



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Estrategias terapéuticas basadas en micro y nanoemulsiones para el tratamiento del Alzheimer y enfermedades inflamatorias de la piel

Lupe Carolina Espinoza Tituana



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS
DE LA ALIMENTACIÓN**

**Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica, y Físicoquímica**

**Estrategias terapéuticas basadas en micro y
nanoemulsiones para el tratamiento del Alzheimer
y enfermedades inflamatorias de la piel**

LUPE CAROLINA ESPINOZA TITUANA

2020



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y Físicoquímica

**Estrategias terapéuticas basadas en micro y nanoemulsiones para el
tratamiento del Alzheimer y enfermedades inflamatorias de la piel**

LUPE CAROLINA ESPINOZA TITUANA

2020

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO:
INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL DE MEDICAMENTOS

**Estrategias terapéuticas basadas en micro y nanoemulsiones para el
tratamiento del Alzheimer y enfermedades inflamatorias de la piel**

Memoria presentada por Lupe Carolina Espinoza Tituana, para optar al título de
doctor por la Universidad de Barcelona

Directores de Tesis:

Ana Cristina Calpena Campmany

Beatriz Clares Naveros

Doctoranda:

Tutora:

Lupe Carolina Espinoza Tituana

Ana Cristina Calpena Campmany

LUPE CAROLINA ESPINOZA TITUANA

2020

*A los grandes amores de mi vida Jonathan y Samuel,
quienes han sido mi fuerza e inspiración durante
estos años de trabajo.*

AGRADECIMIENTOS

Después de cuatro años de arduo trabajo, al fin se acerca el día de ver cumplida una de las grandes metas de mi vida. Ha sido una etapa enriquecedora a nivel personal y profesional, y a pesar de las dificultades, obstáculos y frustraciones he tenido la dicha de sentirme enormemente bendecida por Dios, que me ha brindado salud, fortaleza y ha puesto en mi camino a personas valiosas que han marcado mi vida y me han apoyado durante este recorrido de formación profesional, a quienes deseo honrar y extender mis sentimientos de gratitud:

A la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) - Ecuador, que a través de sus programas de becas ha financiado mis estudios de doctorado. Estoy orgullosa de haber sido parte de esta iniciativa que busca mejorar la calidad académica y científica de mi país.

A mis directoras de tesis, Dra. Ana Calpena y Dra. Beatriz Clares, quienes han compartido sus experiencias y conocimientos para llevar a cabo este trabajo. De manera especial, gracias a mi mentora Dra. Ana Calpena, que además de guiar este trabajo se ha convertido en una amiga y un referente a seguir en mi carrera como docente.

A los profesionales de las diferentes áreas que colaboraron en esta investigación: Marcelle Silva-Abreu, Lida Halbaut, M. José Rodríguez, M. José Fábrega, M. Alexandra Cañas, M. Luisa Garduño, Rodrigo Vera, Óscar Domènech, M. Luisa García, Marisol Vacacela y Josefa Badía. Mi gratitud a ustedes por un verdadero trabajo en equipo.

A la Universidad Técnica Particular de Loja – Ecuador, por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo y facilitar mis estancias en el extranjero. En especial, gracias a mis compañeros Vladimir y Santiago por sus muestras de apoyo desde que inició este gran sueño.

A mi esposo y compañero de vida Jonathan, por su amor, dedicación y apoyo incondicional. Todo mi amor y sincera gratitud por sus palabras de aliento en los

momentos de debilidad, por encargarse del hogar en mi ausencia, por creer en mí e involucrarse en mi trabajo con la revisión del idioma en todas las publicaciones.

A mi hijo Samuel, que desde que llegó a mi vida me ha inspirado a ser una mejor persona. Gracias por su paciencia, alegría y optimismo, por adaptarse sin reproches a los cambios en su rutina durante cada una de mis estancias en el extranjero. Estar separados ha sido un reto, pero su madurez y buen comportamiento ha hecho todo más fácil.

Mi eterna gratitud a mi madre Esperanza que con sus oraciones me ha acompañado en este difícil y largo camino, a mi padre Darwin (†) de quien guardo lo mejor de su esencia y enseñanzas, a mis hermanos: Gabriela, Waldemar y Mario que me han ayudado y aliviado el trabajo con mi hijo.

A mis suegros Elizabeth y Joseph y a mi cuñada Janine, para mí es un honor formar parte de la familia Proctor. Gracias por apoyar a nuestro futuro y hacer posible que, a pesar de la difícil situación del 2020, nosotros podamos gozar de un hogar cómodo y seguro en el que he podido escribir con tranquilidad mi memoria doctoral.

A mis amigos que han hecho más agradable esta experiencia: Marcelle, Faviola, Lilian, María, Merce, Karito, Diana, Elizabeth y Paulo, con quienes he compartido momentos inolvidables, viajes, conocimientos, risas y frustraciones. Gracias por permitirme crecer juntos a ustedes y hacer más llevadero el tiempo lejos de casa.

Mi aprecio y gratitud a todos ustedes que directa o indirectamente han contribuido a culminar esta etapa de mi vida.

Carolina Espinoza

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. ALZHEIMER.....	3
1.1.1. Aspectos clínicos de la EA	3
1.1.2. Etiología y aspectos neuropatológicos de la EA	4
1.1.3. Diagnóstico de la EA.....	7
1.1.4. Tratamientos para la EA	7
1.1.5. Obstáculos y estrategias para el suministro de fármacos al cerebro.	10
1.2. VÍA INTRANASAL	12
1.2.1. Anatomía de la nariz.....	13
1.2.2. Ventajas y desventajas de la administración intranasal.....	15
1.2.3. Mecanismos de transporte de fármacos desde la nariz al cerebro	16
1.2.4. Factores que influyen en el transporte de fármacos al cerebro a través de la vía nasal.....	20
1.3. PIEL.....	24
1.3.1. Estructura y función	24
1.3.2. Suministro de fármacos a través de la piel: Ventajas y desventajas .	27
1.3.3. Mecanismos para la permeación de fármacos a través de la piel.....	28
1.3.4. Factores que influyen en la permeación de los fármacos	31
1.4. ENFERMEDADES INFLAMATORIAS DE LA PIEL.....	34
1.4.1. Dermatitis atópica.....	35
1.4.2. Perspectivas terapéuticas de la pioglitazona en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.....	40
1.5. MICROEMULSIONES Y NANOEMULSIONES.....	43
1.5.1. Composición de las MEs y NEs.....	44
1.5.2. Preparación de MEs	48
1.5.3. Preparación de NEs	49
1.5.4. Caracterización de micro y nanoemulsiones	53

2. OBJETIVOS	59
2.1. Objetivo General.....	59
2.2. Objetivos específicos	59
3. RESULTADOS.....	63
3.1. Artículo 1	65
3.2. Artículo 2	79
3.3. Artículo 3	97
3.4. Artículo 4	113
4. DISCUSIÓN.....	135
4.1. MEs y NEs para el tratamiento del Alzheimer.....	135
4.2. NEs para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.	136
4.3. Diseño y caracterización fisicoquímica de las MEs y NEs	136
4.4. Caracterización biofarmacéutica.....	141
4.5. Estudios de tolerancia.....	144
4.6. Estudios de eficacia	145
5. CONCLUSIONES	153
6. REFERENCIAS	159

Abreviaturas

EA: Enfermedad de Alzheimer

APP: Proteína precursora del amiloide

LCR: Líquido cefalorraquídeo

ACh: Acetilcolina

NMDA: Receptor de N-metil-D-aspartato

ROS. Especies reactivas del oxígeno

EDI: Enzima degradante de la insulina

MMSE: Mini-examen del estado mental

ACE-R: Addenbrooke's Cognitive Examination-Revised

TEP: Tomografía por Emisión de Positrones

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos

AChE: Acetilcolinesterasa

BuChE: Butirilcolinesterasa

DPZ: Donepezilo

SNC: Sistema nervioso central

BHE: Barrera hematoencefálica

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

IL: Interleucina

Th: Células T auxiliares

TEWL: Pérdida de agua transepidérmica

TSL: Linfopoyetina estromal tímica

CLI2: Células linfoides innatas tipo

PGZ: Pioglitazona

PPAR- γ : Receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas

BCS: Sistema de clasificación biofarmacéutica

DMF: N,N-dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

NF-K β : Factor de transcripción nuclear kappa B

AP-1: Proteína activadora 1

MEs: Microemulsiones

NE: Nanoemulsiones
w/o: Sistema agua en aceite
o/w: Sistema aceite en agua
HLB: Equilibrio hidrofílico-lipofílico
DLS: Dispersión dinámica de la luz
TEM: Microscopía electrónica de transmisión
SEM: Microscopía electrónica de barrido
AFM: Microscopía de fuerza atómica
DSC: Calorimetría diferencial de barrido
RMN: Resonancia magnética nuclear
SAXS: Dispersión de rayos X de ángulo pequeño
 Q_{ret} : Fármaco retenido en tejido
 J_{ss} : Tasa de flujo
 K_p : Coeficiente de permeación
 C_{ss} : Concentración plasmática teórica en estado estacionario
 T_L : Lag time
SCH: Hidratación del estrato córneo
TPA: 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol
AA: Ácido araquidónico
ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ALZHEIMER

La enfermedad Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo irreversible e incurable que presenta trastornos cognitivos y funcionales, así como pérdida de independencia funcional y cambios de comportamiento. Esta enfermedad es la forma más común de demencia, representando entre un 60 y 70% de los casos [1]. Según datos publicados por la Organización Mundial de la Salud la demencia es un síndrome que afecta a nivel mundial a 50 millones de personas. La prevalencia de la EA incrementa con la edad y afecta al 10% de las personas mayores de 65 años y al 50% de las personas mayores de 85 años. Se espera que la cantidad de personas con EA alcance los 131 millones en todo el mundo para el año 2050 [1, 2].

La EA es un trastorno multifactorial en el que las alteraciones de proteínas, el estrés oxidativo, la neuroinflamación, la desregulación inmune, el deterioro de la comunicación neuronal-glial y los agentes neurotóxicos aparecen entre los factores que desencadenan la degeneración neuronal, y el equilibrio de éstos puede variar de un paciente a otro [3].

1.1.1. Aspectos clínicos de la EA

Los síntomas cognitivos de la EA incluyen principalmente déficits en la memoria a corto plazo, apraxia y disfunción visoespacial y ejecutiva.

La EA progresa lentamente y se pueden identificar tres etapas clínicas: leve, moderada y severa, que existen junto con los procesos habituales de envejecimiento. La EA se caracteriza por un inicio insidioso en un estado de conciencia clara, y por problemas de memoria. Una pérdida de memoria a corto plazo es el síntoma incipiente más típico [2, 4]. Durante el curso de la enfermedad, se agregan gradualmente varios cambios a los síntomas iniciales, tales como alteración de otros dominios cognitivos

(lenguaje, funciones ejecutivas y visoespaciales), y finalmente el desarrollo de diversas manifestaciones conductuales junto con actividades diarias deterioradas [5].

1.1.2. Etiología y aspectos neuropatológicos de la EA

La patología específica para la EA incluye placas neuríticas, también llamadas placas seniles o placas amiloides, ovillos neurofibrilares, pérdida de sinapsis neuronales, activación microglial y pérdida de neuronas piramidales en el cerebro [2, 6]. Las placas amiloides se definen como depósitos extracelulares de la proteína β -amiloide que aparecen en los espacios interneuronales de la sustancia gris del cerebro. Esta proteína se forma por una escisión anómala de la proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en inglés) [7]. Normalmente la APP se escinde por la α -secretasa y la γ -secretasa formando péptidos solubles, pero cuando la APP es escindida por parte de enzima β -secretasa, los fragmentos formados son insolubles y dan lugar al monómero llamado β -amiloide que la neurona excreta a su exterior. Las células de la glía intentan eliminar el β -amiloide, generándose un proceso inflamatorio que, junto con el propio efecto tóxico del β -amiloide, contribuye a lesionar a las neuronas, altera la señalización neuronal y conduce al deterioro de la función cerebral [7, 8]. Por otro lado, los ovillos neurofibrilares corresponden a agregados intraneuronales compuestos de proteína tau anormalmente fosforilada. La proteína tau cumple un rol importante en el citoesqueleto de las neuronas, estabilizando los microtúbulos y manteniendo la forma celular. Las placas presentes fuera de la célula inician las vías neuronales que conducen a la activación de la quinasa y la transferencia de fosfato. Esto conduce al cambio en la forma de la proteína tau afectando su función biológica normal y dando lugar a la formación de los ovillos neurofibrilares que conduce a apoptosis neuronal y provoca grandes cambios en el funcionamiento del cerebro [9].

