infections. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, **118**, pp. 62-67.

CHACKO, I.A., GHATE, V.M., DSOUZA, L. and LEWIS, S.A., 2020. Lipid vesicles: A versatile drug delivery platform for dermal and transdermal applications. *Colloids and surfaces, B, Biointerfaces*, **195**, pp. 111262.

- CHAMANZA, R. and WRIGHT, J.A., 2015. A Review of the Comparative Anatomy, Histology, Physiology and Pathology of the Nasal Cavity of Rats, Mice, Dogs and Non-human Primates. Relevance to Inhalation Toxicology and Human Health Risk Assessment. *Journal of comparative pathology*, **153**(4), pp. 287-314.
- CHARBOGNE, P., KIEFFER, B.L. and BEFORT, K., 2014. 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology*, **76**(0), pp. 204-217.
- CHARTOFF, E.H., PAPADOPOULOU, M., MACDONALD, M.L., PARSEKIAN, A., POTTER, D., KONRADI, C. and CARLEZON, J., William A, 2009. Desipramine Reduces Stress-Activated Dynorphin Expression and CREB Phosphorylation in NAC Tissue. *Molecular pharmacology*, **75**(3), pp. 704-712.
- CHAVKIN, C., JAMES, I.F. and GOLDSTEIN, A., 1982. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science*, **215**(4531), pp. 413-415.
- CHEFER, V.I., MORÓN, J.A., HOPE, B., REA, W. and SHIPPENBERG, T.S., 2000. Kappa-opioid receptor activation prevents alterations in mesocortical dopamine neurotransmission that occur during abstinence from cocaine. *Neuroscience*, **101**(3), pp. 619-627.
- CHEFER, V.I., BÄCKMAN, C.M., GIGANTE, E.D. and SHIPPENBERG, T.S., 2013. Kappa Opioid Receptors on Dopaminergic Neurons Are Necessary for Kappa-Mediated Place Aversion. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **38**(13), pp. 2623-2631.
- CHEFER, V.I., CZYZYK, T., BOLAN, E.A., MORON, J., PINTAR, J.E. and SHIPPENBERG, T.S., 2005. Endogenous κ -Opioid Receptor Systems Regulate Mesoaccumbal Dopamine Dynamics and Vulnerability to Cocaine. *The Journal of neuroscience*, **25**(20), pp. 5029-5037.
- CHEFER, V., THOMPSON, A.C. and SHIPPENBERG, T.S., 1999. Modulation of Cocaine-induced Sensitization by κ -Opioid Receptor Agonists: Role of the Nucleus Accumbens and Medial Prefrontal Cortex. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **877**(1), pp. 803-806.
- CHEN, C., HAN, D., CAI, C. and TANG, X., 2010. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of controlled release*, **142**(3), pp. 299-311.
- CHEN, X., ZHI, F., JIA, X., ZHANG, X., AMBARDEKAR, R., MENG, Z., PARADKAR, A.R., HU, Y. and YANG, Y., 2013. Enhanced brain targeting of curcumin by intranasal administration of a thermosensitive poloxamer hydrogel. *Journal of pharmacy and pharmacology*, **65**(6), pp. 807-816.
- CHIAPPETTA, D.A. and SOSNIK, A., 2007. Poly block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, **66**(3), pp. 303.
- CHOI, H., LEE, M., KIM, M. and KIM, C., 1999. Effect of additives on the physicochemical properties of liquid suppository bases. *International journal of pharmaceuticals*, **190**(1), pp. 13-19.

CHUHMA, N., ZHANG, H., MASSON, J., ZHUANG, X., SULZER, D., HEN, R. and RAYPORT, S., 2004. Dopamine Neurons Mediate a Fast Excitatory Signal via Their Glutamatergic Synapses. *The Journal of neuroscience*, **24**(4), pp. 972-981.

CONRAD, L.C.A. and PFAFF, D.W., 1976. Autoradiographic tracing of nucleus accumbens efferents in the rat. *Brain research*, **113**(3), pp. 589-596.

COSTANTINO, H.R., ILLUM, L., BRANDT, G., JOHNSON, P.H. and QUAY, S.C., 2007. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. *International journal of pharmaceutics*, **337**(1), pp. 1-24.

COWAN, A. and YOSIPOVITCH, G., 2015. Targeting Itch with Ligands Selective for kappa Opioid Receptors. *Handbook of experimental pharmacology*. Germany: Springer Berlin / Heidelberg, pp. 291-314.

CRISLER, R., JOHNSTON, N.A., SIVULA, C. and BUDELSKY, C.L., 2020. Chapter 4 - Functional Anatomy and Physiology. *The Laboratory Rat*. Third Edition edn. Elsevier Inc, pp. 91-132.

CROWE, T.P., GREENLEE, M.H.W., KANTHASAMY, A.G. and HSU, W.H., 2018. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life sciences (1973)*, **195**, pp. 44-52.

CROWLEY, N.A. and KASH, T.L., 2015. Kappa opioid receptor signaling in the brain: Circuitry and implications for treatment. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **62**, pp. 51-60.

CUI, F., ZHANG, L., ZHENG, J. and KAWASHIMA, Y., 2004. A study of insulin-chitosan complex nanoparticles used for oral administration. *Journal of drug delivery science and technology*, **14**(6), pp. 435-439.

CULLIS, P.R., MAYER, L.D., BALLY, M.B., MADDEN, T.D. and HOPE, M.J., 1989. Generating and loading of liposomal systems for drug-delivery applications. *Advanced drug delivery reviews*, **3**(3), pp. 267-282.

DAHLSTROEM, A. and FUXE, K., 1964. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, , pp. SUPPL 232:1-SUPPL 23255.

DANAEI, M., DEHGHANKHOLD, M., ATAEL, S., HASANZADEH DAVARANI, F., JAVANMARD, R., DOKHANI, A., KHORASANI, S. and MOZAFARI, M.R., 2018a. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, **10**(2), pp. 57.

DANAEI, M., DEHGHANKHOLD, M., ATAEL, S., HASANZADEH DAVARANI, F., JAVANMARD, R., DOKHANI, A., KHORASANI, S. and MOZAFARI, M.R., 2018b. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, **10**(2), pp. 57.

DARCQ, E. and KIEFFER, B.L., 2018. Opioid receptors: drivers to addiction? *Nature reviews. Neuroscience*, **19**(8), pp. 499-514.

DE BOER, A.G. and GAILLARD, P.J., 2007. Drug Targeting to the Brain. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **47**(1), pp. 323-355.

DE LORENZO, A., 2008. The olfactory neuron and the blood-brain barrier. In: J. KNIGHT and G. WOLSTENHOLME, eds, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 151-176.

DI CHARA, G. and IMPERATO, A., 1988. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **244**(3), pp. 1067-1080.

DIMOV, N., KASTNER, E., HUSSAIN, M., PERRIE, Y. and SZITA, N., 2017. Formation and purification of tailored liposomes for drug delivery using a module-based micro continuous-flow system. *Scientific Reports*, **7**(1), pp. 12045-13.

DUBEY, S.K., LAKSHMI, K.K., KRISHNA, K.V., AGRAWAL, M., SINGHVI, G., SAHA, R.N., SARAF, S., SARAF, S., SHUKLA, R. and ALEXANDER, A., 2020. Insulin mediated novel therapies for the treatment of Alzheimer's disease. *Life sciences (1973)*, **249**, pp. 117540.

DUMORTIER, G., GROSSIORD, J.L., AGNELY, F. and CHAUMEIL, J.C., 2006. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical research*, **23**(12), pp. 2709-2728.

EBNER, S.R., ROITMAN, M.F., POTTER, D.N., RACHLIN, A.B. and CHARTOFF, E.H., 2010. Depressive-like effects of the kappa opioid receptor agonist salvinorin A are associated with decreased phasic dopamine release in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology*, **210**(2), pp. 241-252.

EL MAGHRABY, G.M.M., WILLIAMS, A.C. and BARRY, B.W., 2000. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *International journal of pharmaceutics*, **196**(1), pp. 63-74.

EMANUELE, M. and BALASUBRAMANIAM, B., 2014. Differential Effects of Commercial-Grade and Purified Poloxamer 188 on Renal Function. *Drugs in R&D*, **14**(2), pp. 73-83.

ERDŐ, F., BORS, L.A., FARKAS, D., BAJZA, Á and GIZURARSON, S., 2018. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain research bulletin*, **143**, pp. 155-170.

ERIKSON, C.M., WEI, G. and WALKER, B.M., 2018. Maladaptive behavioral regulation in alcohol dependence: Role of kappa-opioid receptors in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropharmacology*, **140**, pp. 162-173.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J.J., LÓPEZ-CERVANTES, M., NAİK, A., KALIA, Y.N., QUINTANAR-GUERRERO, D. and GANEM-QUINTANAR, A., 2006. Applications of

thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*, **9**(3), pp. 339-358.

EVERITT, B.J. and ROBBINS, T.W., 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature neuroscience*, **8**(11), pp. 1481-1489.

FAISAL, M., WASEEM, D., ISMATULLAH, H. and TAQI, M.M., 2014. A molecular prospective provides new insights into implication of PDYN and OPRK1 genes in alcohol dependence. *Computers in biology and medicine*, **53**, pp. 250-257.

FAKHAR-UD-DIN and KHAN, G.M., 2019. Development and characterisation of levosulpiride-loaded suppositories with improved bioavailability in vivo. *Pharmaceutical development and technology*, **24**(1), pp. 63-69.