A pesar del gran número de investigaciones, la etiología de la enfermedad aún no está totalmente clara, pero se sugiere que la EA es más que solo un trastorno cerebral neurodegenerativo, ya que involucra una serie de alteraciones sistémicas provocadas por mecanismos inflamatorios, metabólicos, oxidativos y otros mecanismos bioquímicos [2]. Durante las últimas décadas se han postulado varias

hipótesis para explicar el origen y la patogénesis de la EA, algunas de las cuales se describen a continuación:

Hipótesis de la “cascada amiloide”: Establece que la neurodegeneración en la EA es causada por la acumulación anormal de placas de β -amiloide en varias áreas del cerebro [10]. Según esta hipótesis este proceso patogénico comienza debido a mutaciones en la APP o debido a otras mutaciones y factores ambientales. La acumulación de placas β -amiloide actúa como un desencadenante patológico de una cascada que incluye alteración de la neurotransmisión sináptica (por ejemplo, neurotransmisión colinérgica), daño neurítico, alteraciones metabólicas intracelulares que conducen a la hiperfosforilación de proteínas tau [10, 11].

Hipótesis tau: Se basa en el concepto de que la hiperfosforilación de tau constituye una vía común final en la patogénesis de la EA. Las proteínas tau se encuentran principalmente en las neuronas y pertenecen a la familia de las proteínas asociadas a los microtúbulos [3]. La fosforilación de la proteína tau está regulada en el desarrollo desde la etapa fetal a la adulta. La pérdida de la función tau normal conduce a una alteración patológica en las funciones estructurales y reguladoras del citoesqueleto, que afectan las funciones celulares normales de las neuronas, como el mantenimiento de la morfología apropiada, el transporte axonal, la disfunción sináptica y la neurodegeneración. Los diversos eventos patogénicos contribuyen a la hiperfosforilación, el plegamiento erróneo y la agregación de tau [12]. Las observaciones clínicas en pacientes con EA, han mostrado que la gravedad de este tipo de demencia se correlaciona con la acumulación creciente de ovillos neurofibrilares en el cerebro, así como se ha observado una alta correlación entre las especies de tau hiperfosforiladas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el grado de deterioro cognitivo [3].

Hipótesis colinérgica: Fue la primera teoría propuesta para explicar la EA. Esta teoría se basó en el hallazgo de múltiples estudios que han sugerido un papel importante de la acetilcolina (ACh) en el aprendizaje y la memoria. La investigación bioquímica de tejidos de biopsias y tejidos cerebrales post mortem de pacientes

con EA ha mostrado una actividad reducida de la colina acetiltransferasa, así como en la síntesis y liberación de acetilcolina [13]. Estas notables observaciones sugieren que la degeneración de las neuronas colinérgicas y la subsecuente pérdida de neurotransmisión colinérgica en la corteza cerebral y otras áreas contribuyen significativamente al deterioro de las funciones cognitivas en la EA [10].

Hipótesis de excitotoxicidad o del glutamato: El receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) es esencial para controlar la plasticidad sináptica y la función de la memoria. Se activa cuando el glutamato y la glicina se unen a él, permitiendo la entrada de Ca^{2+} y Na^+ . La hiperexcitabilidad de los receptores NMDA puede inducir sobrecarga de Ca^{2+} , desencadenando excitotoxicidad y eventualmente la muerte celular [14].

Hipótesis de la cascada mitocondrial: Existe evidencia creciente que sugiere que un metabolismo energético defectuoso en las mitocondrias podría contribuir a la patogénesis de la EA. Las mutaciones genéticas que alteran la regulación de las enzimas de la cadena de transporte de electrones son capaces de generar especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés); que conduce a la apoptosis celular y la neurodegeneración [14, 15].

Estrés oxidativo: Se sugiere que ROS y radicales libres cumplen un papel crítico en la patogénesis de la EA [16]. El aumento de los niveles de ROS y radicales libres como resultado del estrés oxidativo puede causar daño neuronal en personas con EA, posiblemente a través del desarrollo de ovillos neurofibrilares en las neuronas de sus cerebros. Tanto ROS como los radicales libres facilitan el desarrollo de placas amiloides y varias otras patologías neuronales [17, 18]. Los dos metales activos redox, Fe^{2+} y Cu^{2+} , han sido reportados como la principal fuente de ROS en el cerebro [18, 19].

Alteración del metabolismo de la glucosa: Se basa en los hallazgos reportados en diferentes investigaciones, en las cuales se ha encontrado una asociación directa entre la demencia y la glucemia [20]. Se asume que la señalización de insulina en

el hipocampo contribuye a los procesos de aprendizaje y memoria en el cerebro humano mientras que una señalización reducida de insulina cerebral puede provocar efectos defectuosos generalizados en el metabolismo cerebral. La señalización de insulina estimula la absorción de glucosa en el cerebro y también induce la enzima degradante de la insulina (EDI) para su propia degradación, la cual además de degradar la insulina degrada también la proteína β -amiloide en el cerebro [21]. Por lo tanto, la resistencia a la insulina y la disminución de la señalización de la insulina en el cerebro pueden atenuar la degradación de la proteína β -amiloide dependiente de EDI, lo que lleva a su acumulación. Sin embargo, el mecanismo de estos efectos que conducen a la disfunción sináptica y la muerte neuronal aún no se ha dilucidado totalmente [18, 22].

1.1.3. Diagnóstico de la EA

El proceso de diagnóstico comienza con el historial médico del paciente, examen físico y las pruebas cognitivas de cabecera. El cribado adicional de criterios de inclusión y exclusión para el diagnóstico de la EA incluye estudios de laboratorio para descartar problemas metabólicos o insuficiencia de vitamina B12, pruebas neuropsicológicas y pruebas de biomarcadores cuando sea necesario [23]. Las pruebas neuropsicológicas ampliamente utilizadas, como el mini-examen del estado mental (MMSE, por sus siglas en inglés) o del Addenbrooke's Cognitive Examination-Revised (ACE-R) no son suficientes en la fase temprana de la EA y, por lo general, proporcionan resultados negativos. Los métodos clínicos avanzados como la neuroimagen con exploración mediante Tomografía por Emisión de Positrones (TEP) en combinación con una resonancia magnética y un análisis de proteínas del LCR (β -amiloide, tau total, fosfo-tau) resultan de gran utilidad para el diagnóstico de la EA [2, 24].

1.1.4. Tratamientos para la EA

Actualmente, no existe una cura eficiente capaz de reducir la progresión de la enfermedad. Los tratamientos disponibles comercialmente son sintomáticos,

dirigidos a mejorar la función cognitiva a través de dos formas de acción: agonismo del sistema colinérgico y antagonismo del receptor NMDA [25].

La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aprobado tres inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE, por sus siglas en inglés) que han mostrado efectos beneficiosos sobre los síntomas cognitivos, funcionales y conductuales en la EA de leve a moderada [26]. Estos fármacos incluyen al *donepezilo*, derivado de piperidina que puede inhibir de forma no competitiva y reversible la AChE; *rivastigmina*, derivado de carbamato que inhibe la AChE y la butirilcolinesterasa (BuChE, por sus siglas en inglés); y *galantamina*, agente alcaloide terciario que actúa como inhibidor reversible de AChE, pero se une a la enzima de manera competitiva, además se une alostéricamente a los receptores nicotínicos de acetilcolina para mejorar aún más la función colinérgica [27, 28]. No se han revelado diferencias significativas con respecto a la eficacia entre los tres inhibidores de AChE, sin embargo, el donepezilo es el más recetado, ya que se asocia con menos efectos adversos [29]. Por otro lado, un fármaco aprobado que se basa en la hipótesis de excitotoxicidad es la memantina, que corresponde a un antagonista no competitivo y de afinidad moderada del receptor NMDA con fuerte dependencia del voltaje y cinética rápida. Este fármaco actúa sobre la vía del glutamato restableciendo la neurotransmisión glutamatérgica fisiológica y ha sido aprobado para tratar la EA de grado moderado a severo [30].

1.1.4.1. Donepezilo

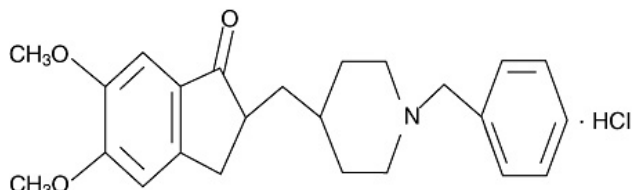


Figura 1. Estructura molecular del donepezilo [31]

El clorhidrato de donepezilo (DPZ) es un inhibidor reversible de la enzima AChE. Su denominación química es clorhidrato de (\pm)-2,3-dihidro-5,6-dimetoxi-2-[[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]metil]-1H-inden-1-ona, tiene una fórmula molecular de $C_{24}H_{29}NO_3 \cdot HCl$ y un peso molecular de 415.96. (Figura 1) DPZ fue aprobado por la FDA para su uso en el tratamiento de la EA en noviembre de 1996 en forma de comprimidos de liberación inmediata de 5 y 10 mg para administración oral. Este fármaco también está disponible en forma de comprimidos de desintegración oral de 5 o 10 mg desde el 2004. Finalmente, en el 2010 la FDA aprobó comprimidos de liberación prolongada que contienen 23 mg de DPZ para proporcionar una dosis más alta una vez al día, evitando un fuerte aumento diario en la concentración máxima [32]. Las formulaciones orales con dosis de 5 y 10 mg de DPZ son utilizadas para el tratamiento de la EA de leve a moderado, mientras que dosis de 10 y 23 mg se usan para tratamiento de la EA de moderado a severo. Es recomendado empezar con dosis de 5 mg al día durante las primeras 4 a 6 semanas y de 10 mg al día a partir de entonces. Las dosis de 23 mg al día se usan una vez que los pacientes hayan recibido las dosis de 10 mg diarias durante al menos 3 meses [33].

Basado en la hipótesis colinérgica, la acción farmacológica del DPZ es inhibir selectivamente la enzima AChE, responsable de descomponer la acetilcolina en acetato y colina en la hendidura sináptica [34]. El DPZ se une a la enzima AChE a través de enlaces de hidrógeno fácilmente hidrolizables por lo que la inhibición de la enzima es reversible, además actúa como un inhibidor no competitivo con una selectividad mucho mayor para AChE que para BuChE (IC_{50} AChE/ IC_{50} BuChE = 6.7/7400 nM) [31, 32].

Después de la administración oral, las concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) de DPZ se alcanzan después de 3 a 5 horas para comprimidos de liberación inmediata de 5 y 10 mg, y 6 h para comprimidos de liberación sostenida de 23 mg. DPZ se une en un 93% a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina [29, 35]. El fármaco exhibe propiedades cinéticas lineales con una vida media de eliminación prolongada ($t_{1/2}$) de 70 h, lo que indica que la administración una vez al día es apropiada. Las condiciones de estado estacionario se alcanzan dentro de 2-3 semanas

[29]. El DPZ se metaboliza hepáticamente por las enzimas citocromo P450 (CYP) 3A4 y 2D6, y la vía renal constituye la ruta principal de eliminación del fármaco original y los metabolitos [36].

Aunque, su acción principal es aumentar la transmisión colinérgica, estudios han informado otros mecanismos del DPZ para el tratamiento de la EA, tales como, disminución de la toxicidad neuronal causada por la proteína β -amiloide [37], sobre-regulación o inhibición de la pérdida de los receptores nicotínicos [38], reducción de la neurotoxicidad inducida por glutamato [39], y supresión del estrés oxidativo [40].

1.1.5. Obstáculos y estrategias para el suministro de fármacos al cerebro.

A pesar de los enormes esfuerzos llevados a cabo para encontrar mejores terapias para tratar enfermedades del sistema nervioso central (SNC), el tratamiento de éstas se ha visto limitado por la incapacidad de la mayoría de los fármacos neuroactivos para alcanzar los compartimientos del SNC en cantidades suficientes. Muchos medicamentos potenciales, a pesar de ser efectivos en el sitio de acción deseable, han sido descartados a través de estudios clínicos debido a la entrada limitada al parénquima cerebral, ya que es necesario superar varias barreras para proporcionar una respuesta farmacológica [41, 42].

La barrera hematoencefálica (BHE) constituye el principal obstáculo para el transporte de agentes terapéuticos al cerebro. La BHE consiste en un sistema especializado de células endoteliales que rodean los capilares sanguíneos cerebrales y evita la entrada de sustancias nocivas desde la circulación sistémica al cerebro. La BHE contiene múltiples transportadores endógenos que permiten el paso de nutrientes y minerales esenciales, al tiempo que limita la entrada de sustancias extrañas como los fármacos [18, 43], actuando, así como una barrera de membrana semipermeable que impide selectivamente el paso de ciertas sustancias al intersticio cerebral. Esta característica esencial para mantener la homeostasis del SNC se debe a ciertas propiedades físicas de la BHE que incluyen las uniones estrechas, la ausencia de hendiduras intercelulares, menor actividad pinocítica, endotelio no fenestrado,

membrana basal continua, muchas mitocondrias, resistencia eléctrica elevada y sitios aniónicos en la membrana luminal [44].

Las propiedades fisicoquímicas de los medicamentos (como el peso molecular y la lipofilia) determinan el grado en que pueden cruzar la BHE. En general, los compuestos con bajo peso molecular (< a 400 Da) que no están ionizados a pH fisiológico y que son lipófilos pueden atravesar la BHE por mecanismos de difusión [18].

Al mismo tiempo, el metabolismo de primer paso, así como la degradación enzimática (administración oral) y el aclaramiento sistémico (en la vía oral y parenteral) también reducen significativamente la biodisponibilidad del fármaco [45].

Los obstáculos impuestos por los mecanismos de protección del cerebro junto con la unión del fármaco a proteínas plasmáticas, el volumen de distribución, el retraso en el suministro de fármacos al cerebro a través de la sangre y los efectos secundarios han alentado el desarrollo de diversas estrategias para superar estos obstáculos y aumentar la biodisponibilidad y el suministro de los agentes terapéuticos en el cerebro [46]. Algunas de estas estrategias son invasivas, como la vía intratecal, sin embargo, más recientemente, el suministro de medicamentos intranasales se ha reconocido como una alternativa no invasiva y confiable para el suministro de medicamentos al SNC [47].

1.2. VÍA INTRANASAL

En humanos y otras especies animales, las funciones principales de la cavidad nasal son la respiración y el olfato; También proporciona una importante actividad protectora al filtrar, calentar y humedecer el aire inhalado antes de llegar a las vías respiratorias inferiores con la ayuda de la capa de moco y las vellosidades, que cubren la parte interna de la cavidad nasal atrapando las partículas inhaladas y los agentes patógenos. Dentro de la cavidad nasal, se pueden diferenciar dos mitades separadas por el tabique nasal, que se extiende posteriormente a la nasofaringe [48, 49].

Tradicionalmente, la ruta nasal ha sido usada para el suministro de medicamentos en el tratamiento de enfermedades locales como alergia nasal, sinusitis, infecciones nasales y congestión nasal [49]. Actualmente, la vía nasal representa una ruta de administración no invasiva de ingredientes farmacéuticos activos para acción local, sistémica y del SNC [50]. Entre las características que la hacen única para la administración de fármacos destacan:

- Epitelio altamente vascularizado de la mucosa nasal.
- Membrana endotelial porosa.
- Fácil accesibilidad.
- Gran área superficial para una rápida absorción del fármaco.
- Inicio de acción rápido.
- Niveles de enzimas más bajos en comparación con el tracto gastrointestinal y el hígado.
- Alto flujo sanguíneo total por cm^3 .
- Transporte directo del fármaco a la circulación sistémica [49].

Hoy en día, se ha prestado una gran atención a la ruta intranasal como una alternativa no invasiva y prometedora para la administración de medicamentos para el SNC debido a su gran área de superficie altamente vascularizada y su capacidad para eludir la BHE proporcionando un suministro rápido y directo de fármacos al cerebro. La conexión anatómica única entre la cavidad nasal y el SNC proporciona un

acceso relativamente rápido y fácil al cerebro para los medicamentos administrados a través de la cavidad intranasal [51]. Esta ruta involucra los sistemas nerviosos olfativo o trigémino que se inician en el cerebro y terminan en la cavidad nasal en el neuroepitelio olfatorio o el epitelio respiratorio, respectivamente. Debido al hecho de ser las únicas porciones del SNC expuestas externamente, esta ruta representa el método más directo de entrada no invasiva al cerebro [52].

1.2.1. Anatomía de la nariz

La nariz es responsable de múltiples funciones fisiológicas como el olfato y la respiración, ofrece además una función protectora al filtrar el aire antes de llegar a la estructura terminal de los alvéolos. Se compone de dos cavidades simétricas revestidas de una capa de mucosa y divididas por el tabique que se encuentra a lo largo del plano medio sagital. La cavidad nasal y la cavidad oral están separadas entre sí por el hueso palatino [53]. El área superficial total de ambas cavidades nasales es relativamente grande (~150–160 cm²) debido a la presencia de ~400 microvellosidades por célula y se estima que el volumen total de secreciones nasales es de ~15 mL por día en condiciones fisiológicas normales. Estas cavidades se dividen en tres regiones: vestibular, respiratoria y olfatoria (Figura 2) [54].

- ***Región vestibular:***

Es la porción frontal de la cavidad nasal ubicada inmediatamente en las aberturas de las fosas nasales. Esta región está enriquecida con moco y vellosidades nasales que sirven para filtrar partículas inhaladas. El tipo de célula primaria en esta área son las células epiteliales escamosas con pocas o ningunas células ciliadas. Su superficie total es relativamente pequeña de 0.6 cm², razón por la cual la absorción de medicamentos en esta región es mínima [50, 53].

- ***Región respiratoria***

Cubre las paredes laterales de las cavidades nasales, incluidos los tres cornetes que sobresalen. Esta región tiene el área más grande que cubre alrededor de 130 cm² y consta de cuatro tipos de células: basales, caliciforme y célula del epitelio cilíndrico tanto ciliadas como no ciliadas [55]. La región respiratoria es el sitio principal para la entrada sistémica de fármacos administrados por vía nasal, debido a su gran área superficial y su alta vascularización. Sin embargo, los medicamentos que se absorben a través de la región respiratoria también pueden llegar al cerebro al ser absorbidos sistémicamente y tras su paso a través de la BHE. Además, esta región está inervada por la rama maxilar del nervio trigémino, que se origina en la protuberancia del tronco del encéfalo, lo que constituye una vía para el transporte directo de medicamentos al cerebro [56, 57].

- ***Región olfatoria***

Está situada en el techo de la cavidad nasal debajo de la placa cribiforme del hueso etmoides que separa la cavidad nasal de la cavidad craneal. Esta región cubre aproximadamente el 10% del total del área nasal y posibilita el transporte de medicamentos al SNC y al LCR a través del epitelio olfativo [56, 58]. En la región olfatoria se puede encontrar células de soporte, microvillares y basales, así como también neuronas receptoras olfatorias y una pequeña porción de neuronas trigeminales [45]. El epitelio olfativo se compone de células neurales olfativas que se originan en el bulbo olfatorio en el SNC, pasan a través de los poros en la placa cribiforme y terminan en el epitelio olfatorio. La rama oftálmica y maxilar del nervio trigémino también está presente en la región olfatoria. Tanto el epitelio olfativo como las vías del nervio trigémino funcionan como vías directas para el suministro de fármacos al cerebro [56, 59].

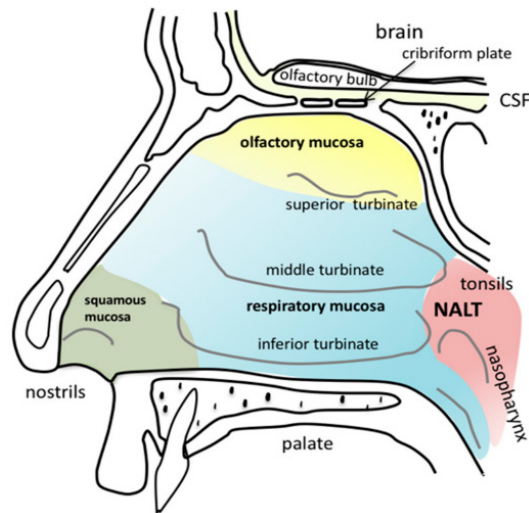


Figura 2. Anatomía de la cavidad nasal [60]

1.2.2. Ventajas y desventajas de la administración intranasal

La ruta nasal para la administración de fármacos tiene varias ventajas sobre la administración oral o intravenosa [61]. Varios investigadores han estudiado el transporte y suministro de fármacos “nariz a cerebro” para explorar los méritos de esta ruta y su conveniencia en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas [62]. La eficacia de fármacos dirigidos al SNC está estrechamente relacionada con su biodisponibilidad en el sitio de acción (LCR o tejidos cerebrales), siendo esto el principal desafío para el desarrollo actual en la terapéutica neurodegenerativa, cuyo objetivo es proporcionar la mejor penetración de la molécula activa en el cerebro de manera eficiente, al tiempo que minimiza su disponibilidad periférica y los efectos adversos relacionados [49, 63]. Algunas de las principales ventajas y limitaciones de la vía “nariz a cerebro” son presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. *Ventajas y desventajas de la vía nasal para el suministro de fármacos al cerebro Modificado de [62, 64].*

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
<ul style="list-style-type: none">▪ Es un método seguro, indoloro y conveniente de suministro de medicamentos.▪ Evita la degradación del fármaco en el tracto gastrointestinal.▪ Evita el metabolismo hepático de primer paso y el metabolismo de los fármacos en la pared intestinal, lo que permite una mayor biodisponibilidad cerebral.▪ Permite administrar el medicamento directamente al cerebro, sin pasar por la BHE y reduce la exposición sistémica de los medicamentos y los efectos secundarios sistémicos asociados.▪ Permite un mejor cumplimiento del paciente, ya que la autoadministración a través de esta vía es fácil.▪ Puede disminuir el tiempo de inicio de acción de los medicamentos para el SNC, especialmente para los medicamentos contra el dolor y la migraña.▪ Muestra una excelente biodisponibilidad para medicamentos de bajo peso molecular.▪ Es conveniente para pacientes geriátricos que no pueden tragar formas sólidas de dosificación oral.	<ul style="list-style-type: none">▪ Eliminación rápida de sustancias farmacológicas de la cavidad nasal debido al aclaramiento mucociliar.▪ Esta técnica podría ser interferida por la congestión nasal debido a un resfriado o una condición alérgica.▪ Área superficial limitada.▪ Dificultad en la permeación para medicamentos de alto peso molecular.▪ Algunos agentes terapéuticos, así como potenciadores de la absorción usados en la formulación podrían causar irritación en la mucosa nasal o ser susceptibles a la degradación enzimática y el metabolismo en el medio nasal en la superficie de la mucosa.▪ El volumen de formulación a administrar es limitado de 25 a 200 μL.

1.2.3. Mecanismos de transporte de fármacos desde la nariz al cerebro

Cuando la molécula del fármaco ingresa a la cavidad nasal, en primer lugar, experimenta el aclaramiento mucociliar en la región vestibular. A continuación, el fármaco se mueve a la región posterior de la cavidad nasal donde entra en contacto con la región respiratoria y la región olfatoria. El mecanismo exacto a través del cual, el fármaco es transportado desde la cavidad nasal al SNC no está totalmente claro. Puede seguir una única ruta de transporte de fármacos o una combinación de vías, dependiendo de la naturaleza del fármaco, los parámetros de formulación, el estado fisiológico, el tipo de dispositivos de administración, entre otros [45]. Se han propuesto dos rutas para el suministro de medicamentos de “nariz a cerebro”, vía indirecta y vía directa. (Figura 3)

Ruta indirecta o sistémica: Una vez que el fármaco ha escapado de la degradación enzimática y del aclaramiento mucociliar puede transportarse hacia la circulación sistémica a través de la mucosa de la región respiratoria, la cual es rica en capilares sanguíneos, y desde allí tiene la posibilidad de cruzar la BHE y llegar al cerebro y al LCR [65].

Ruta directa: Se da en las regiones respiratoria y olfatoria de la cavidad nasal a través de los nervios trigémino y las neuronas olfativas, respectivamente [49, 56]. Las vías del nervio olfativo o trigémino se inician en el cerebro y terminan en la cavidad nasal en el neuroepitelio olfativo o el epitelio respiratorio, respectivamente, siendo estas las únicas partes del SNC expuestas externamente y, por lo tanto, representan el método más directo de entrada no invasiva al cerebro [52].

Vía del nervio olfatorio: Los fármacos administrados por la nariz viajan a la mucosa olfatoria, la misma que contiene neuronas receptoras olfativas que son responsables de la transducción [66]. Estas neuronas receptoras olfativas se intercalan entre las células de soporte, las células microvillares y las células basales, mientras que las dendritas se extienden hacia la capa mucosa del epitelio olfativo y los axones se extienden centralmente a través de la lámina propia y a través de perforaciones en la placa cribiforme. Estos axones pasan a través del espacio subaracnoideo que contiene LCR y terminan en las células mitrales en los bulbos olfatorios. A partir de ahí, las proyecciones neurales se extienden a múltiples regiones del cerebro, incluyendo el tracto olfatorio, el núcleo olfativo anterior, la corteza piriforme, la amígdala y el hipotálamo [66, 67].

Vía del nervio trigémino: Tiene lugar entre las ramas de los nervios trigémino, que inervan la mucosa respiratoria y olfativa, transfiriendo las moléculas de fármaco directamente al tronco encefálico y otras estructuras conectadas [49]. Este nervio se compone de tres ramas incluyendo oftálmica, maxilar y mandibular, de las cuales, las ramas de la división oftálmica proporcionan inervación a la mucosa nasal dorsal y la porción anterior de la nariz, mientras que las ramas de la división maxilar proporcionan inervación a las paredes laterales de la mucosa nasal. La división mandibular del

nervio trigémino se extiende hasta la mandíbula inferior y los dientes, sin entradas neurales directas a la cavidad nasal [67]. Las tres ramas del nervio trigémino se unen en el ganglio trigémino, ingresan al SNC en las protuberancias y terminan en los núcleos espinales del trigémino en el tronco encefálico [68]. Por lo tanto, se ha sugerido que la administración intranasal utiliza la vía del nervio trigémino como un conducto para transportar el medicamento al tronco encefálico que comienza en la entrada a través de la protuberancia y luego a través del resto del cerebro posterior. Una porción del nervio trigémino que pasa a través de la placa cribiforme también puede contribuir al suministro del fármaco desde la mucosa nasal al cerebro anterior [69].