FALCONE, J.A., SALAMEH, T.S., YI, X., CORDY, B.J., MORTELL, W.G., KABANOV, A.V. and BANKS, W.A., 2014. Intranasal Administration as a Route for Drug Delivery to the Brain: Evidence for a Unique Pathway for Albumin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **351**(1), pp. 54-60.

FALLON, J.H. and LESLIE, F.M., 1986. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *Journal of comparative neurology (1911)*, **249**(3), pp. 293-336.

FALLON, J.H., SCHMUED, L.C., WANG, C., MILLER, R. and BANALES, G., 1984. Neurons in the ventral tegmentum have separate populations projecting to telencephalon and inferior olive, are histochemically different, and may receive direct visual input. *Brain research*, **321**(2), pp. 332-336.

FEKETE, S., BECK, A., VEUTHEY, J. and GUILLARME, D., 2014. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **101**, pp. 161-173.

FIELD, P., LI, Y. and RAISMAN, G., 2003. Ensheatment of the olfactory nerves in the adult rat. *Journal of neurocytology*, **32**(3), pp. 317-324.

FIELDS, H.L., HJELMSTAD, G.O., MARGOLIS, E.B. and NICOLA, S.M., 2007. Ventral Tegmental Area Neurons in Learned Appetitive Behavior and Positive Reinforcement. *Annual review of neuroscience*, **30**(1), pp. 289-316.

FORD, C.P., MARK, G.P. and WILLIAMS, J.T., 2006. Properties and Opioid Inhibition of Mesolimbic Dopamine Neurons Vary according to Target Location. *The Journal of neuroscience*, **26**(10), pp. 2788-2797.

FREY WILLIAM, H., III, 1991. *NEUROLOGIC AGENTS FOR NASAL ADMINISTRATION TO THE BRAIN*.

GAGLIARDI, A., PAOLINO, D., IANNONE, M., PALMA, E., FRESTA, M. and COSCO, D., 2018. Sodium deoxycholate-decorated zein nanoparticles for a stable colloidal drug delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, **13**, pp. 601-614.

GALEANO, C., QIU, Z., MISHRA, A., FARNSWORTH, S.L., HEMMI, J.J., MOREIRA, A., EDENHOFFER, P. and HORNSBY, P.J., 2018. The Route by Which

Intranasally Delivered Stem Cells Enter the Central Nervous System. *Cell Transplantation*, **27**(3), pp. 501-514.

GASBARRI, A., VERNEY, C., INNOCENZI, R., CAMPANA, E. and PACITTI, C., 1994. Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Brain research*, **668**(1), pp. 71-79.

GEHRKE, B.J., CHEFER, V.I. and SHIPPENBERG, T.S., 2008. Effects of acute and repeated administration of salvinorin A on dopamine function in the rat dorsal striatum. *Psychopharmacologia*, **197**(3), pp. 509-517.

GEISLER, S. and ZAHM, D.S., 2005. Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *Journal of comparative neurology (1911)*, **490**(3), pp. 270-294.

GEORGES, F. and ASTON-JONES, G., 2002. Activation of Ventral Tegmental Area Cells by the Bed Nucleus of the Stria Terminalis: A Novel Excitatory Amino Acid Input to Midbrain Dopamine Neurons. *The Journal of neuroscience*, **22**(12), pp. 5173-5187.

GERRITS, M.A.F.M., LESSCHER, H.B.M. and VAN REE, J.M., 2003. Drug dependence and the endogenous opioid system. *European neuropsychopharmacology*, **13**(6), pp. 424-434.

GHADIRI, M., YOUNG, P.M. and TRAINI, D., 2019. Strategies to Enhance Drug Absorption via Nasal and Pulmonary Routes. *Pharmaceutics*, **11**(3), pp. 113.

GIULIANO, E., PAOLINO, D., FRESTA, M. and COSCO, D., 2018. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. *Pharmaceutics*, **10**(3), pp. 159.

GOLDSTEIN, A., FISCHLI, W., LOWNEY, L.I., HUNKAPILLER, M. and HOOD, L., 1981. Porcine Pituitary Dynorphin: Complete Amino Acid Sequence of the Biologically Active Heptadecapeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, **78**(11), pp. 7219-7223.

GOLDSTEIN, A., TACHIBANA, S., LOWNEY, L.I., HUNKAPILLER, M. and HOOD, L., 1979. Dynorphin-(1-13), an Extraordinarily Potent Opioid Peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, **76**(12), pp. 6666-6670.

GONZALEZ GOMEZ, A., SYED, S., MARSHALL, K. and HOSSEINIDOUST, Z., 2019. Liposomal Nanovesicles for Efficient Encapsulation of Staphylococcal Antibiotics. *ACS Omega*, **4**(6), pp. 10866-10876.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. and RABASCO, A., 2011. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Expert opinion on drug delivery*, **8**(7), pp. 857-871.

GRABIELLE-MADELMONT, C., LESIEUR, S. and OLLIVON, M., 2003. *Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography*. Netherlands: Elsevier B.V.

GRASSIN-DELYLE, S., BUENESTADO, A., NALINE, E., FAISY, C., BLOUQUIT-LAYE, S., COUDERC, L., LE GUEN, M., FISCHLER, M. and DEVILLIER, P., 2012. Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. *Pharmacology & therapeutics (Oxford)*, **134**(3), pp. 366-379.

GRAZIANE, N., POLTER, A., BRIAND, L., PIERCE, R. . and KAUER, J., 2013a. Kappa Opioid Receptors Regulate Stress-Induced Cocaine Seeking and Synaptic Plasticity. *Neuron*, **77**(5), pp. 942-954.

GRAZIANE, N., POLTER, A., BRIAND, L., PIERCE, R. . and KAUER, J., 2013b. Kappa Opioid Receptors Regulate Stress-Induced Cocaine Seeking and Synaptic Plasticity. *Neuron*, **77**(5), pp. 942-954.

GROBLEWSKI, P.A., ZIETZ, C., WILLUHN, I., PHILLIPS, P.E.M. and CHAVKIN, C., 2015. Repeated stress exposure causes strain-dependent shifts in the behavioral economics of cocaine in rats. *Addiction biology*, **20**(2), pp. 297-301.

GROHGANZ, H., ZIROLI, V., MASSING, U. and BRANDL, M., 2003. Quantification of various phosphatidylcholines in liposomes by enzymatic assay. *AAPS PharmSciTech*, **4**(4), pp. 63.

GUBERNATOR, J., 2011. Active methods of drug loading into liposomes: recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity. *Expert opinion on drug delivery*, **8**(5), pp. 565-580.

GUILLOT, A.J., JORNET-MOLLÁ, E., LANDSBERG, N., MILIÁN-GUIMERÁ, C., MONTESINOS, M.C., GARRIGUES, T.M. and MELERO, A., 2021a. Cyanocobalamin Ultraflexible Lipid Vesicles: Characterization and In Vitro Evaluation of Drug-Skin Depth Profiles. *Pharmaceutics*, **13**(3), pp. 418.

GUILLOT, A.J., JORNET-MOLLÁ, E., LANDSBERG, N., MILIÁN-GUIMERÁ, C., MONTESINOS, M.C., GARRIGUES, T.M. and MELERO, A., 2021b. Cyanocobalamin Ultraflexible Lipid Vesicles: Characterization and In Vitro Evaluation of Drug-Skin Depth Profiles. *Pharmaceutics*, **13**(3), pp. 418.

GULATI, K., KANT, K., FINDLAY, D. and LOSIC, D., 2015. Periodically tailored titania nanotubes for enhanced drug loading and releasing performances. *Journal of materials chemistry. B, Materials for biology and medicine*, **3**(12), pp. 2553-2559.

GÜVEN, A., ORTIZ, M., CONSTANTIN, M. and O'SULLIVAN, C.K., 2009. Rapid and efficient method for the size separation of homogeneous fluorescein-encapsulating liposomes. *Journal of liposome research*, **19**(2), pp. 148-154.

HAMILTON, D.F., GHERT, M. and SIMPSON, A.H.R.W., 2015. Interpreting regression models in clinical outcome studies. *Bone & joint research*, **4**(9), pp. 152-153.

HAN, B., JONES, C.M., EINSTEIN, E.B., POWELL, P.A. and COMPTON, W.M., 2021. Use of Medications for Alcohol Use Disorder in the US: Results From the 2019 National Survey on Drug Use and Health. *Archives of general psychiatry*, **78**(8), pp. 922-924.

HARKEMA, J., CAREY, S. and WAGNER, J., 2006. The Nose Revisited: A Brief Review of the Comparative Structure, Function, and Toxicologic Pathology of the Nasal Epithelium. *Toxicologic pathology*, **34**(3), pp. 252-269.

HARTIG, U. and OPITZ, K., 1983. The influence of the kappa-agonist bremazocine on ingestive behaviour in mice and rats. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, **262**(1), pp. 4-12.

HEILIG, M. and SCHANK, J.R., 2014a. Kappa-Opioid Receptor Antagonism: A Mechanism for Treatment of Relief Drinking? *Biological psychiatry (1969)*, **75**(10), pp. 750-751.

HEILIG, M. and SCHANK, J.R., 2014b. Kappa-Opioid Receptor Antagonism: A Mechanism for Treatment of Relief Drinking? *Biological psychiatry (1969)*, **75**(10), pp. 750-751.