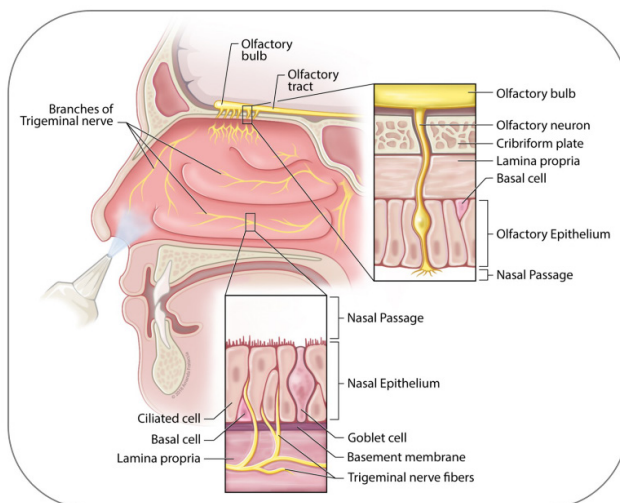


Figura 3. Estructuras anatómicas involucradas en el transporte de fármacos al cerebro a partir de la cavidad nasal [70]

1.2.3.1. Mecanismos de transporte celular

La transferencia de moléculas de fármaco a través de las vías de los nervios olfatorios y trigéminos en el epitelio nasal supone su entrega desde la cavidad nasal hasta el bulbo olfatorio y el tronco encefálico, respectivamente. El transporte de fármacos a través de las barreras epiteliales (olfativas de las vías respiratorias) en los conductos nasales puede ocurrir por vías intracelulares o extracelulares (Figura 4)[71].

Vía intracelular: También se conoce como vía intraneuronal, que es un método relativamente lento en el que los fármacos pueden tardar 24 horas en llegar al SNC después de la administración nasal. El primer paso en el transporte intracelular consiste en el paso del fármaco desde el epitelio olfativo y respiratorio hasta las neuronas sensoriales olfativas y neuronas trigeminales periféricas, respectivamente, a través de un proceso de endocitosis [45]. Esto es seguido por el transporte intracelular al bulbo olfatorio desde el nervio olfativo y al tronco encefálico desde los nervios trigémino. Al mismo tiempo, la transcitosis o el transporte transcelular proporciona fármaco a la lámina propia, este proceso implica la penetración de moléculas lipófilas ya sea por difusión pasiva o endocitosis mediada por receptor (transporte activo) [71].

Vía extracelular: El transporte extracelular de fármacos, es más rápido que el transporte intracelular y se considera adecuado para el suministro de sustancias farmacológicas hidrofílicas, diversas proteínas y péptidos [45]. Las vías de transporte extracelular a través del epitelio olfativo o respiratorio incluyen principalmente la difusión paracelular a través de uniones estrechas para llegar a la lámina propia subyacente. Desde la lámina propia, el fármaco puede ser absorbido por los vasos sanguíneos locales o los vasos linfáticos. Sin embargo, la mayor parte del fármaco se transloca a través del espacio perineural entre las células de vaina olfativas y los fibroblastos nerviosos olfativos por flujo masivo. Este espacio finalmente conduce al espacio subaracnoideo del cerebro, donde el fármaco puede distribuirse aún más [53]. Se ha estimado que toma 0.73–2.3 h para la difusión al bulbo olfatorio a lo largo de la vía extracelular asociada al olfativo y 17–56 h para la difusión al tronco encefálico a lo largo de la vía extracelular asociada al trigémino [61].

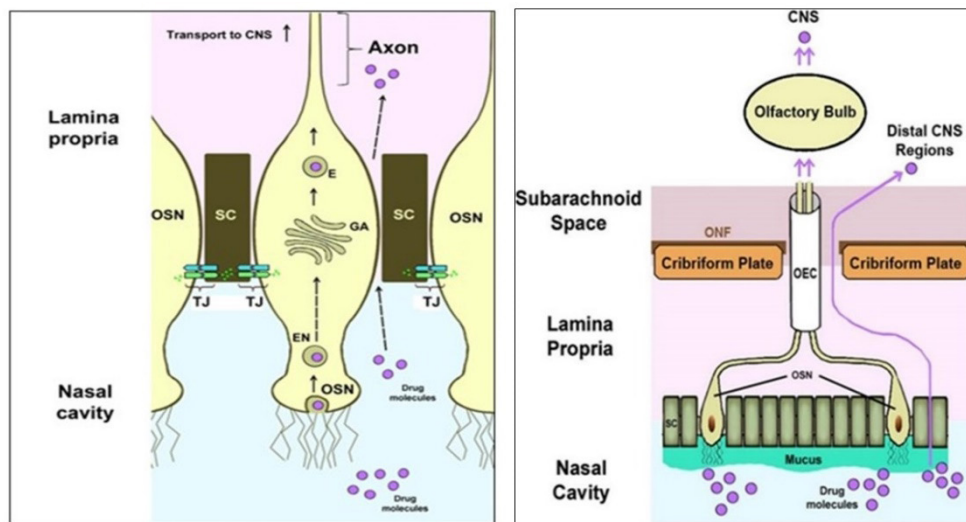


Figura 4. Transporte intranasal de fármacos a través de la ruta olfatoria hacia el SNC por vías intracelulares y extracelulares. Abreviaturas: SC: Células de soporte, OSN: Neuronas sensoriales olfativas, OEC: células de vaina olfativas, ONF: fibroblastos del nervio olfativo, TJ: uniones estrechas [50].

1.2.4. Factores que influyen en el transporte de fármacos al cerebro a través de la vía nasal

- **Propiedades fisicoquímicas del fármaco**

Peso molecular y lipofilidad: El peso molecular y la lipofilidad o hidrofilia del fármaco actúan juntos para determinar la permeación del fármaco [72]. Los fármacos de pequeño peso molecular (<400 Dalton) pueden transportarse más fácilmente al cerebro a través del epitelio de la mucosa nasal. Por lo general, los fármacos con un peso molecular superior a 1000 Dalton muestran poca capacidad para penetrar la barrera fisiológica [73]. Para las moléculas con un tamaño de entre 300 y 1000 Dalton, la liposolubilidad es una propiedad importante porque influye en la difusión pasiva a través del epitelio, entre más lipofílico sea el fármaco más fácil difunde a través de la mucosa nasal [57].

Grado de disociación: Tanto la absorción del fármaco a través del epitelio nasal como su transporte al LCR se ajustan a la teoría de la partición del pH, es decir que los fármacos no ionizados se absorben mejor en comparación con los ionizados. En este sentido, se ha reportado que la concentración de fármaco en el SNC se correlaciona inversamente con su disociación [73].

▪ **Propiedades fisicoquímicas de la formulación**

pH de la formulación: Para evitar la irritación nasal, el pH de la formulación debe ajustarse entre 5,0 y 6,5. Además de evitar la irritación, se obtiene una penetración eficaz del fármaco a través de la mucosa nasal [54].

Viscosidad: Una mayor viscosidad de la formulación aumenta el tiempo de contacto entre el fármaco y la mucosa nasal, aumentando así el tiempo de permeación. Sin embargo, si la viscosidad es demasiado alta, se altera el aclaramiento mucociliar y con ello la permeabilidad de los fármacos [54].

Volumen de administración: El volumen de la cavidad nasal limita el volumen de administración a valores inferiores a 200 μL , restringiendo así hasta cierto grado la cantidad de fármaco que podrá ser transportado al cerebro. En consecuencia, la formulación nasal debe garantizar una gran capacidad de carga de fármaco [73].

Forma de dosificación: Las gotas nasales son la forma de dosificación más simple, pero el drenaje nasal rápido y la dificultad para cuantificar el volumen exacto requerido constituyen los principales inconvenientes de este tipo de formulación [54, 74]. Debido a estos problemas, se han desarrollado dispositivos de gel de dosis medidas que administran con precisión el fármaco. Esta forma de dosificación, reduce el goteo nasal e incrementan el tiempo de contacto de la formulación con la mucosa [54]. Recientemente se han desarrollado novedosos sistemas de liberación de fármacos basado en nanotecnología para facilitar la vehicularización de fármacos al cerebro y aumentar su concentración en el sitio de acción [14]. Los nanotransportadores son considerados un enfoque prometedor, ya ofrecen proteger al

fármaco de la degradación química y/o metabólica, mejorar su solubilidad y facilitar su transporte a través de las membranas biológicas gracias a su tamaño reducido. Se han reportado diferentes nanotransportadores formulados para vehicular fármacos al cerebro, entre los cuales se incluyen: nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, liposomas, microemulsiones, nanoemulsiones y dendrímeros [75].

▪ **Factores fisiológicos**

Secreciones nasales: La permeabilidad del fármaco a través de la mucosa nasal se ve afectada por la viscosidad de la secreción nasal, la solubilidad del fármaco en las secreciones nasales y el pH de la cavidad nasal (5.0 - 6.5). Por lo general, se logra una mayor permeación del fármaco a un pH nasal inferior al pKa del fármaco porque, en tales condiciones, las moléculas penetrantes existen como especies no ionizadas. Un cambio en el pH del moco puede afectar la ionización y, por lo tanto, aumentar o disminuir la permeabilidad del fármaco, según la naturaleza del fármaco.

Aclaramiento mucociliar y latido ciliar: Constituyen un mecanismo de defensa normal de la cavidad nasal que limpian el moco y las sustancias adheridas a la mucosa nasal y las drenan hacia la nasofaringe para su eventual descarga en el tracto gastrointestinal [76]. Por lo tanto, el aclaramiento mucociliar limita el tiempo disponible para la permeación del fármaco, aunque, por el contrario, las numerosas microvellosidades del epitelio nasal ciliado que proporcionan una gran área de membrana mejoran enormemente la absorción del fármaco en comparación con el epitelio no ciliado [73]. Cuando se administra una sustancia por vía nasal, el aclaramiento mucociliar la elimina de la cavidad nasal en aproximadamente 21 minutos [57, 76]. Para promover el transporte del fármaco al cerebro, tiene sentido optimizar la formulación con el objetivo de prolongar el tiempo de retención o contacto del fármaco en el sitio de absorción, especialmente para aumentar la deposición del fármaco en la mucosa olfatoria [73, 77].

Barrera enzimática en la mucosa olfativa: Los fármacos administrados por vía intranasal no solo se eliminan por los movimientos de los cilios, sino que también

están influenciados por el sistema enzimático de la cavidad nasal, que produce un “efecto de pseudo-primer paso” y disminuye las cantidades de liberación y los efectos terapéuticos de proteínas y polipéptidos. En la cavidad nasal humana se encuentran isoformas enzimáticas del citocromo P450 como CYP1A, CYP2A y CYP2E, así como carboxilesterasas y glutatión S-transferasas. Para la mayoría de las enzimas en la cavidad nasal de los mamíferos, las cantidades en la mucosa olfatoria son más altas que las de la mucosa respiratoria [73].

Condiciones patológicas: Enfermedades como resfriados, rinitis y poliposis nasal suelen asociarse con disfunción mucociliar, hipo o hipersecreción e irritación de la mucosa nasal, que pueden influir en la permeación del fármaco [54].

1.3. PIEL

1.3.1. Estructura y función

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y representa aproximadamente el 15% del peso corporal, tiene una superficie de 1.8 m² y un grosor de 1.5 a 4 mm [78]. La piel constituye una barrera entre el organismo y el medio externo que previene la pérdida de agua y la entrada de diversos agentes patógenos, así como también protege contra factores exógenos químicos y físicos, tiene importantes funciones inmunes, sensoriales y metabólicas, regula la temperatura corporal y participa en la síntesis de vitamina D [79]. La compleja estructura de la piel humana y sus características fisicoquímicas la convierten en la primera línea de defensa del organismo contra factores exógenos y ayudan a mantener la homeostasis del cuerpo humano. En su estructura se distinguen tres capas principales: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 5) [80].

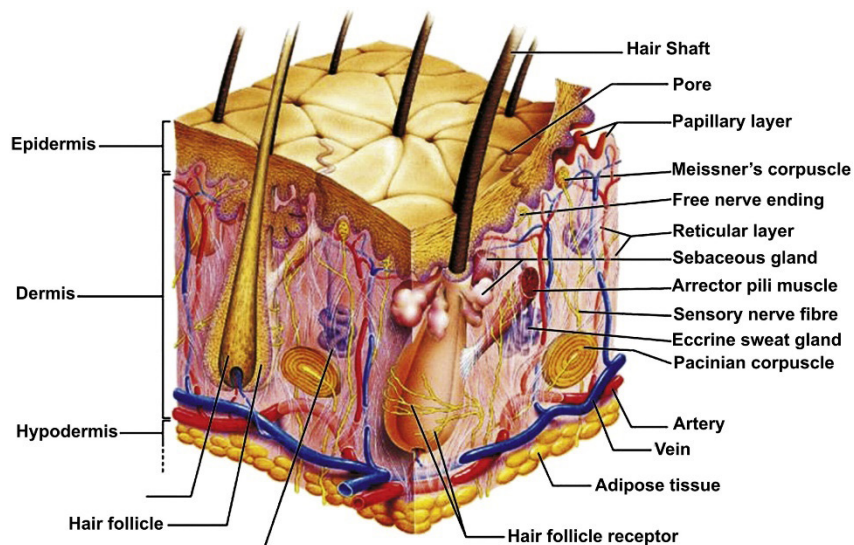


Figura 5. Anatomía de la piel [81]

- **Epidermis**

La epidermis es la capa más externa de la piel que presenta un grosor de 0.05 – 1.5 mm y está compuesta principalmente por queratinocitos que representan el 95% de las células, mientras que el 5% restante corresponden a melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel [81]. Generalmente, la epidermis se considera subdividida en 5 estratos con el siguiente orden desde la superficie externa hasta el contacto con la dermis: estrato córneo, lúcido, granuloso, espinoso y germinativo [82]. La epidermis es un tejido dinámico, que se renueva constantemente, en el que la pérdida de células de la superficie del estrato córneo (descamación) se equilibra con el crecimiento celular en la capa basal [83].