HELMBRECHT, H., JOSEPH, A., MCKENNA, M., ZHANG, M. and NANCE, E., 2020. Governing transport principles for nanotherapeutic application in the brain. *Current Opinion in Chemical Engineering*, **30**(12), pp. 112-119.

HENDERSON-REDMOND, A. and CZACHOWSKI, C., 2014. Effects of systemic opioid receptor ligands on ethanol- and sucrose seeking and drinking in alcohol-preferring (P) and Long Evans rats. *Psychopharmacology*, **231**(22), pp. 4309-4321.

HIPÓLITO, L., MARTÍ-PRATS, L., SÁNCHEZ-CATALÁN, M.J., POLACHE, A. and GRANERO, L., 2011. Induction of conditioned place preference and dopamine release by salsolinol in posterior VTA of rats: Involvement of μ -opioid receptors. *Neurochemistry international*, **59**(5), pp. 559-562.

HIPÓLITO, L., SÁNCHEZ-CATALÁN, M.J., GRANERO, L. and POLACHE, A., 2009. Local salsolinol modulates dopamine extracellular levels from rat nucleus accumbens: Shell/core differences. *Neurochemistry international*, **55**(4), pp. 187-192.

HÖLTER, S.M., HENNIGER, M.S., LIPKOWSKI, A.W. and SPANAGEL, R., 2000. Kappa-opioid receptors and relapse-like drinking in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology*, **153**(1), pp. 93-102.

HONG, S., OH, K.T., CHOI, H. and LIM, S., 2019a. Liposomal Formulations for Nose-to-Brain Delivery: Recent Advances and Future Perspectives. *Pharmaceutics*, **11**(10), pp. 540.

HONG, S., OH, K.T., CHOI, H. and LIM, S., 2019b. Liposomal Formulations for Nose-to-Brain Delivery: Recent Advances and Future Perspectives. *Pharmaceutics*, **11**(10), pp. 540.

HOSNY, K.M., RIZG, W.Y. and KHALLAF, R.A., 2020. Preparation and Optimization of In Situ Gel Loaded with Rosuvastatin-Ellagic Acid Nanotransfersomes to Enhance the Anti-Proliferative Activity. *Pharmaceutics*, **12**(3), pp. 263.

HWANG, S., MAITANI, Y., QI, X., TAKAYAMA, K. and NAGAI, T., 1999. Remote loading of diclofenac, insulin and fluorescein isothiocyanate labeled insulin into

liposomes by pH and acetate gradient methods. *International journal of pharmaceutics*, **179**(1), pp. 85-95.

IGARASHI, T., SHOJI, Y. and KATAYAMA, K., 2012. Anomalous Solubilization Behavior of Dimyristoylphosphatidylcholine Liposomes Induced by Sodium Dodecyl Sulfate Micelles. *Analytical sciences*, **28**(4), pp. 345.

IQBAL, M.A., MD, S., SAHNI, J.K., BABOOTA, S., DANG, S. and ALI, J., 2012. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. *Journal of drug targeting*, **20**(10), pp. 813-830.

IWAMOTO, E.T., 1981. Locomotor activity and antinociception after putative mu, kappa and sigma opioid receptor agonists in the rat: influence of dopaminergic agonists and antagonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **217**(2), pp. 451-460.

JAAFAR-MAALEJ, C., DIAB, R., ANDRIEU, V., ELAISSARI, A. and FESSI, H., 2010. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of liposome research*, **20**(3), pp. 228-243.

JACKSON, K.J., CARROLL, F.I., NEGUS, S.S. and DAMAJ, M.I., 2010. Effect of the selective kappa-opioid receptor antagonist JDTC on nicotine antinociception, reward, and withdrawal in the mouse. *Psychopharmacology*, **210**(2), pp. 285-294.

JOHNSTON, M.J.W., SEMPLE, S.C., KLIMUK, S.K., EDWARDS, K., EISENHARDT, M.L., LENG, E.C., KARLSSON, G., YANKO, D. and CULLIS, P.R., 2006. Therapeutically optimized rates of drug release can be achieved by varying the drug-to-lipid ratio in liposomal vincristine formulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1758**(1), pp. 55-64.

JOSHI, S., HUSSAIN, M.T., ROCES, C.B., ANDERLUZZI, G., KASTNER, E., SALMASO, S., KIRBY, D.J. and PERRIE, Y., 2016. Microfluidics based manufacture of liposomes simultaneously entrapping hydrophilic and lipophilic drugs. *International journal of pharmaceutics*, **514**(1), pp. 160-168.

KALINER, M., MAROM, Z., PATOW, C. and SHELHAMER, J., 1984. Human respiratory mucus. *J. Allergy Clin. Immunol.*, pp. 318-323.

KANGAWA, K., MATSUO, H. and IGARASHI, M., 1979. α -Neo-endorphin: A "big" leu-enkephalin with potent opiate activity from porcine hypothalamus. *Biochemical and biophysical research communications*, **86**(1), pp. 153-160.

KARKHANIS, A.N., HUGGINS, K.N., ROSE, J.H. and JONES, S.R., 2016. Switch from excitatory to inhibitory actions of ethanol on dopamine levels after chronic exposure: Role of kappa opioid receptors. *Neuropharmacology*, **110**(Pt A), pp. 190-197.

KARKHANIS, A.N., ROSE, J.H., WEINER, J.L. and JONES, S.R., 2016. Early-Life Social Isolation Stress Increases Kappa Opioid Receptor Responsiveness and Downregulates the Dopamine System. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **41**(9), pp. 2263-2274.

- KARKHANIS, A., HOLLERAN, K.M. and JONES, S.R., 2017. Dynorphin/Kappa Opioid Receptor Signaling in Preclinical Models of Alcohol, Drug, and Food Addiction. *International review of neurobiology*, **136**, pp. 53-88.
- KELLER, L., MERKEL, O. and POPP, A., 2022. Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development. *Drug delivery and translational research*, **12**(4), pp. 735-757.
- KELLER, S., HEERKLOTZ, H., JAHNKE, N. and BLUME, A., 2006. Thermodynamics of Lipid Membrane Solubilization by Sodium Dodecyl Sulfate. *Biophysical Journal*, **90**(12), pp. 4509-4521.
- KHAN, A.R., LIU, M., KHAN, M.W. and ZHAI, G., 2017. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. *Journal of controlled release*, **268**, pp. 364-389.
- KHANNA, A. and FARAG, E., 2017. Chapter 3 - Blood-brain barrier. In: H. PRABHAKAR, ed, *Essentials of Neuroanesthesia*. Cambridge: Cambridge, MA: Academic Press, .
- KHUTORYANSKIY, V.V., 2011. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromolecular bioscience*, **11**(6), pp. 748-764.
- KIEFFER, B.L. and GAVÉRIAUX-RUFF, C., 2002. Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in neurobiology*, **66**(5), pp. 285-306.
- KILPATRICK, D.L., WAHLSTROM, A., LAHM, H.W., BLACHER, R. and UDENFRIEND, S., 1982. Rimorphin, a Unique, Naturally Occurring [Leu]Enkephalin-Containing Peptide Found in Association with Dynorphin and α -neo-endorphin. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, **79**(21), pp. 6480-6483.
- KIM, H. and FASSIHI, R., 1997a. Application of Binary Polymer System in Drug Release Rate Modulation. 2. Influence of Formulation Variables and Hydrodynamic Conditions on Release Kinetics. *Journal of pharmaceutical sciences*, **86**(3), pp. 323-328.
- KIM, H. and FASSIHI, R., 1997b. Application of Binary Polymer System in Drug Release Rate Modulation. 2. Influence of Formulation Variables and Hydrodynamic Conditions on Release Kinetics. *Journal of pharmaceutical sciences*, **86**(3), pp. 323-328.
- KISHIOKA, S., KIGUCHI, N., KOBAYASHI, Y., YAMAMOTO, C., SAIKA, F., WAKIDA, N., KO, M. and WOODS, J.H., 2013a. Pharmacokinetic evidence for the long-lasting effect of nor-binaltorphimine, a potent kappa opioid receptor antagonist, in mice. *Neuroscience letters*, **552**, pp. 98-102.
- KISHIOKA, S., KIGUCHI, N., KOBAYASHI, Y., YAMAMOTO, C., SAIKA, F., WAKIDA, N., KO, M. and WOODS, J.H., 2013b. Pharmacokinetic evidence for the long-lasting effect of nor-binaltorphimine, a potent kappa opioid receptor antagonist, in mice. *Neuroscience letters*, **552**, pp. 98-102.
- KISSLER, J.L. and WALKER, B.M., 2016. Dissociating Motivational From Physiological Withdrawal in Alcohol Dependence: Role of Central Amygdala κ -Opioid Receptors. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **41**(2), pp. 560-567.

KIVELL, B.M., EWALD, A.W.M. and PRISINZANO, T.E., 2014. Salvinorin A Analogs and Other Kappa-Opioid Receptor Compounds as Treatments for Cocaine Abuse. *Advances in Pharmacology*. United States: Elsevier Inc, pp. 481-511.

KNOLL, A.T., MELONI, E.G., THOMAS, J.B., CARROLL, F.I. and CARLEZON, J., William A, 2007. Anxiolytic-Like Effects of κ -Opioid Receptor Antagonists in Models of Unlearned and Learned Fear in Rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **323**(3), pp. 838-845.