Estrato basal: Constituye la capa más profunda de la epidermis, contiene pequeñas células en división (basales, germinativas). Las células basales se dividen para formar queratinocitos, los cuales migran transitoriamente hacia el estrato córneo [84]. Esta capa también contiene células productoras de melanina llamadas melanocitos, que dan color a la piel y protegen las capas inferiores de la exposición dañina al sol, y células de Merkel que son esenciales para las respuestas táctiles [78, 85].

Estrato espinoso: Contiene células poliédricas irregulares que se aplanan a medida que se acercan a la superficie, las cuales forman uniones intercelulares a través de desmosomas. En este estrato también se pueden encontrar células dendríticas de Langerhans que se unen a los antígenos en la piel dañada para alertar al sistema inmunitario [78, 86].

Estrato granuloso: Contiene células en forma de diamante con gránulos de queratohialina y cuerpos lamelares, estos últimos contienen lípidos que se secretan al espacio extracelular, lo que da como resultado una envoltura lipídica hidrófoba que mantiene unidas las células y actúa como barrera mecánica de la piel. Los gránulos de queratohialina contienen proteínas (profilagrina, queratina y lorricrina). En este estrato, las células se transforman en corneocitos que forman el estrato córneo [87].

Estrato lúcido: Es una capa delgada y transparente que suele considerarse una subdivisión del estrato granuloso y se le identifica en zonas de piel gruesa como las palmas y las plantas [88, 89].

Estrato córneo: Constituye la capa superficial de la piel, formado por corneocitos apilados que proporcionan una barrera física. Los corneocitos son células escamosas anucleadas planas empaquetadas principalmente con filamentos de queratina. Estas células están conectadas por corneodesmosomas y embebidos en una matriz lipídica (compuesta de ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres) que proporciona la barrera de permeabilidad [88]. La matriz lipídica intercelular es generada por los queratinocitos en la parte media a superior del estrato granuloso, descargando su contenido laminar en el espacio intercelular. Este material extruido se reorganiza en las capas iniciales del estrato córneo formando láminas lipídicas intercelulares anchas [90]. Esta disposición escalonada de corneocitos en un lípido continuo se describe como “modelo de ladrillo y mortero”, donde las células representan los ladrillos y los lípidos a su alrededor el mortero (Figura 6). Los desmosomas están programados a pasar por un proceso de degradación gradual a fin de permitir la descamación ordenada de los corneocitos desgastados más externos [91].

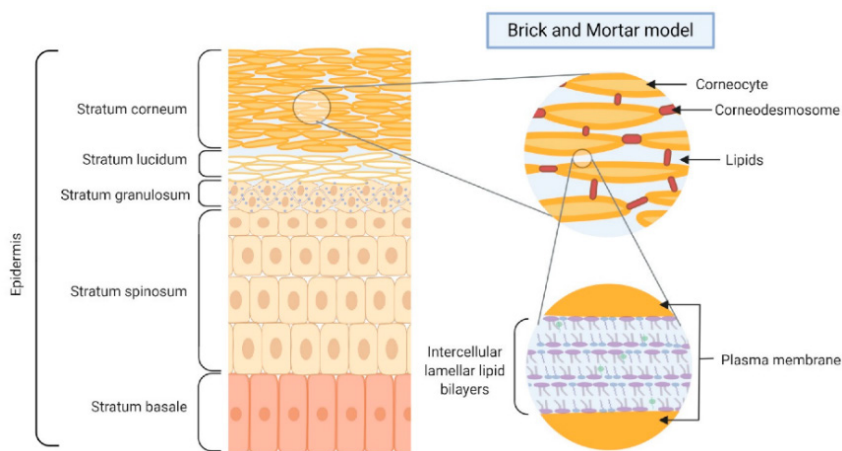


Figura 6. Estructura esquemática de la epidermis y representación del modelo de “ladrillo y mortero” [89]

- ***Dermis***

La dermis con un grosor de 0.5 a 5 mm (dependiendo del sitio del cuerpo) se encuentra directamente adyacente a la epidermis y proporciona soporte mecánico a la piel. La conexión entre la dermis y la epidermis se da a través de la membrana basal en la unión dermoepidérmica [83]. Se subdivide en dos capas principales: *dermis papilar*, la cual es rica en vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas sensoriales y *dermis reticular* que constituye la parte principal de la dermis y está en contacto con la hipodermis. La dermis presenta componentes intersticiales (fibras de colágeno, tejido elástico y sustancia fundamental) y celulares (fibroblastos, mastocitos, células plasmáticas, linfocitos, células dendríticas dérmicas e histiocitos). El fibroblasto es el tipo celular predominante en la dermis, cuya función es la síntesis de colágeno y elastina [92]. A diferencia de la epidermis que representa una estructura avascular, la dermis está impregnada de vasos sanguíneos y linfáticos. Los nervios, glándulas sudoríparas y sebáceas, así como los folículos pilosos están incrustados en la dermis [93].

- ***Hipodermis***

Es la capa más interna de la piel y se compone principalmente de adipocitos que almacenan energía y proporcionan aislamiento térmico. A parte de fibroblastos y macrófagos, la hipodermis también contiene vasos sanguíneos que se dirigen a la dermis conectando ésta a la circulación de la sangre. Esta capa actúa mecánicamente como un amortiguador y está unida a la dermis por colágeno y por bandas fibrosas que también se conectan a la fascia profunda de una manera muy flexible [78].

1.3.2. Suministro de fármacos a través de la piel: Ventajas y desventajas

La piel es reconocida como una ruta atractiva para la administración de medicamentos, los mismos que pueden ser suministrados mediante aplicación tópica, administración transdérmica e inyección a través de la piel en los tejidos subyacentes, incluida la dermis, tejido subcutáneo, músculo, vasos sanguíneos y

sitios específicos como el canal espinal. La aplicación tópica permite la focalización local de medicamentos con efectos sistémicos mínimos y se utiliza principalmente para la administración de fármacos antiinflamatorios, antihistamínicos, antibióticos y analgésicos [94].

La administración transdérmica de fármacos constituye una alternativa para minimizar y evitar las limitaciones relacionadas con la administración oral y parenteral de medicamentos y puede ser considerada en el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades, no solo las de la piel [95]. El suministro de fármacos por vía transdérmica presenta notables ventajas y también ciertas desventajas que se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. *Ventajas y desventajas de la administración transdérmica de fármacos. Modificado de [81, 95, 96].*

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
<ul style="list-style-type: none">▪ Conveniencia de acceso y facilidad de aplicación por ser no invasiva e indolora.▪ Posibilidad de evitar el metabolismo de primer paso en el tracto gastrointestinal y el hígado.▪ Liberación sostenida y prolongada durante un periodo prolongado de tiempo.▪ Duración de acción más larga para los medicamentos con una vida media de eliminación corta.▪ Reducción de efectos secundarios.▪ Ruta alternativa en circunstancias donde la dosificación oral no es posible (pacientes geriátricos, inconscientes o con náuseas).	<ul style="list-style-type: none">▪ Requiere de un peso molecular inferior a 500 Da para garantizar la facilidad de difusión a través del estrato córneo.▪ Suficiente solubilidad acuosa y lipídica ($\text{Log } P$ entre 1 y 3).▪ Metabolismo pre sistémico por parte de enzimas en la piel, como las peptidasas y las estererasas.▪ Irritación y sensibilización de la piel, que puede ser provocado por la exposición a ciertos fármacos, excipientes o componentes del dispositivo de administración.

1.3.3. Mecanismos para la permeación de fármacos a través de la piel

Las formulaciones tópicas y transdérmicas se usan comúnmente para transportar medicamentos a la piel y al tejido subyacente, o a través de la piel para una acción sistémica. El principal reto para lograr este objetivo consiste en superar

la barrera que proporciona la capa más externa de la piel, el estrato córneo [97]. Esta capa actúa como defensa física de primera línea para prevenir la entrada de agentes químicos y biológicos indeseables [98]. Por lo tanto, el estrato córneo constituye el paso limitante en el suministro de fármacos aplicados en la piel, en donde procesos como la diferenciación y migración de corneocitos y la descamación contrarrestan aún más el paso del fármaco [95].

Durante la absorción transdérmica se pueden distinguir tres pasos: *penetración* que consiste en el ingreso de las moléculas en el estrato exterior de la piel, típicamente el estrato córneo; *permeación*, proceso en el cual, las moléculas pasan de una capa a otra y de un estrato al siguiente, llegando finalmente a la dermis; y *absorción* que se refiere al paso de las moléculas al sistema vascular [99].

La liberación del fármaco, la penetración a través del estrato córneo, así como a través de las capas viables de la piel están determinados por las interacciones entre el fármaco, la piel y el vehículo. La liberación del fármaco a partir del vehículo aplicado a la piel y su transporte a la circulación sistémica es un proceso de varios pasos que incluye:

- Liberación de fármaco del vehículo
- Partición del fármaco desde la formulación hacia el estrato córneo
- Difusión del fármaco dentro del estrato córneo
- Partición del fármaco desde el estrato córneo hacia el interior de las capas viables de la epidermis
- Difusión a través de las capas viables de la epidermis hacia la dermis
- Absorción de fármacos por los vasos sanguíneos, a través de los cuales alcanzan la circulación sistémica [97].

El transporte activo y los procesos de transporte facilitados están ausentes del estrato córneo, debido a que los corneocitos están anucleados y queratinizados y no pueden producir las estructuras proteicas especializadas necesarias para el transporte activo o facilitado. Por consiguiente, se asume comúnmente que el mecanismo de

transporte del fármaco a través del estrato córneo es por difusión pasiva mediante tres posibles vías de penetración: intracelular, intercelular y folicular (Figura 7) [99, 100].

Vía intracelular: La difusión del fármaco se da a través de los corneocitos, siendo la vía de preferencia para las moléculas hidrofílicas. Sin embargo, se considera la vía más compleja, ya que, durante el paso de la molécula de una célula a la subyacente, éstas tienen que cruzar los lípidos intercelulares, consecuentemente, la penetración debe ser por una vía parcialmente intercelular [101].

Vía intercelular: El transporte del fármaco ocurre a través de la matriz lipídica, entre las células y es usada principalmente por moléculas hidrofóbicas [99]. Los lípidos de esta matriz extracelular proporcionan la única fase continua (y vía de difusión) desde la superficie de la piel hasta la base del estrato córneo; su composición (ceramidas, ácidos grasos libres y colesterol) es única entre las biomembranas y es particularmente notable la ausencia de fosfolípidos, sin embargo, a pesar de este déficit de lípidos formadores de bicapas, los lípidos del estrato córneo se reorganizan en hojas multilamelares [102]. Si bien los lípidos intercelulares están altamente estructurados y constituyen una barrera de permeabilidad significativa, la evidencia experimental sugiere que, a pesar de su alta tortuosidad, la vía intercelular parece ser la ruta predominante para la penetración de moléculas y su paso hacia los estratos más profundos [103].

Vía apéndice: Se refiere al paso de las moléculas a través de las glándulas sudoríparas, folículos pilosos y glándulas sebáceas [104]. Inicialmente, los apéndices de la piel no se consideraban rutas de penetración transdérmica significativas, ya que la evidencia sugería que representaban solo aproximadamente el 0.1% de la superficie de la piel. Sin embargo, estos cálculos no tuvieron en cuenta que los folículos pilosos representan invaginaciones, que se extienden profundamente en la dermis con un aumento significativo en el área de superficie real disponible para la penetración. Con una rica vascularización perifolicular y cambios en el patrón

de diferenciación a lo largo del conducto folicular, el folículo posee características distintas que favorecen la penetración [105].