KNOLL, A.T., MUSCHAMP, J.W., SILLIVAN, S.E., FERGUSON, D., DIETZ, D.M., MELONI, E.G., CARROLL, F.I., NESTLER, E.J., KONRADI, C. and CARLEZON, W.A., 2011. Kappa Opioid Receptor Signaling in the Basolateral Amygdala Regulates Conditioned Fear and Anxiety in Rats. *Biological psychiatry (1969)*, **70**(5), pp. 425-433.

KOFFI, A.A., AGNELY, F., PONCHEL, G. and GROSSIORD, J.L., 2006. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. *European journal of pharmaceutical sciences*, **27**(4), pp. 328-335.

KOOB, G.F. and LE MOAL, M., 2005. *Neurobiology of Addiction*. San Diego: Elsevier Science.

KOVACS, K.M., SZAKALL, I., O'BRIEN, D., WANG, R., VINOD, K.Y., SAITO, M., SIMONIN, F., KIEFFER, B.L. and VADASZ, C., 2005. Decreased Oral Self-Administration of Alcohol In κ -Opioid Receptor Knock-Out Mice. *Alcoholism, clinical and experimental research*, **29**(5), pp. 730-738.

KREUZIG, F. and FRANK, J., 1981. rapid automated determination of d-penicillamine. *Journal of Chromatography A*, **218**, pp. 615-620.

KRISHAN, M., GUDELSKY, G.A., DESAI, P.B. and GENTER, M.B., 2014. Manipulation of olfactory tight junctions using papaverine to enhance intranasal delivery of gemcitabine to the brain. *Drug delivery*, **21**(1), pp. 8-16.

LAMMEL, S., HETZEL, A., HÄCKEL, O., JONES, I., LISS, B. and ROEPER, J., 2008. Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System. *Neuron*, **57**(5), pp. 760-773.

LAMMEL, S., LIM, B.K. and MALENKA, R.C., 2014. Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology*, **76**(0), pp. 351-359.

LAMMEL, S., LIM, B.K., RAN, C., HUANG, K.W., BETLEY, M.J., TYE, K.M., DEISSEROTH, K. and MALENKA, R.C., 2012. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area.

LAND, B.B., BRUCHAS, M.R., SCHATTAUER, S., GIARDINO, W.J., AITA, M., MESSINGER, D., HNASKO, T.S., PALMITER, R.D. and CHAVKIN, C., 2009. Activation of the kappa opioid receptor in the dorsal raphe nucleus mediates the aversive effects of stress and reinstates drug seeking. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, **106**(45), pp. 19168-19173.

LARGE, D.E., ABDELMESSIH, R.G., FINK, E.A. and AUGUSTE, D.T., 2021. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced drug delivery reviews*, **176**, pp. 113851.

LAVIN, A., NOGUEIRA, L., LAPISH, C.C., WIGHTMAN, R.M., PHILLIPS, P.E.M. and SEAMANS, J.K., 2005. Mesocortical Dopamine Neurons Operate in Distinct Temporal Domains Using Multimodal Signaling. *The Journal of neuroscience*, **25**(20), pp. 5013-5023.

LE MERRER, J., BECKER, J.A.J., BEFORT, K. and KIEFFER, B.L., 2009. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological Reviews*, **89**(4), pp. 1379-1412.

LEE, E.H., KIM, A., OH, Y. and KIM, C., 2005. Effect of edge activators on the formation and transfection efficiency of ultradeformable liposomes. *Biomaterials*, **26**(2), pp. 205-210.

LEITE, N.B., MARTINS, D.B., FAZANI, V.E., VIEIRA, M.R. and DOS SANTOS CABRERA, M.P., 2018. Cholesterol modulates curcumin partitioning and membrane effects. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, **1860**(11), pp. 2320-2328.

LINDHOLM, S., WERME, M., BRENÉ, S. and FRANCK, J., 2001a. The selective κ -opioid receptor agonist U50,488H attenuates voluntary ethanol intake in the rat. *Behavioural brain research*, **120**(2), pp. 137-146.

LINDHOLM, S., WERME, M., BRENÉ, S. and FRANCK, J., 2001b. The selective κ -opioid receptor agonist U50,488H attenuates voluntary ethanol intake in the rat. *Behavioural brain research*, **120**(2), pp. 137-146.

LOCHHEAD, J.J. and THORNE, R.G., 2012. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced drug delivery reviews*, **64**(7), pp. 614-628.

LOCHHEAD, J.J., KELLOHEN, K.L., RONALDSON, P.T. and DAVIS, T.P., 2019. Distribution of insulin in trigeminal nerve and brain after intranasal administration. *Scientific Reports*, **9**(1), pp. 2621.

LOCKE, K.W., BROWN, D.R. and HOLTZMAN, S.G., 1982. Effects of opiate antagonists and putative mu- and kappa-agonists on milk intake in rat and squirrel monkey. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, **17**(6), pp. 1275-1279.

LOGRIP, M.L., JANAK, P.H. and RON, D., 2009. Blockade of ethanol reward by the kappa opioid receptor agonist U50,488H. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, **43**(5), pp. 359-365.

LOWE, S.L., WONG, C.J., WITCHER, J., GONZALES, C.R., DICKINSON, G.L., BELL, R.L., RORICK-KEHN, L., WELLER, M., STOLTZ, R.R., ROYALTY, J. and TAUSCHER-WISNIEWSKI, S., 2014. Safety, tolerability, and pharmacokinetic evaluation of single- and multiple-ascending doses of a novel kappa opioid receptor antagonist LY2456302 and drug interaction with ethanol in healthy subjects. *Journal of clinical pharmacology*, **54**(9), pp. 968-978.

LU, T. and TEN HAGEN, T.L.M., 2020. A novel kinetic model to describe the ultra-fast triggered release of thermosensitive liposomal drug delivery systems. *Journal of controlled release*, **324**, pp. 669-678.

MAESTRELLI, F., CAPASSO, G., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.L., RABASCO, A.M., GHELARDINI, C. and MURA, P., 2009. Effect of preparation technique on the properties and in vivo efficacy of benzocaine-loaded ethosomes. *Journal of liposome research*, **19**(4), pp. 253-260.

MAGOME, N., TAKEMURA, T. and YOSHIKAWA, K., 1997. Spontaneous Formation of Giant Liposomes from Neutral Phospholipids. *Chemistry Letters*, **26**(3), pp. 205-206.

MAGUE, S.D., PLIAKAS, A.M., TODTENKOPF, M.S., TOMASIEWICZ, H.C., ZHANG, Y., STEVENS, J., William C, JONES, R.M., PORTOGHESE, P.S. and CARLEZON, J., William A, 2003. Antidepressant-Like Effects of κ -Opioid Receptor Antagonists in the Forced Swim Test in Rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **305**(1), pp. 323-330.

MAIMAITI, S., ANDERSON, K.L., DEMOLL, C., BREWER, L.D., RAUH, B.A., GANT, J.C., BLALOCK, E.M., PORTER, N.M. and THIBAUT, O., 2016. Intranasal Insulin Improves Age-Related Cognitive Deficits and Reverses Electrophysiological Correlates of Brain Aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, **71**(1), pp. 30-39.

MAINO, P., KOETSIER, E. and PEREZ, R.S.G.M., 2014. Fentanyl Overdose Caused by Malfunction of SynchroMed II Intrathecal Pump Two Case Reports. *Regional anesthesia and pain medicine*, **39**(5), pp. 434-437.

MAISONNEUVE, I.M., ARCHER, S. and GLICK, S.D., 1994. U50,488, a κ opioid receptor agonist, attenuates cocaine-induced increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience letters*, **181**(1), pp. 57-60.

MAJZOUB, R.N., EWERT, K.K. and SAFINYA, C.R., 2016. Cationic liposome-nucleic acid nanoparticle assemblies with applications in gene delivery and gene silencing. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, physical, and engineering sciences*, **374**(2072), pp. 20150129.

MANCA, M.L., CENCETTI, C., MATRICARDI, P., CASTANGIA, I., ZARU, M., SALES, O.D., NACHER, A., VALENTI, D., MACCIONI, A.M., FADDA, A.M. and MANCONI, M., 2016. Glycosomes: Use of hydrogenated soy phosphatidylcholine mixture and its effect on vesicle features and diclofenac skin penetration. *International journal of pharmaceutics*, **511**(1), pp. 198-204.

MANTSCH, J.R., BAKER, D.A., FUNK, D., LÊ, A.D. and SHAHAM, Y., 2016. Stress-Induced Reinstatement of Drug Seeking: 20 Years of Progress. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **41**(1), pp. 335-356.

MARGOLIS, E.B., LOCK, H., HJELMSTAD, G.O. and FIELDS, H.L., 2006. The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *The Journal of physiology*, **577**(3), pp. 907-924.

- MARGOLIS, E.B., MITCHELL, J.M., ISHIKAWA, J., HJELMSTAD, G.O. and FIELDS, H.L., 2008. Midbrain Dopamine Neurons: Projection Target Determines Action Potential Duration and Dopamine D₂ Receptor Inhibition. *The Journal of neuroscience*, **28**(36), pp. 8908-8913.
- MARGOLIS, E.B., HJELMSTAD, G.O., BONCI, A. and FIELDS, H.L., 2005. Both Kappa and Mu Opioid Agonists Inhibit Glutamatergic Input to Ventral Tegmental Area Neurons. *Journal of Neurophysiology*, **93**(6), pp. 3086-3093.
- MARGOLIS, E.B., HJELMSTAD, G.O., BONCI, A. and FIELDS, H.L., 2003. κ -Opioid Agonists Directly Inhibit Midbrain Dopaminergic Neurons. *The Journal of neuroscience*, **23**(31), pp. 9981-9986.
- MARK, T.L., KASSED, C.A., VANDIVORT-WARREN, R., LEVIT, K.R. and KRANZLER, H.R., 2009. Alcohol and opioid dependence medications: Prescription trends, overall and by physician specialty. *Drug and alcohol dependence*, **99**(1), pp. 345-349.
- MASSALY, N., MORÓN, J.A. and AL-HASANI, R., 2016. A Trigger for Opioid Misuse: Chronic Pain and Stress Dysregulate the Mesolimbic Pathway and Kappa Opioid System. *Frontiers in Neuroscience*, **10**, pp. 480.
- MAYER, L.D., BALLY, M.B., HOPE, M.J. and CULLIS, P.R., 1986. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chemistry and physics of lipids*, **40**(2), pp. 333-345.
- MCLAUGHLIN, J.P., LAND, B.B., SHUANG LI, PINTAR, J.E. and CHAVKIN, C., 2006. Prior Activation of Kappa Opioid Receptors by U50,488 Mimics Repeated Forced Swim Stress to Potentiate Cocaine Place Preference Conditioning. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **31**(4), pp. 787-794.
- MCLAUGHLIN, J.P., MARTON-POPOVICI, M. and CHAVKIN, C., 2003a. κ Opioid Receptor Antagonism and Prodynorphin Gene Disruption Block Stress-Induced Behavioral Responses. *The Journal of neuroscience*, **23**(13), pp. 5674-5683.
- MCLAUGHLIN, J.P., MARTON-POPOVICI, M. and CHAVKIN, C., 2003b. κ Opioid Receptor Antagonism and Prodynorphin Gene Disruption Block Stress-Induced Behavioral Responses. *The Journal of neuroscience*, **23**(13), pp. 5674-5683.
- MERG, F., FILLIOL, D., USYNIN, I., BAZOV, I., BARK, N., HURD, Y.L., YAKOVLEVA, T., KIEFFER, B.L. and BAKALKIN, G., 2006a. Big dynorphin as a putative endogenous ligand for the κ -opioid receptor. *Journal of neurochemistry*, **97**(1), pp. 292-301.
- MERG, F., FILLIOL, D., USYNIN, I., BAZOV, I., BARK, N., HURD, Y.L., YAKOVLEVA, T., KIEFFER, B.L. and BAKALKIN, G., 2006b. Big dynorphin as a putative endogenous ligand for the κ -opioid receptor. *Journal of neurochemistry*, **97**(1), pp. 292-301.
- MILLER, S.C. and DONOVAN, M.D., 1982. Effect of poloxamer 407 gel on the mitotic activity of pilocarpine nitrate in rabbits. *International journal of pharmaceuticals*, **12**(2), pp. 147-152.

- MINAMINO, N., KANGAWA, K., CHINO, N., SAKAKIBARA, S. and MATSUO, H., 1981. β -Neo-endorphin, a new hypothalamic “big” Leu-enkephalin of porcine origin: Its purification and the complete amino acid sequence. *Biochemical and biophysical research communications*, **99**(3), pp. 864-870.
- MINOKADEH, A., FUNKELSTEIN, L., TONEFF, T., HWANG, S., BEINFELD, M., REINHECKEL, T., PETERS, C., ZADINA, J. and HOOK, V., 2010. Cathepsin L participates in dynorphin production in brain cortex, illustrated by protease gene knockout and expression. *Molecular and cellular neurosciences*, **43**(1), pp. 98-107.
- MITTAL, D., ALI, A., MD, S., BABOOTA, S., SAHNI, J.K. and ALI, J., 2014. Insights into direct nose to brain delivery: current status and future perspective. *Drug delivery*, **21**(2), pp. 75-86.
- MOHAMMED, A.R., WESTON, N., COOMBES, A.G.A., FITZGERALD, M. and PERRIE, Y., 2004. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International journal of pharmaceutics*, **285**(1), pp. 23-34.
- MONTI, D., BURGALASSI, S., ROSSATO, M.S., ALBERTINI, B., PASSERINI, N., RODRIGUEZ, L. and CHETONI, P., 2010. Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part II: In vitro/in vivo evaluation. *International journal of pharmaceutics*, **400**(1), pp. 32-36.
- MOON, C., YOO, S.J. and HAN, H.S., 2014. Smell. In: M.J. AMINOFF and R.B. DAROFF, eds, *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)*. Elsevier Ltd, pp. 216-220.
- MORALES, M. and MARGOLIS, E.B., 2017. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature reviews. Neuroscience*, **18**(2), pp. 73-85.
- MORENO, E., SCHWARTZ, J., LARRAÑETA, E., NGUEWA, P.A., SANMARTÍN, C., AGÜEROS, M., IRACHE, J.M. and ESPUELAS, S., 2014. Thermosensitive hydrogels of poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) – Pluronic® F127 copolymers for controlled protein release. *International journal of pharmaceutics*, **459**(1-2), pp. 1-9.
- MORRISON, E.E. and COSTANZO, R.M., 1992. Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microscopy research and technique*, **23**(1), pp. 49-61.
- MORRISON, E.E. and COSTANZO, R.M., 1990. Morphology of the human olfactory epithelium. *Journal of comparative neurology (1911)*, **297**(1), pp. 1-13.
- MUCHA, R.F. and HERZ, A., 1985. Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonists studied with place and taste preference conditioning. *Psychopharmacologia*, **86**(3), pp. 274-280.
- MÜLLER, R.H., MÄDER, K. and GOHLA, S., 2000. *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art*. Amsterdam: Elsevier B.V.

MUNRO, T.A., BERRY, L.M., CARROLL, F.I., ZHAO, Z., CARLEZON, W.A., COHEN, B.M., VAN'T VEER, A.V. and BEGUIN, C.A., 2012. Long-acting κ opioid antagonists nor-BNI, GNTI and JDTic: pharmacokinetics in mice and lipophilicity.

MUPPIDI, K., PUMERANTZ, A.S., WANG, J. and BETAGERI, G., 2012. Development and Stability Studies of Novel Liposomal Vancomycin Formulations. *ISRN Pharmaceutics*, **2012**, pp. 636743-8.

MYGIND, N. and DAHL, R., 1998. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Advanced drug delivery reviews*, **29**(1), pp. 3-12.

NARITA, M., KANEKO, C., MIYOSHI, K., NAGUMO, Y., KUZUMAKI, N., NAKAJIMA, M., NANJO, K., MATSUZAWA, K., YAMAZAKI, M. and SUZUKI, T., 2006. Chronic Pain Induces Anxiety with Concomitant Changes in Opioidergic Function in the Amygdala. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **31**(4), pp. 739-750.

NAVA, G., PIÑÓN, E., MENDOZA, L., MENDOZA, N., QUINTANAR, D. and GANEM, A., 2011. Formulation and in Vitro, ex Vivo and in Vivo Evaluation of Elastic Liposomes for Transdermal Delivery of Ketorolac Tromethamine. *Pharmaceutics*, **3**(4), pp. 954-970.

NESTBY, P., SCHOFFELMEER, A.N.M., HOMBERG, J.R., WARDEH, G., DE VRIES, T.J., MULDER, A.H. and VANDERSCHUREN, L.J.M.J., 1999. Bremazocine reduces unrestricted free-choice ethanol self-administration in rats without affecting sucrose preference. *Psychopharmacologia*, **142**(3), pp. 309-317.

NGUYEN, T.L., NGUYEN, T.H. and NGUYEN, D.H., 2017. Development and In Vitro Evaluation of Liposomes Using Soy Lecithin to Encapsulate Paclitaxel. *International Journal of Biomaterials*, **2017**, pp. 8234712-7.

NICHOLSON, C., 2001. Diffusion and related transport mechanisms in brain tissue. *Reports on progress in physics*, **64**(7), pp. 815-884.

NII, T. and ISHII, F., 2005. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *International journal of pharmaceutics*, **298**(1), pp. 198-205.

NSAIRAT, H., KHATER, D., SAYED, U., ODEH, F., AL BAWAB, A. and ALSHAER, W., 2022. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, **8**(5), pp. e09394.

OBERMEIER, B., VERMA, A. and RANSOHOFF, R.M., 2016. The blood-brain barrier. *Handbook of Clinical Neurology*, **133**, pp. 39-59.

OBSERVATORIO ESPAÑOL DE LAS DROGAS Y LAS ADICCIONES, 2021. *Informe 2021: Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España*. Madrid: Ministerio de Sanidad.

ODEH, F., NSAIRAT, H., ALSHAER, W., ALSOTARI, S., BUQAIEN, R., ISMAIL, S., AWIDI, A. and AL BAWAB, A., 2019. Remote loading of curcumin-in-modified β -cyclodextrins into liposomes using a transmembrane pH gradient. *RSC advances*, **9**(64), pp. 37148-37161.