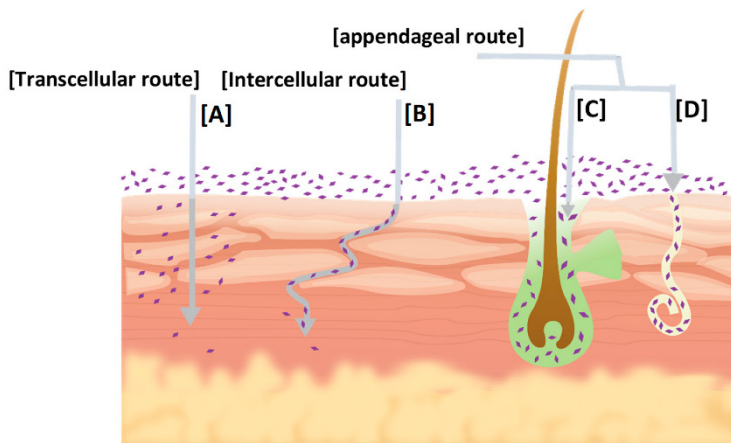


Figura 7. Vías para la permeación de fármacos en la piel [106]

1.3.4. Factores que influyen en la permeación de los fármacos

Hay muchos factores que afectan la penetración a través de la piel, incluidas las características fisicoquímicas del fármaco, factores biológicos y parámetros fisiológicos de la piel, así como también, las propiedades del vehículo. Entre las propiedades fisicoquímicas importantes del fármaco destacan: solubilidad, coeficiente de partición y coeficiente de difusión [103]. El coeficiente de permeabilidad es una constante proporcional al coeficiente de partición y difusión del fármaco. Esencialmente, la barrera del estrato córneo es lipofílica y, en consecuencia, las moléculas lipofílicas son mejor aceptadas. Sin embargo, las propiedades hidrofílicas de la piel aumentan a medida que aumenta la profundidad desde la superficie, de modo que la epidermis viable (estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal) así como la dermis son significativamente hidrófilas, lo que favorece la absorción de sustancias hidrófilas, de tal forma que, idealmente un medicamento debe poseer solubilidades tanto lipídicas como acuosas, ya que, si es demasiado hidrófilo, la molécula no podrá transferirse al estrato córneo mientras que, si es demasiado lipofílico, el medicamento tenderá a permanecer en las capas del estrato córneo

[100, 102]. En este sentido, se requiere que el fármaco presente un $\text{Log } P$ (octanol/agua) entre 1 y 3 para que atraviese con éxito el estrato córneo y sus capas acuosas subyacentes [96]. Con respecto al coeficiente de difusión, éste es inversamente proporcional al tamaño molecular del fármaco, de manera que, un peso molecular inferior a 500 Da se considera ideal para garantizar facilidad de difusión a través del estrato córneo [107].

Algunos de los factores biológicos y parámetros fisiológicos que afectan la penetración del fármaco a través de la piel, incluyen; la edad, nivel de hidratación de la piel, aporte sanguíneo, zona de aplicación, integridad de la piel, temperatura y pH de la piel. Si aumenta la hidratación, se puede mejorar la permeabilidad [95, 97]. En niños, la permeación a través de la piel es mayor debido a que presentan una piel más hidratada y un estrato córneo más fino que las personas mayores. Los cambios en la circulación periférica pueden afectar la absorción transdérmica, de manera que, un aumento en el flujo sanguíneo podría causar una absorción más rápida del fármaco, creando a su vez un gradiente de concentración más alto, el mismo que promueve la permeación del fármaco [108, 109]. Tanto el grosor de la piel como su grado de vascularización, naturaleza del estrato córneo y densidad de los apéndices varían de un sitio a otro, por lo tanto, el lugar de la aplicación influirá en el grado de permeación del fármaco. La piel actúa como una barrera que impide el paso de sustancias externas hacia el interior del organismo, de modo que, cualquier lesión o patología que altere la integridad de la barrera de la piel aumentará la permeabilidad a sustancias externas [108]. La temperatura de la piel representa también un parámetro importante en la absorción transdérmica, ya que su incremento implica un aumento del flujo sanguíneo, y con ello, puede incrementar la velocidad de difusión y permeación de los fármacos [110]. Finalmente, el pH de la piel puede influir en el grado de disociación del fármaco, dependiendo de sus valores de pKa. En este sentido, un fármaco en su forma ionizada puede ser más soluble, pero con un coeficiente de permeabilidad más bajo, en consecuencia, las sustancias en su estado no ionizado pueden permear la piel más fácilmente [103].

Las propiedades fisicoquímicas del sistema de administración o vehículo, tales como, composición, concentración del fármaco y características fisicoquímica, influyen significativamente en la tasa de permeación transdérmica. El mecanismo de liberación depende del fármaco disuelto o suspendido en el vehículo, del coeficiente de partición interfacial, de la naturaleza de la formulación y del pH. Si el fármaco se libera fácilmente del sistema de administración, la tasa de permeación transdérmica será mayor [110]. El vehículo puede mejorar la permeabilidad de la piel al proporcionar un efecto de hidratación o mediante alteración de la estructura de la bicapa lipídica. Los componentes añadidos a una formulación tienen un propósito específico en relación con la liberación, estabilidad y/o actividad del principio activo. Algunos componentes de uso común incluyen los tensioactivos que solubilizan lípidos dentro del estrato córneo, y potenciadores de penetración capaces de aumentar el coeficiente de difusión de fármacos al interrumpir la barrera del estrato córneo. Los potenciadores de penetración también pueden mejorar la partición entre la formulación y el estrato

córneo [100]. Finalmente, ya que la penetración y permeación del fármaco ocurre a través de mecanismos de difusión pasiva, la permeación depende del gradiente de concentración entre el vehículo y las capas de la piel [108, 110].

1.4. ENFERMEDADES INFLAMATORIAS DE LA PIEL

La inflamación aguda es una respuesta inmune del huésped contra el cambio externo o la lesión celular, y sus signos clásicos son enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y pérdida de función [111]. El sistema inmunitario cutáneo está altamente organizado y regulado, y abarca aspectos tanto de la inmunidad innata como adaptativa. La piel contiene un perfil variado de células inmunes innatas y mediadores, incluidos péptidos antimicrobianos, proteínas del sistema del complemento y fagocitos, como neutrófilos y macrófagos, que realizan una vigilancia rutinaria del tejido cutáneo en los vasos sanguíneos penetrantes [112, 113]. Además, la piel es la anfitriona de los componentes del sistema inmunitario adaptativo, y es la disfunción de éstos lo que se destaca en los trastornos inflamatorios de la piel [112]. Las funciones defensivas normales de la inflamación constituyen un proceso de protección esencial para preservar la integridad del cuerpo, al reaccionar y atacar a los invasores, como microorganismos, sustancias extrañas o células cancerosas con el objetivo de iniciar la reparación del tejido. Sin embargo, la respuesta inflamatoria a tales ataques puede conducir erróneamente al daño de los tejidos normales, debido a una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y citocinas [114]. Estas respuestas inflamatorias inapropiadas o excesivas pueden desencadenar una inflamación crónica implicada en la patogénesis de una gran variedad de trastornos de la piel [111, 115].

Las enfermedades de la piel relacionadas con la inflamación son el problema más común en dermatología que tiene un impacto socioeconómico considerable y pueden afectar significativamente la calidad de vida y la autoestima de los pacientes particularmente cuando la afección inflamatoria se presenta en partes visibles del cuerpo [116, 117]. Existen algunas formas de trastornos de la piel que incluyen erupciones cutáneas ocasionales acompañadas de picazón en la piel, enrojecimiento y afecciones crónicas como dermatitis, rosácea, dermatitis seborreica y psoriasis

[118]. Las secreciones de citocinas en respuesta a la lesión, particularmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina (IL)-1 β , representan mediadores clave de la respuesta inflamatoria cutánea. La medicación terapéutica implica el tratamiento de los síntomas al interrumpir el proceso inflamatorio y, si es posible, la causa nativa. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos y los fármacos antiinflamatorios esteroideos utilizados actualmente para tratar los trastornos inflamatorios agudos no han tenido éxito para curar los trastornos inflamatorios crónicos, haciéndose necesario el desarrollo de medicamentos que interfieran con la expresión y señalización de las citocinas involucradas en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas de la piel, en particular la terapia tópica dirigida a un mediador específico en la piel promete un efecto farmacológico local y con menos efectos secundarios [114, 118].

1.4.1. Dermatitis atópica

La dermatitis atópica es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, caracterizada por un curso fluctuante, intensa picazón y lesiones cutáneas fuertemente inflamadas, causada por una interacción compleja de factores genéticos, inmunes y ambientales [119]. Es una de las enfermedades cutáneas más comunes que afecta hasta al 20% de niños y al 1-3% de adultos [120]. Esta enfermedad con frecuencia comienza durante los primeros 12 meses de vida en el 60% de los casos, y en los primeros 5 años en el 70-85% [119, 121]. El prurito intenso deteriora la productividad laboral y la estabilidad socioeconómica, induce trastornos del sueño y disminuye la calidad de vida de los pacientes afectados. El rascado inducido por la picazón acelera el daño celular en la piel lesionada e induce “liquenificación”, que se manifiesta microscópicamente como acantosis epidérmica y fibrosis dérmica [122]. La dermatitis atópica se asocia comúnmente con varios trastornos en niños y adultos, incluido el asma, rinitis alérgica y alergia alimentaria. La nueva evidencia sobre comorbilidades de la enfermedad previamente no reconocidas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, obesidad, osteoporosis, lesiones y fracturas, alopecia areata y vitiligo, sugieren que

la dermatitis atópica es una enfermedad sistémica, con efectos nocivos generalizados [123].

1.4.1.1. Fisiopatología de la dermatitis atópica

La dermatitis atópica es una enfermedad multifactorial, causada por una combinación de factores genéticos, ambientales e inmunológicos (Figura 8). Los principales mecanismos fisiopatológicos se pueden resumir de la siguiente manera:

- Desviación inmune hacia células T auxiliares tipo 2 (Th2, por sus siglas en inglés) en la fase de iniciación con el consiguiente aumento de la producción de IgE.
- Función de barrera cutánea deficiente debido al metabolismo lipídico anormal y/o la formación de proteínas estructurales epidérmicas.
- Colonización microbiana anormal con organismos patógenos como *Staphylococcus aureus* o *Malassezia furfur*.
- Inflamación neurogénica.

Entre los factores genéticos, las mutaciones nulas del gen FLG que codifica para proteína filagrina son el determinante genético más estudiado de la dermatitis atópica [124]. La filagrina constituye un componente clave de la función de barrera dentro del estrato córneo, y las mutaciones de FLG están asociadas con aumentos en la pérdida de agua transepidérmica, un indicador de la disfunción de la barrera cutánea [125, 126]. Las proteínas no son los únicos componentes de la barrera, ya que los lípidos, principalmente las ceramidas, ácidos grasos libres y colesterol, constituyen la matriz lipídica que se organiza en el estrato córneo. La piel con dermatitis atópica se caracteriza por una composición reducida de ceramida, así como por una reducción de las proporciones de ceramida a colesterol, alteraciones que conducen a un aumento en la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) [127].

Con respecto a los factores inmunológicos, la dermatitis atópica se caracteriza por una sobreexpresión de moléculas proinflamatorias como las citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), IL-22 y linfopoyetina estromal tímica (TSL, por sus siglas en inglés) [120]. La importancia patogénica de la IL-4 e IL-13 se ha establecido como resultado de una excelente respuesta al tratamiento de la enfermedad utilizando el anticuerpo monoclonal dupilumab que bloquea la acción de estas dos interleucinas [122]. IL-31 e IL-33 también están relacionadas con la patogénesis de la dermatitis atópica. Las lesiones crónicas muestran la intensificación de estos ejes inmunes, con una activación adicional de las respuestas asociadas a Th1 [128]. En la fase crónica, la activación continua de Th2 y Th22 aumenta en la barrera epidérmica afectada acelerando también la inflamación local que conduce a un círculo vicioso [120]. TSLP activa las células presentadoras de antígenos, las células dendríticas, los basófilos y las células linfoides innatas tipo 2 (CL12) para producir citocinas Th2 y Th17 [129]. Los mecanismos inmunes de la dermatitis atópica pueden diferir dependiendo de la edad del paciente, especialmente durante los primeros meses de la enfermedad cuando la dermatitis atópica se establece crónicamente. Aunque tanto en la dermatitis adulta como pediátrica existe una fuerte activación de Th2, otros ejes inmunes como Th22 han sido encontrados más fuertes en la dermatitis atópica pediátrica. Los niños muestran además mayor inducción de citocinas relacionadas con Th-17 [124]. En general, este perfil Th2/Th17 combinado se refleja en un fuerte aumento de la regulación de IL-19, que es una citocina proinflamatoria inducida típicamente por IL-17, y que puede estimular aún más la producción de citocinas asociadas a Th2, uniendo así los ejes inmunes Th17 a Th2 [119]. Un rol funcional potencial de la activación de Th17 en dermatitis atópica pediátrica de inicio temprano se sugiere por el hecho de que IL-26, una citocina asociada a Th17, muestra una fuerte correlación positiva con el aumento de TEWL y, por lo tanto, el deterioro de la barrera cutánea [130].