- OKA, T., NEGISHI, K., SUDA, M., SAWA, A., FUJINO, M. and WAKIMASU, M., 1982. Evidence that dynorphin-(1–13) acts as an agonist on opioid κ -receptors. *European journal of pharmacology*, **77**(2), pp. 137-141.
- OLSON, F., HUNT, C.A., SZOKA, F.C., VAIL, W.J. and PAPAHAADJOPOULOS, D., 1979. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et biophysica acta*, **557**(1), pp. 9-23.
- ONG, S.G.M., CHITNENI, M., LEE, K.S., MING, L.C. and YUEN, K.H., 2016. Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics*, **8**(4), pp. 36.
- ONG, S.G.M., MING, L.C., LEE, K.S. and YUEN, K.H., 2016. Influence of the Encapsulation Efficiency and Size of Liposome on the Oral Bioavailability of Griseofulvin-Loaded Liposomes. *Pharmaceutics*, **8**(3), pp. 25.
- PANG, Y., LIN, S., WRIGHT, C., SHEN, J., CARTER, K., BHATT, A. and FAN, L.-., 2016. Intranasal insulin protects against substantia nigra dopaminergic neuronal loss and alleviates motor deficits induced by 6-OHDA in rats. *Neuroscience*, **318**, pp. 157-165.
- PANWAR, P., PANDEY, B., LAKHERA, P.C. and SINGH, K.P., 2010. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes. *International Journal of Nanomedicine*, **5**(default), pp. 101-108.
- PAOLINO, D., COSCO, D., RACANICCHI, L., TRAPASSO, E., CELIA, C., IANNONE, M., PUXEDDU, E., COSTANTE, G., FILETTI, S., RUSSO, D. and FRESTA, M., 2010. Gemcitabine-loaded PEGylated unilamellar liposomes vs GEMZAR®: Biodistribution, pharmacokinetic features and in vivo antitumor activity. *Journal of controlled release*, **144**(2), pp. 144-150.
- PARDRIDGE, W.M., 2005. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *NeuroRx*, **2**(1), pp. 3-14.
- PAXINOS, G. and WATSON, C., 2007a. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6. ed. edn. Amsterdam [u.a.]: Elsevier Acad. Press.
- PAXINOS, G. and WATSON, C., 2007b. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6. ed. edn. Amsterdam [u.a.]: Elsevier Acad. Press.
- PEPPAS, N.A. and SAHLIN, J.J., 1989a. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International journal of pharmaceutics*, **57**(2), pp. 169-172.
- PEPPAS, N.A. and SAHLIN, J.J., 1989b. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International journal of pharmaceutics*, **57**(2), pp. 169-172.
- PERL, D.P. and GOOD, P.F., 1987. Uptake of aluminium into central nervous system along nasal-olfactory pathways. *The Lancet (British edition)*, **1**(8540), pp. 1028.

PERUMAL CHANDARAN, S., NATARAJAN, S., RAJAN, D. and PRAHAKARAN, L., 2014. Phospholipids as versatile polymer in drug delivery systems. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, , pp. 8-11.

PIRES, A., FORTUNA, A., ALVES, G. and FALCÃO, A., 2009. Intranasal Drug Delivery: How, Why and What for? *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*, **12**(3), pp. 288-311.

PLEGUEZUELOS-VILLA, M., MIR PALOMO, S., DíEZ-SALES, O., VILA BUSÓ, M.A.O., RUIZ-SAURI, A. and NÁCHER ALONSO, M.A., 2018. A novel ultradeformable liposomes of Naringin for anti-inflammatory therapy.

POLTER, A.M., BISHOP, R.A., BRIAND, L.A., GRAZIANE, N.M., PIERCE, R.C. and KAUER, J.A., 2014. Poststress Block of Kappa Opioid Receptors Rescues Long-Term Potentiation of Inhibitory Synapses and Prevents Reinstatement of Cocaine Seeking. *Biological psychiatry (1969)*, **76**(10), pp. 785-793.

Ponce G, Jiménez-Arriero MÁ, Rubio G. Tratamiento farmacológico de la dependencia alcohólica. Trastornos adictivos. 2003;5(1):27-32.

PORSOLT, R.D., LE PICHON, M. and JALFRE, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature (London)*, **266**(5604), pp. 730-732.

PORTOGHESE, P.S., LIPKOWSKI, A.W. and TAKEMORI, A.E., 1987. Binaltorphimine and nor-binaltorphimine, potent and selective kappa-opioid receptor antagonists. *Life sciences (1973)*, **40**(13), pp. 1287-1292.

PURI, A., LOOMIS, K., SMITH, B., LEE, J., YAVLOVICH, A., HELDMAN, E. and BLUMENTHAL, R., 2009. Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, **26**(6), pp. 523-580.

QUINO, I., RAMOS, O. and GUISBERT, E., 2007. DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION INSTRUMENTAL (LDI) Y LIMITE DE CUANTIFICACION INSTRUMENTAL (LCI) EN ELEMENTOS TRAZA DE AGUA SUBTERRANEA. *Revista Boliviana de Química*, **24**(1), pp. 53-57.

RABIEE, N., AHMADI, S., AFSHARI, R., KHALAJI, S., RABIEE, M., BAGHERZADEH, M., FATAHI, Y., DINARVAND, R., TAHRIRI, M., TAYEBI, L., HAMBLIN, M.R. and WEBSTER, T.J., 2021. Polymeric Nanoparticles for Nasal Drug Delivery to the Brain: Relevance to Alzheimer's Disease. *Advanced therapeutics*, **4**(3), pp. n/a.

RÁCZ, I., MARKERT, A., MAUER, D., STOFFEL-WAGNER, B. and ZIMMER, A., 2013. Long-term ethanol effects on acute stress responses: modulation by dynorphin. *Addiction biology*, **18**(4), pp. 678-688.

RANGGER, C., HELBOK, A., VON GUGGENBERG, E., SOSABOWSKI, J., RADOLF, T., PRASSL, R., ANDREAE, F., THURNER, G.C., HAUBNER, R. and DECRISTOFORO, C., 2012. Influence of PEGylation and RGD loading on the targeting properties of radiolabeled liposomal nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, **7**(default), pp. 5889-5900.

RAVI, P.R., ADITYA, N., PATIL, S. and CHERIAN, L., 2015. Nasal in-situ gels for delivery of rasagiline mesylate: improvement in bioavailability and brain localization. *Drug delivery*, **22**(7), pp. 903-910.

REDILA, V.A. and CHAVKIN, C., 2008. Stress-induced reinstatement of cocaine seeking is mediated by the kappa opioid system. *Psychopharmacologia*, **200**(1), pp. 59-70.

REED, B., BUTELMAN, E.R., FRY, R.S., KIMANI, R. and KREEK, M.J., 2018. Repeated Administration of Opra Kappa (LY2456302), a Novel, Short-Acting, Selective KOP-r Antagonist, in Persons with and without Cocaine Dependence. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **43**(4), pp. 928.

REFAI, H., HASSAN, D. and ABDELMONEM, R., 2017. Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. *Drug Delivery*, **24**(1), pp. 278-288.

REINDL, J.D., ROWAN, K., CAREY, A.N., PENG, X., NEUMEYER, J.L. and MCLAUGHLIN, J.P., 2008. Antidepressant-Like Effects of the Novel Kappa Opioid Antagonist MCL-144B in the Forced-Swim Test. *Pharmacology*, **81**(3), pp. 229-235.

RENNER, D.B., SVITAK, A.L., GALLUS, N.J., ERICSON, M.E., FREY II, W.H. and HANSON, L.R., 2012. Intranasal delivery of insulin via the olfactory nerve pathway. *Journal of pharmacy and pharmacology*, **64**(12), pp. 1709-1714.

RIBEIRO, L.N.D.M., COUTO, V.M., FRACETO, L.F. and DE PAULA, E., 2018. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. *Scientific reports*, **8**(1), pp. 982-8.

RICCI, E.J., LUNARDI, L.O., NANCLARES, D.M.A. and MARCHETTI, J.M., 2005. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *International journal of pharmaceutics*, **288**(2), pp. 235-244.

RICCI, E.J., BENTLEY, M.V.L.B., FARAH, M., BRETAS, R.E.S. and MARCHETTI, J.M., 2002. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. *European journal of pharmaceutical sciences*, **17**(3), pp. 161-167.

RITGER, P.L. and PEPPAS, N.A., 1987a. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of controlled release*, **5**(1), pp. 23-36.

RITGER, P.L. and PEPPAS, N.A., 1987b. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of controlled release*, **5**(1), pp. 37-42.

RIZK, T. and AWAAD, Y., 2013. Complications of intrathecal baclofen pump: Prevention and cure. *Journal of the neurological sciences*, **333**, pp. e577-e578.

ROBLEDO, T. and CÓRDOBA, R., 2005. *Cómo actuar ante el consumo de alcohol: guía de referencia para profesionales de atención primaria*. . Barcelona: Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria.

- ROBLES, C.F., MCMACKIN, M.Z., CAMPI, K.L., DOIG, I.E., TAKAHASHI, E.Y., PRIDE, M.C. and TRAINOR, B.C., 2014. Effects of kappa opioid receptors on conditioned place aversion and social interaction in males and females. *Behavioural brain research*, **262**, pp. 84-93.
- ROSE, J.H., KARKHANIS, A.N., CHEN, R., GIOIA, D., LOPEZ, M.F., BECKER, H.C., MCCOOL, B.A. and JONES, S.R., 2016. Supersensitive Kappa Opioid Receptors Promotes Ethanol Withdrawal-Related Behaviors and Reduce Dopamine Signaling in the Nucleus Accumbens. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, **19**(5), pp. pyv127.
- ROUSER, G., FLEISCHER, S. and YAMAMOTO, A., 1970. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, **5**(5), pp. 494-496.
- RUEL-GARIÉPY, E. and LEROUX, J., 2004. *In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems*. Netherlands: Elsevier B.V.
- RUYSSCHAERT, T., MARQUE, A., DUTEYRAT, J., LESIEUR, S., WINTERHALTER, M. and FOURNIER, D., 2005. Liposome retention in size exclusion chromatography. *BMC Biotechnology*, **5**(1), pp. 11.
- SABETI, B., NOORDIN, M.I., MOHD, S., HASHIM, R., DAHLAN, A. and AKBARI JAVAR, H., 2014. Development and Characterization of Liposomal Doxorubicin Hydrochloride with Palm Oil. *BioMed Research International*, **2014**, pp. 765426-6.
- SACKS, JEFFREY J., MD, MPH, GONZALES, K.R., MPH, BOUCHERY, E.E., MS, TOMEDI, LAURA E., PHD, MPH and BREWER, ROBERT D., MD, MSPH, 2015. 2010 National and State Costs of Excessive Alcohol Consumption. *American journal of preventive medicine*, **49**(5), pp. e73-e79.
- SALAMA, H.A., MAHMOUD, A.A., KAMEL, A.O., ABDEL HADY, M. and AWAD, G.A.S., 2012a. Brain delivery of olanzapine by intranasal administration of transfersomal vesicles. *Journal of liposome research*, **22**(4), pp. 336-345.
- SALAMA, H.A., MAHMOUD, A.A., KAMEL, A.O., ABDEL HADY, M. and AWAD, G.A.S., 2012b. Phospholipid based colloidal poloxamer–nanocubic vesicles for brain targeting via the nasal route. *Colloids and surfaces, B, Biointerfaces*, **100**, pp. 146-154.
- SAN, H., YANG, Z.Y., POMPILI, V.J., JAFFE, M.L., PLAUTZ, G.E., XU, L., FELGNER, J.H., WHEELER, C.J., FELGNER, P.L. and GAO, X., 1993. Safety and Short-Term Toxicity of a Novel Cationic Lipid Formulation for Human Gene Therapy. *Human gene therapy*, **4**(6), pp. 781-788.
- SANCHEZ-CATALAN, M.J., KAUFING, J., GEORGES, F., VEINANTE, P. and BARROT, M., 2014. The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience*, **282**, pp. 198-216.
- SÁNCHEZ-CATALÁN, M.J., HIPÓLITO, L., ZORNOZA, T., POLACHE, A. and GRANERO, L., 2009. Motor stimulant effects of ethanol and acetaldehyde injected into the posterior ventral tegmental area of rats: role of opioid receptors. *Psychopharmacologia*, **204**(4), pp. 641-653.

SANTIAGO, M. and WESTERINK, B., 1990. Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral microdialysis probes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, **342**(4), pp. 407-414.

SARAIVA, C., PRAÇA, C., FERREIRA, R., SANTOS, T., FERREIRA, L. and BERNARDINO, L., 2016. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, **235**, pp. 34-47.

SCHANK, J.R., GOLDSTEIN, A.L., ROWE, K.E., KING, C.E., MARUSICH, J.A., WILEY, J.L., CARROLL, F.I., THORSELL, A. and HEILIG, M., 2012. The kappa opioid receptor antagonist JDTC attenuates alcohol seeking and withdrawal anxiety. *Addiction biology*, **17**(3), pp. 634-647.

SCHIFFELERS, R.M., METSELAAR, J.M., FENS, M.H.A.M., JANSSEN, A.P.C.A., MOLEMA, G. and STORM, G., 2005a. Liposome-Encapsulated Prednisolone Phosphate Inhibits Growth of Established Tumors in Mice. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **7**(2), pp. 118-127.

SCHIFFELERS, R.M., METSELAAR, J.M., FENS, M.H.A.M., JANSSEN, A.P.C.A., MOLEMA, G. and STORM, G., 2005b. Liposome-Encapsulated Prednisolone Phosphate Inhibits Growth of Established Tumors in Mice. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **7**(2), pp. 118-127.

SCHINDLER, A., LI, S. and CHAVKIN, C., 2010. Behavioral Stress May Increase the Rewarding Valence of Cocaine-Associated Cues Through a Dynorphin -Opioid Receptor-Mediated Mechanism without Affecting Associative Learning or Memory Retrieval Mechanisms. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **35**(9), pp. 1932-1942.

SCHLOSBERG, J.E., WHITFIELD, J., Timothy W, PARK, P.E., CRAWFORD, E.F., GEORGE, O., VENDRUSCOLO, L.F. and KOOB, G.F., 2013. Long-Term Antagonism of κ Opioid Receptors Prevents Escalation of and Increased Motivation for Heroin Intake. *The Journal of neuroscience*, **33**(49), pp. 19384-19392.

SCHMOLKA, I.R., 1994. Physical basis for poloxamer interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **720**, pp. 92.

SCHWARZ, B. and MERKEL, O.M., 2019. Nose-to-brain delivery of biologics. *Therapeutic delivery*, **10**(4), pp. 207-210.

SCHWENDENER, R.A. and SCHOTT, H., 2017. Liposome Formulations of Hydrophobic Drugs. *Liposomes*. New York, NY: Springer New York, pp. 73-82.

SEMBA, K. and FIBIGER, H.C., 1992. Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: A retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *Journal of comparative neurology (1911)*, **323**(3), pp. 387-410.

SERCOMBE, L., VEERATI, T., MOHEIMANI, F., WU, S.Y., SOOD, A.K. and HUA, S., 2015. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, **6**, pp. 286.

SESACK, S.R. and PICKEL, V.M., 1992. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Journal of comparative neurology (1911)*, **320**(2), pp. 145-160.

SGOUROS, S., CHARALAMBIDES, C., MATSOTA, P., TSANGARIS, I. and KOSTOPANAGIOTOU, G., 2010. Malfunction of SynchroMed II Baclofen Pump Delivers a Near-Lethal Baclofen Overdose. *Pediatric neurosurgery*, **46**(1), pp. 62-65.

SHARIAT, S., BADIEE, A., JAAFARI, M.R. and MORTAZAVI, S.A., 2014. Optimization of a Method to Prepare Liposomes Containing HER2/Neu- Derived Peptide as a Vaccine Delivery System for Breast Cancer. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, **13**(Suppl), pp. 15-25.

SHELAR, S.B., DEY, A., GAWALI, S.L., DHINAKARAN, S., BARICK, K.C., BASU, M., UPPAL, S. and HASSAN, P.A., 2021. Spontaneous Formation of Cationic Vesicles in Aqueous DDAB-Lecithin Mixtures for Efficient Plasmid DNA Complexation and Gene Transfection. *ACS applied bio materials*, **4**(8), pp. 6005-6015.

SHIPPENBERG, T.S., ZAPATA, A. and CHEFER, V.I., 2007a. Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. *Pharmacology & therapeutics (Oxford)*, **116**(2), pp. 306-321.

SHIPPENBERG, T.S., ZAPATA, A. and CHEFER, V.I., 2007b. Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. *Pharmacology & therapeutics (Oxford)*, **116**(2), pp. 306-321.

SHIPPER, N.G.M., COOS VERHOEF, J. and MERKUS, F.W.H.M., 1991. The nasal mucociliary clearance: relevance to nasal drug delivery. *Pharmaceutical research*, **8**(7), pp. 807-814.

SIMONSON, B., MORANI, A.S., EWALD, A.W.M., WALKER, L., KUMAR, N., SIMPSON, D., MILLER, J.H., PRISINZANO, T.E. and KIVELL, B.M., 2015. Pharmacology and anti-addiction effects of the novel κ opioid receptor agonist Mesyl Sal B, a potent and long-acting analogue of salvinorin A. *British journal of pharmacology*, **172**(2), pp. 515-531.

SPANAGEL, R., ALMEIDA, O.F.X., BARTL, C. and SHIPPENBERG, T.S., 1994. Endogenous κ -opioid systems in opiate withdrawal: role in aversion and accompanying changes in mesolimbic dopamine release. *Psychopharmacologia*, **115**(1-2), pp. 121-127.

STAMEGNA, J., GIRARD, S.D., VERON, A., SICARD, G., KHRESTCHATISKY, M., FERON, F. and ROMAN, F.S., 2014. A unique method for the isolation of nasal olfactory stem cells in living rats. *Stem Cell Research*, **12**(3), pp. 673-679.

SUNAMOTO, J. and IWAMOTO, K., 1986. Protein-coated and polysaccharide-coated liposomes as drug carriers. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, **2**(2), pp. 117-136.

SVINGOS, A.L., CHAVKIN, C., COLAGO, E.E.O. and PICKEL, V.M., 2001a. Major coexpression of κ -opioid receptors and the dopamine transporter in nucleus accumbens axonal profiles. *Synapse (New York, N.Y.)*, **42**(3), pp. 185-192.

SVINGOS, A.L., CHAVKIN, C., COLAGO, E.E.O. and PICKEL, V.M., 2001b. Major coexpression of κ -opioid receptors and the dopamine transporter in nucleus accumbens axonal profiles. *Synapse (New York, N.Y.)*, **42**(3), pp. 185-192.

SWANSON, L.W., 1982. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain research bulletin*, **9**(1), pp. 321-353.

SZMUSZKOVICZ, J., U-50,488 and the κ receptor: A personalized account covering the period 1973 to 1990. *Progress in Drug Research*, , pp. 167-195.

SZOKA, F., OLSON, F., HEATH, T., VAIL, W., MAYHEW, E. and PAPAHA DJOPOULOS, D., 1980. Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1–0.2 μm) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et biophysica acta*, **601**(3), pp. 559-571.