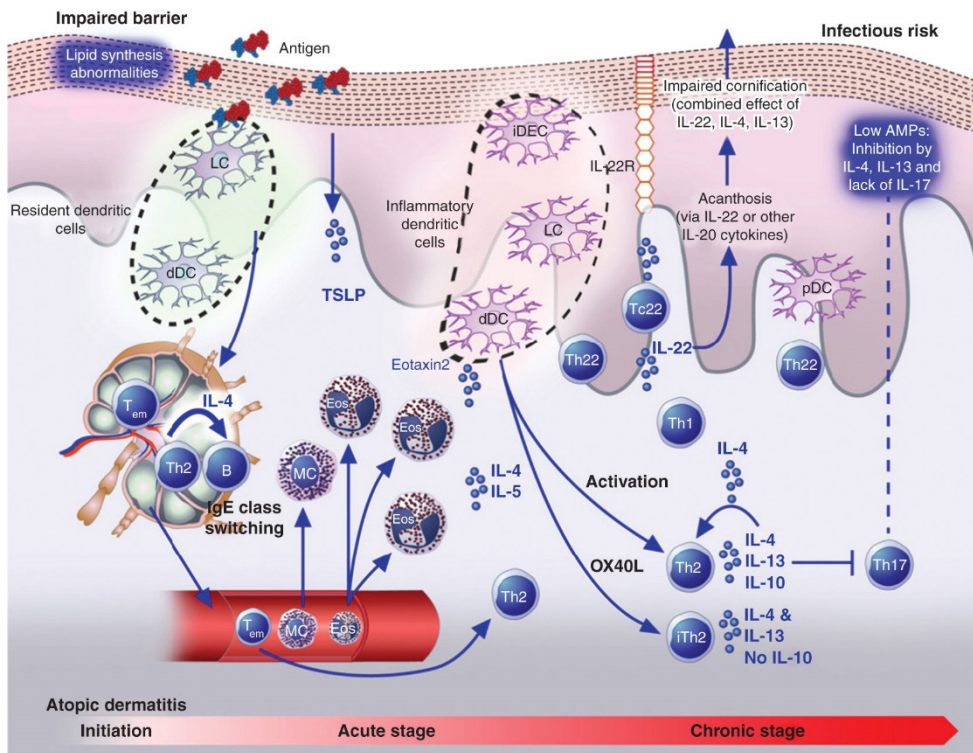


Figura 8. Fisiopatología de la dermatitis atópica [131].

1.4.1.2. Diagnóstico de la dermatitis atópica

El diagnóstico de la dermatitis atópica se basa en signos clínicos, pruebas de alergia y exclusión de otras enfermedades de la piel. Su presentación clínica depende de la edad del paciente y el estadio (agudo o crónico) de la enfermedad [132]. Para excluir otras afecciones de la piel al diagnosticar dermatitis atópica a menudo requiere pruebas complementarias en forma de parche, punción o biopsia. Se ha establecido guías de diagnóstico de acuerdo a criterios que se basan principalmente en la identificación de signos atópicos en la piel y el tiempo de aparición de la enfermedad, entre otros factores. Actualmente, no hay biomarcadores validados que puedan ayudar fácilmente en el diagnóstico de la dermatitis atópica, aunque se espera que surjan algunos en los próximos años [133, 134]. Los criterios validados del Grupo de Trabajo del Reino Unido para el diagnóstico de dermatitis atópica se han modificado a partir de los criterios de consenso de Hanifin y Rajka [135]. Para

tener un diagnóstico de la enfermedad, un individuo debe tener una afección cutánea con picazón en los últimos 6 meses, más tres o más de los siguientes hallazgos:

- Inicio antes de los 2 años de edad (no aplicable si el niño es menor a 4 años de edad)
- Antecedentes de afectación flexural.
- Una historia de piel generalmente seca.
- Antecedentes de otra enfermedad atópica (o antecedentes en un familiar de primer grado para un niño menor a 4 años de edad).
- Dermatitis flexural visible [121].

1.4.1.3. Tratamiento de la dermatitis atópica

El objetivo del tratamiento en la dermatitis atópica se centra en reducir los síntomas, prevenir las exacerbaciones, tratar la sobreinfección, minimizar los riesgos del tratamiento y restaurar la integridad de la piel [136]. Muchos pacientes con dermatitis atópica leve pueden lograr el control de la enfermedad con buenos hábitos de cuidado de la piel y tratamientos tópicos, a diferencia de los pacientes con enfermedad moderada a grave, cuyo manejo resulta complejo [137]. Los principios generales de la terapia incluyen la educación del paciente, mejorar la hidratación y la función de la barrera cutánea, eliminar los factores de exacerbación y el tratamiento de la inflamación de la piel [136]. Los tratamientos tópicos continúan siendo esenciales tanto para la reparación de la función de barrera como para el suministro de moléculas antiinflamatorias. Además de los emolientes (efectos calmantes e hidratantes), los corticosteroides y los inhibidores de la calcineurina (tacrolimus y pimecrolimus), se han desarrollado nuevas moléculas pequeñas como el crisaborole que pueden usarse por vía tópica [138]. En casos graves, puede ser necesario un tratamiento sistémico con glucocorticoides, ciclosporina A, azatioprina, metotrexato y micofenolato mofetilo [121]. Sin embargo, la terapia sistémica muestra efectos adversos graves y tiene una eficacia limitada en muchos pacientes en los que los síntomas a menudo reaparecen después de suspender el tratamiento. Por este motivo, los pacientes con dermatitis atópica moderada a severa a menudo reciben tratamientos tópicos antes o junto con

un tratamiento sistémico o como terapia de mantenimiento después de disminuir el tratamiento sistémico [137, 139]. A medida que el tratamiento de la dermatitis atópica ha comenzado a avanzar hacia fármacos más selectivos, se han desarrollado diversos agentes biológicos para bloquear citocinas, receptores de citocinas o factores de transcripción específicos. En la actualidad, “dupilumab” un anticuerpo monoclonal que reduce efectivamente la respuesta inmune Th2 al antagonizar la acción de IL-4 e IL-13 es el único medicamento biológico aprobado por la FDA para el tratamiento sistémico de la dermatitis atópica moderada a severa [129, 140]. En los últimos años, una mejor comprensión de la patogénesis de la dermatitis atópica que se extiende más allá del eje Th2 ha llevado a una ampliación del arsenal terapéutico con múltiples candidatos que están bajo investigación como terapias dirigidas específicamente a diferentes citocinas o elementos clave del proceso inflamatorio de la enfermedad y que prometen ser más efectivas a largo plazo con un perfil de seguridad aceptable [136, 140].

1.4.2. Perspectivas terapéuticas de la pioglitazona en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel

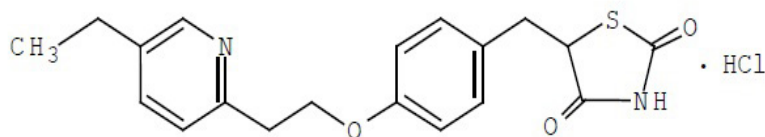


Figura 9. Estructura molecular de la pioglitazona [141]

El clorhidrato de pioglitazona (PGZ) es una tiazolidinediona con nombre químico [(+)-5-[[4-[2-(5-etilo-2-pridinilo)etoxi]fenilo]metilo]-2,4-]monoclorhidrato de tiazolidinediona utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Figura 9). PGZ es un agonista potente y altamente selectivo para el receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR- γ , por sus siglas en inglés), que actúa reduciendo la resistencia periférica y hepática a la insulina, lo que resulta en una mayor eliminación de glucosa dependiente de insulina y una disminución de

la producción de glucosa hepática [142, 143]. Se encuentra disponible en forma de comprimidos de administración oral de 15 y 30 mg. PGZ es una base débil que pertenece a la clase II del sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés) ($pK_a=5.8$ y 6.8 , $\log P=2.3$) y presenta una solubilidad dependiente del pH. Para los medicamentos de clase II en el BCS que tienen baja solubilidad y alta permeabilidad, la solubilidad y/o la velocidad de disolución en el tracto gastrointestinal se consideran los principales factores que limitan la absorción oral [144]. PGZ sufre un metabolismo hepático extenso, predominantemente a través del sistema citocromo P450 (CYP) 2C8 y, se incluyen vías secundarias como CYP 3A4, CYP2C9 y CYP1A1/2 [145]. La molécula de PGZ tiene un centro quiral y presenta dos enantiómeros que se convierten entre sí *in vivo*, pero no se encuentran diferencias en sus actividades farmacológicas, por lo tanto, la mezcla racémica se usa farmacológicamente [141]. Físicamente, este fármaco se presenta como un polvo cristalino blanco inodoro, con una fórmula molecular de $C_{19}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl$ y un peso molecular de 392.90 Da, es insoluble en éter y prácticamente insoluble en agua, muy ligeramente soluble en acetona y acetonitrilo, ligeramente soluble en etanol anhidrosis, y soluble en N,N-dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO) [143]. PPAR- γ es un receptor nuclear, cuya activación estimula la transcripción de genes involucrados en la homeostasis metabólica (lípidos y carbohidratos) a través del mecanismo conocido como transactivación (ADN-dependiente). Además, PPAR γ reprime la expresión de genes de la respuesta inflamatoria de manera independiente de la unión al ADN a través de un mecanismo denominado transrepresión dependiente de ligando, al antagonizar la activación dependiente de la señal de sus genes diana por otras clases de factores de transcripción, incluidas la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B, por sus siglas en inglés), reduciendo así las vías de señalización inflamatoria [146]. Consecuentemente, se ha sugerido que PPAR γ puede ejercer efectos antiinflamatorios al regular negativamente la expresión de genes proinflamatorios inducidos durante la diferenciación y activación de macrófagos. En los últimos años, se han generado numerosos informes que indican los beneficios terapéuticos de los agonistas de PPAR γ en reducir los procesos inflamatorios en una variedad de modelos de enfermedades incluyendo Alzheimer, pancreatitis, artritis, enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias,

de la piel, entre otras [147, 148]. Particularmente, el efecto beneficioso de PGZ sobre múltiples parámetros inflamatorios ha sido reportado mediante diversos estudios usando datos *in vitro*, trabajos experimentales en modelos animales y algunos estudios en humanos [149]. El tratamiento con PGZ en pacientes con DM2 redujo el contenido y la actividad de macrófagos del tejido adiposo, y se asoció con una disminución de los marcadores inflamatorios incluyendo macrófagos, neutrófilos y células dendríticas [150, 151]. PGZ administrado a sujetos obesos causó una disminución en ciertos parámetros inflamatorios adiposos (IL-6, IL-1 β) e infiltración reducida de macrófagos, células dendríticas y neutrófilos [150]. PGZ puede reducir significativamente la IL-6 y el TNF α en individuos resistentes a la insulina sin hiperglucemia manifiesta compatible con la edad, el sexo y la adiposidad [152, 153]. También se ha informado que la PGZ inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) y puede aumentar las antiinflamatorias (IL-10) en los astrocitos estimulado con lipopolisacárido [154, 155]. Otros estudios han indicado que PGZ inhibe la diferenciación Th17 en ratones y humanos [156] y disminuye la degeneración del núcleo pulposo inducida por IL-17 mediante la inhibición de la señalización de NF- κ B [157]. Además, se ha informado que la PGZ puede ejercer un efecto directo sobre la inflamación pulmonar y la fibrosis en ratones [152, 158]. La evidencia científica creciente sobre el efecto antiinflamatorio de PGZ sugiere que las actividades terapéuticas de este fármaco van mucho más allá de su rol en el control glucémico pudiendo ser un candidato prometedor para el tratamiento de trastornos inflamatorios incluso del tipo dermatológico [159].

1.5. MICROEMULSIONES Y NANOEMULSIONES

Las emulsiones son sistemas dispersos de dos fases inmiscibles, donde ambas, la fase interna y la externa, son líquidas. Una emulsión típica se forma utilizando por lo menos tres componentes esenciales: aceite, agua y emulsificante [160, 161]. Las emulsiones se clasifican de forma general en tres tipos principales: macroemulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones (Figura 10). Estos sistemas pueden caracterizarse en función de su tipo, tamaño, método de formación y características de estabilidad (Tabla 3) [160].

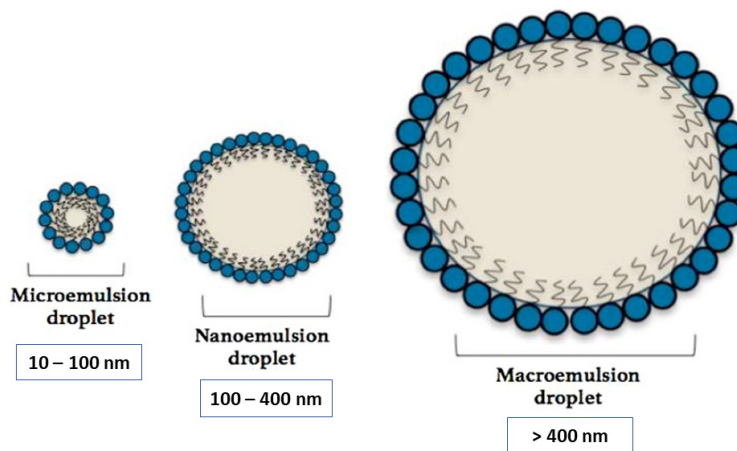


Figura 10. Clasificación de las emulsiones según su tamaño de gota [154]

Macroemulsiones: Son llamadas a menudo emulsiones “gruesas” u opacas debido a sus tamaños de gota relativamente grandes (mayor a 400 nm de diámetro) [160, 162].