TAMAM, H., PARK, J., GADALLA, H.H., MASTERS, A.R., ABDEL-ALEEM, J.A., ABDELRAHMAN, S.I., ABDELRAHMAN, A.A., LYLE, L.T. and YEO, Y., 2019. Development of Liposomal Gemcitabine with High Drug Loading Capacity. *Molecular pharmaceutics*, **16**(7), pp. 2858-2871.

TEJEDA, H.A. and BONCI, A., 2019. Dynorphin/kappa-opioid receptor control of dopamine dynamics: Implications for negative affective states and psychiatric disorders. *Brain research*, **1713**, pp. 91-101.

TEJEDA, H.A., NATIVIDAD, L.A., ORFILA, J.E., TORRES, O.V. and O'DELL, L.E., 2012. Dysregulation of kappa-opioid receptor systems by chronic nicotine modulate the nicotine withdrawal syndrome in an age-dependent manner. *Psychopharmacologia*, **224**(2), pp. 289-301.

TELEANU, D.M., CHIRCOV, C., GRUMEZESCU, A.M., VOLCEANOV, A. and TELEANU, R.I., 2018. Impact of Nanoparticles on Brain Health: An Up to Date Overview. *Journal of Clinical Medicine*, **7**(12), pp. 490.

THOMPSON, A.C., ZAPATA, A., JUSTICE, J., J B, VAUGHAN, R.A., SHARPE, L.G. and SHIPPENBERG, T.S., 2000. κ -Opioid Receptor Activation Modifies Dopamine Uptake in the Nucleus Accumbens and Opposes the Effects of Cocaine. *The Journal of neuroscience*, **20**(24), pp. 9333-9340.

THORNE, R.G., PRONK, G.J., PADMANABHAN, V. and FREY, W.H., 2004. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, **127**(2), pp. 481-496.

TIAN, C. and CHIU, C., 2018. Importance of Hydrophilic Groups on Modulating the Structural, Mechanical, and Interfacial Properties of Bilayers: A Comparative Molecular Dynamics Study of Phosphatidylcholine and Ion Pair Amphiphile Membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(6), pp. 1552.

TODTENKOPF, M., MARCUS, J., PORTOGHESE, P. and CARLEZON, W., 2004. Effects of [κ]-opioid receptor ligands on intracranial self-stimulation in rats. *Psychopharmacology*, **172**(4), pp. 463.

TØNNESEN, J., INAVALLI, V.V.G.K. and NÄGERL, U.V., 2018. Super-Resolution Imaging of the Extracellular Space in Living Brain Tissue. *Cell*, **172**(5), pp. 1108-1121.e15.

UNGLESS, M.A. and GRACE, A.A., 2012. Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends in neurosciences (Regular ed.)*, **35**(7), pp. 422-430.

UR-REHMAN, T., TAVELIN, S. and GRÖBNER, G., 2011. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *International journal of pharmaceutics*, **409**(1), pp. 19-29.

VAAGE, J., DONOVAN, D., MAYHEW, E., ABRA, R. and HUANG, A., 1993. Therapy of human ovarian carcinoma xenografts using doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *Cancer*, **72**(12), pp. 3671-3675.

VALDEZ, G.R. and HARSHBERGER, E., 2012. Kappa opioid regulation of anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, **102**(1), pp. 44-47.

VALENZA, M., BUTELMAN, E.R. and KREEK, M.J., 2017. Effects of the novel relatively short-acting kappa opioid receptor antagonist LY2444296 in behaviors observed after chronic extended-access cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, **234**(15), pp. 2219-2231.

VAN BOCKSTAELE, E.J. and PICKEL, V.M., 1995. GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain research*, **682**(1), pp. 215-221.

VAN VELTHOVEN, C.T.J., KAVELAARS, A., VAN BEL, F. and HEIJNEN, C.J., 2010. Nasal administration of stem cells: a promising novel route to treat neonatal ischemic brain damage. *Pediatric research*, **68**(5), pp. 419-422.

VAN WOENSEL, M., WAUTHOZ, N., ROSIÈRE, R., AMIGHI, K., MATHIEU, V., LEFRANC, F., VAN GOOL, S.W. and DE VLEESCHOUWER, S., 2013. Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM? *Cancers*, **5**(3), pp. 1020-1048.

VENDRUSCOLO, L.F., BARBIER, E., SCHLOSBERG, J.E., MISRA, K.K., WHITFIELD, J., Timothy W, LOGRIP, M.L., RIVIER, C., REPUNTE-CANONIGO, V., ZORRILLA, E.P., SANNA, P.P., HEILIG, M. and KOOB, G.F., 2012. Corticosteroid-Dependent Plasticity Mediates Compulsive Alcohol Drinking in Rats. *The Journal of neuroscience*, **32**(22), pp. 7563-7571.

VERMA, D.D., VERMA, S., BLUME, G. and FAHR, A., 2003. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International journal of pharmaceutics*, **258**(1), pp. 141-151.

VOLODKIN, D., MOHWALD, H., VOEGEL, J. and BALL, V., 2007. Coating of negatively charged liposomes by polylysine: Drug release study. *Journal of controlled release*, **117**(1), pp. 111-120.

- WALKER, B.M. and KOOB, G.F., 2008. Pharmacological Evidence for a Motivational Role of κ -Opioid Systems in Ethanol Dependence. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **33**(3), pp. 643-652.
- WERLING, L.L., FRATTALI, A., PORTOGHESE, P.S., TAKEMORI, A.E. and COX, B.M., 1988. Kappa receptor regulation of dopamine release from striatum and cortex of rats and guinea pigs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **246**(1), pp. 282-286.
- WITTMANN, W., SCHUNK, E., ROSSKOTHEN, I., GABURRO, S., SINGEWALD, N., HERZOG, H. and SCHWARZER, C., 2009. Prodynorphin-Derived Peptides Are Critical Modulators of Anxiety and Regulate Neurochemistry and Corticosterone. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)*, **34**(3), pp. 775-785.
- WOLAK, D.J. and THORNE, R.G., 2013. Diffusion of Macromolecules in the Brain: Implications for Drug Delivery. *Molecular pharmaceutics*, **10**(5), pp. 1492-1504.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. *Global status report on alcohol and health 2018*. Geneva: World Health Organization.
- WU, H., YU, M., MIAO, Y., HE, S., DAI, Z., SONG, W., LIU, Y., SONG, S., AHMAD, E., WANG, D. and GAN, Y., 2019. Cholesterol-tuned liposomal membrane rigidity directs tumor penetration and anti-tumor effect. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, **9**(4), pp. 858-870.
- WU, H., HU, K. and JIANG, X., 2008. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs. *Expert opinion on drug delivery*, **5**(10), pp. 1159-1168.
- WU, I.Y., BALA, S., ŠKALKO-BASNET, N. and DI CAGNO, M.P., 2019. Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. *European journal of pharmaceutical sciences*, **138**, pp. 105026.
- XU, X., KHAN, M.A. and BURGESS, D.J., 2012. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *International journal of pharmaceutics*, **423**(2), pp. 410-418.
- XUAN, J., BALAKRISHNAN, P., OH, D.H., YEO, W.H., PARK, S.M., YONG, C.S. and CHOI, H., 2010. Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam. *International journal of pharmaceutics*, **395**(1), pp. 317-323.
- YANG, M., LAI, S.K., WANG, Y., ZHONG, W., HAPPE, C., ZHANG, M., FU, J. and HANES, J., 2011. Biodegradable Nanoparticles Composed Entirely of Safe Materials that Rapidly Penetrate Human Mucus. *Angewandte Chemie (International ed.)*, **50**(11), pp. 2597-2600.
- ZAMIR, N., WEBER, E., PALKOVITS, M. and BROWNSTEIN, M., 1984. Differential Processing of Prodynorphin and Proenkephalin in Specific Regions of the Rat Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, **81**(21), pp. 6886-6889.

ZHANG, K., SHI, X., LIN, X., YAO, C., SHEN, L. and FENG, Y., 2015. Poloxamer-based in situ hydrogels for controlled delivery of hydrophilic macromolecules after intramuscular injection in rats. *Drug delivery*, **22**(3), pp. 375-382.

ZHANG, S., TONG, Y., TIAN, M., DEHAVEN, R.N., CORTESBURGOS, L., MANSSON, E., SIMONIN, F., KIEFFER, B. and YU, L., 1998. Dynorphin A as a Potential Endogenous Ligand for Four Members of the Opioid Receptor Gene Family. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **286**(1), pp. 136-141.

ZHANG, T.A., PLACZEK, A.N. and DANI, J.A., 2010. In vitro identification and electrophysiological characterization of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology*, **59**(6), pp. 431-436.

ZHOU, Y., COLOMBO, G., GESSA, G.L. and KREEK, M.J., 2013. Effects of voluntary alcohol drinking on corticotropin-releasing factor and preprodynorphin mRNA levels in the central amygdala of Sardinian alcohol-preferring rats. *Neuroscience letters*, **554**, pp. 110-114.

ZIMMER, A., VALJENT, E., KONIG, M., ZIMMER, A.M., ROBLEDO, P., HAHN, H., VALVERDE, O. and MALDONADO, R., 2001. Absence of Delta -9-Tetrahydrocannabinol Dysphoric Effects in Dynorphin-Deficient Mice. *The Journal of neuroscience*, **21**(23), pp. 9499-9505.