Microemulsiones (MEs): Son dispersiones coloidales termodinámicamente estables, y, por lo tanto, su formación es espontánea. Se caracterizan por ser transparentes, monofásicas, ópticamente isotrópicas y presentan un tamaño de gota en el rango de 10 a 100 nm [163, 164].

Nanoemulsiones (NEs): Son dispersiones coloidales termodinámicamente inestables, a pesar de tener una elevada estabilidad cinética, y, por lo tanto, requieren aportación de energía para su formación. Con frecuencia, presentan un color blanco azulado a semi opaco y son conocidas comúnmente como miniemulsiones o emulsiones ultrafinas [165]. A diferencia de su nomenclatura y creencia popular, las NEs no presentan tamaños de gota necesariamente más pequeñas que las MEs. De hecho, se ha reportado que las NEs generalmente presentan tamaños de gota en el rango de tamaño medio entre el de las macroemulsiones y las MEs, es decir, aproximadamente de 100 a 400 nm de diámetro [160].

Tabla 3. Comparación de macroemulsiones, microemulsiones y nanoemulsiones [160, 163]

	Macroemulsiones	Microemulsiones	Nanoemulsiones
<i>Tamaño de gota</i>	> 400 nm	10 – 100 nm	100 – 400 nm
<i>Forma</i>	Gotas esféricas	Gotas esféricas / Estructura laminar	Gotas esféricas
<i>Polidispersidad</i>	Alta	Baja	Baja
<i>Estabilidad termodinámica</i>	Inestable	Estable	Inestable
<i>Método de preparación</i>	Alta energía	Baja energía	Baja / alta energía
<i>Relación tensioactivo - aceite</i>	Baja	Alta	Moderada
<i>Textura</i>	Semi-sólida	Fluida	Fluida

1.5.1. Composición de las MEs y NEs

Las MEs y NEs ofrecen ventajas en términos de simplicidad y estabilidad. Tanto las MEs como las NEs pueden definirse como dispersiones coloidales formadas por una fase líquida dispersa en otra fase también líquida, ambas inmiscibles entre sí. Generalmente, estas fases líquidas corresponden a una fase acuosa y una fase oleosa estabilizadas, mediante la incorporación de uno o más compuestos tensioactivos [166, 167].

Las MEs y NEs se clasifican según el tipo de fase continua (o externa) y dispersa (o interna) en sistemas de fase externa acuosa (o/w) y de fase externa oleosa (w/o). Por su parte, las MEs pueden ser también bicontinuas en la que las fases acuosa y oleosa están entrelazadas y estabilizadas por áreas tensioactivas en forma de lámina en las áreas entre las fases [163, 168]. Las emulsiones w/o son una mejor opción para los fármacos hidrofílicos, mientras que los fármacos lipofílicos se vehiculizan preferiblemente en sistemas o/w. Se ha reportado que los medicamentos que pertenecen a la clase II y IV del BCS son la opción preferida para el desarrollo de emulsiones o/w ya que ayudan a mejorar la solubilidad del fármaco (Figura 11) [169].

Las MEs y NEs son similares en términos de composición cualitativa, ya que requieren ingredientes bastante similares para fabricarlas, tales como, una fase acuosa, una fase oleosa, un agente tensioactivo y posiblemente un co-tensioactivo. Si embargo, muestran diferencias fundamentales en su composición cuantitativa [170]. Por lo general, se requiere una mayor relación de tensioactivo – aceite para preparar una ME que una NE [163]. En este sentido, las NEs pueden incorporar una mayor cantidad de fase dispersa en presencia de una menor cantidad de tensioactivo, lo cual garantiza un mejor perfil toxicológico. Adicionalmente, las NEs pueden formularse con una mayor variedad de tensioactivos, a diferencia de las MEs que requieren el uso especial de moléculas capaces de proporcionar una tensión interfacial ultrabaja. Aunque no existen reglas precisas para la selección de los componentes, las propiedades de las formulaciones dependerán principalmente de la elección del tensioactivo y eventualmente el co-tensioactivo, en función de la fase oleosa [166].

▪ ***Fase oleosa***

La fase oleosa desempeña un papel vital en la formulación, ya que solubiliza los fármacos lipofílicos destinados al tratamiento de diferentes enfermedades [169]. Las propiedades del sistema coloidal, así como su formación y estabilidad, están fuertemente influenciadas por las propiedades fisicoquímicas del aceite seleccionado, incluyendo, su viscosidad, tensión interfacial, polaridad, densidad e índice de

refracción [171]. Los componentes de la fase oleosa incluyen ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico), ésteres de ácidos grasos y alcoholes (por ejemplo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, oleato de etilo), triglicéridos de cadena media, triacetina, terpenos (por ejemplo, limoneno, mentol, cineol) y otros potenciadores de penetración. Estos componentes pueden usarse solos o en combinación para formar la fase oleosa [41, 163].

▪ ***Tensioactivos***

Los tensioactivos son moléculas de naturaleza anfifílica, es decir que presentan grupos hidrófilos e hidrófobos en su estructura molecular, propiedad que permite la reducción de la tensión interfacial a un valor muy pequeño para ayudar al proceso de dispersión de las dos fases inmiscibles y proporcionar una película flexible capaz de deformarse alrededor de las gotas con la curvatura óptima [172]. Tienen la capacidad de adsorberse rápidamente en la interfaz agua-aceite y proporcionan estabilización estérica o electrostática o electrostérica doble evitando la agregación de las gotas [166].

Los tensioactivos se clasifican utilizando el valor del equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB), que corresponde a un número empírico incluida en una escala arbitraria que va de 0 a 20 y refleja la contribución de las partes hidrofílicas y lipofílicas de las moléculas. Los tensioactivos con valores bajos de HLB (2-6) son más lipófilos, consecuentemente solubilizan mejor en la fase de aceite y estabilizan las emulsiones de tipo w/o, mientras que los tensioactivos con valores altos de HLB (8-18) son más hidrófilos concentrándose en la fase acuosa y estabilizan las emulsiones de tipo o/w [173]. El HLB del sistema en función de la fase oleosa influye en las propiedades fisicoquímicas de las MEs y las NEs. Cuando el valor de HLB del tensioactivo es lo más cercano posible al requerido por la fase oleosa, se puede lograr un tamaño de gotas más pequeño y con una distribución de tamaño estrecha [166, 174].

Los tensioactivos pueden ser clasificados en función de su carga eléctrica como: no iónicos, zwitteriónicos o anfóteros, catiónicos y aniónicos. La estabilización

de la emulsión mediante efectos estéricos se logra con el uso de tensioactivos no iónicos, los cuales crean una barrera estérica fuerte a través de grupos moleculares voluminosos dirigidos hacia el medio de dispersión, evitando así la colisión de las gotas. Los tensioactivos iónicos se emplean para proporcionar una carga eléctrica y con ello generar una repulsión electrostática entre las superficies de las gotas de la fase dispersa, evitando su acercamiento y colisión. Desde un criterio toxicológico, los tensioactivos no iónicos muestran un perfil más seguro, por este motivo, han sido ampliamente utilizados en el desarrollo de MEs y NEs [175].

Los tensioactivos de uso común incluyen Tween 20, 40, 60 y 80 (monolaurato de sorbitán de polioxietileno), Cremophor EL (aceite de ricino Polioxil-35), Span 20, 40, 60 y 80 (monolaurato de sorbitán), lecitina (fosfatidilcolina) derivada de la yema de huevo o la soja, Solutol HS-15 (polioxietilen-660-hidroxiestearato). Otros tensioactivos comunes incluyen los que pertenecen a la familia del poloxámero, dodecil sulfato de sodio, proteínas anfifílicas como la caseína y copolímeros de bloques que contienen PEG [176].

▪ ***Co-tensioactivos***

Los co-tensioactivos son generalmente moléculas anfifílicas que apoyan sinérgicamente la acción de los tensioactivos en la preparación de MEs y NEs. En particular, los co-tensioactivos pueden reducir aún más la tensión interfacial al tiempo que aumentan la movilidad de las cadenas de hidrocarburo, proporcionan mayor penetración del aceite en esta región y confieren a la película interfacial suficiente flexibilidad para tomar diferentes curvaturas requeridas para formar MEs o NEs en un amplio rango de composición [172, 177]. El uso de co-tensioactivos es común para acelerar el proceso de preparación de MEs y posibilitar la formación de NEs mediante métodos de baja energía. Los alcoholes de longitud de cadena corta/media formados por una cadena de hidrocarburos y un grupo hidroxilo constituyen los co-tensioactivos más apropiados, ya que se difunden rápidamente entre las fases de aceite y agua, alcanzando la interfaz, donde se intercalan entre las moléculas de tensioactivo debilitando las interacciones de las cabezas polares y las cadenas

de hidrocarburo. Esto conduce a una película interfacial más flexible capaz de deformarse fácilmente alrededor de las gotas [166]. Algunos co-tensioactivos comúnmente utilizados incluyen etanol, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, Transcutol (dietilenglicol monoetil éter), etilenglicol y propanol [176].

No es posible establecer relaciones fijas de tensioactivo/co-tensioactivo, ya que dependerán de las propiedades de todos los componentes seleccionados en la formulación. A este respecto, para encontrar la composición cuali-cuantitativa óptima es habitual llevar a cabo un estudio de formulación. La herramienta más utilizada es el diagrama de fase pseudoternario, que permite investigar los rangos de concentración de los componentes (tensioactivo, co-tensioactivo, fase oleosa) para identificar el área de emulsificación, en la cual se podrá incorporar el fármaco [166].

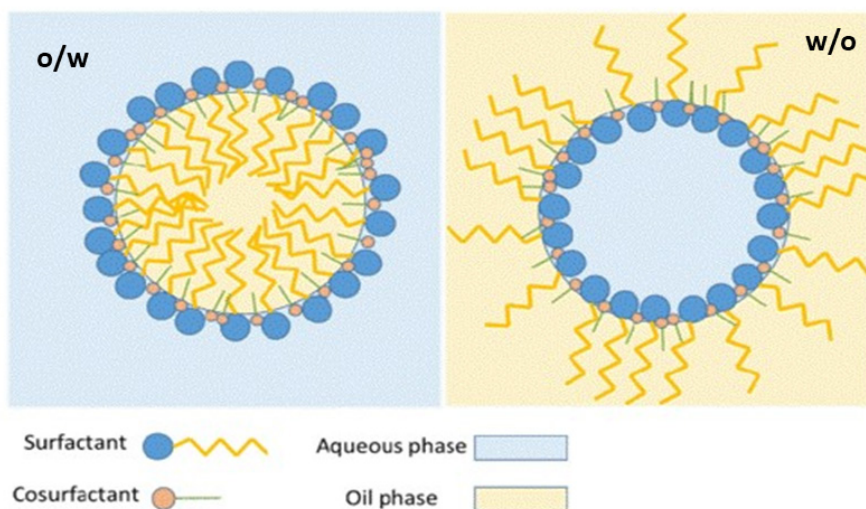


Figura 11. Estructura de microemulsiones y nanoemulsiones o/w y w/o [178]

1.5.2. Preparación de MEs

El parámetro principal que nos permite diferenciar las MEs y NEs es la energía libre del sistema, que influye en su proceso de preparación y estabilidad. Las MEs se caracterizan por ser sistemas termodinámicamente estables, mientras

que las NEs no son termodinámicamente, sino cinéticamente estables. Este aspecto depende de la energía libre diferente de la dispersión coloidal con respecto a la de las dos fases separadas. Las MEs se ven favorecidas energéticamente con respecto a las fases separadas, es decir, que sus componentes están en un estado energético más alto que el del producto de la ME final. Por lo tanto, la formación de MEs es un proceso impulsado hacia adelante y, en la mayoría de los casos puede lograrse espontáneamente sin el aporte de energía, mezclando agua, aceite y tensioactivo [161].

La formación de MEs está impulsada por un proceso energético basado en la siguiente ecuación:

$$\Delta G = \gamma \Delta A - T \Delta S$$

Donde ΔG es la energía libre del sistema, γ es la tensión en la interfaz aceite/agua, ΔA es la variación del área interfacial, T es la temperatura y ΔS es la variación de la entropía del sistema. La baja tensión interfacial y el aumento de la entropía de los sistemas que ocurren en una ME son lo suficientemente altos como para contrarrestar el crecimiento de ΔA dado por el aumento de la cantidad de gotas de aceite, lo que permite obtener un valor negativo de ΔG . Sin embargo, en algunos casos se proporciona una energía leve externa como agitación magnética, para acelerar la reorganización de las moléculas de tensioactivo o superar las barreras cinéticas que podrían retrasar la formación de las MEs [179].

1.5.3. Preparación de NEs

En el caso de las NEs, las fases separadas poseen una energía libre más baja con respecto al sistema coloidal, por lo tanto, la formación de una NE es energéticamente desventajosa. En este sentido, la preparación de NEs pueden lograrse solo en presencia de una entrada de energía externa que exceda el valor de ΔG que en un sistema termodinámicamente inestable siempre es positivo. Los métodos de manufactura de NEs se clasifican en función de los mecanismos fisicoquímicos involucrados. Se

pueden distinguir dos categorías principales: emulsificación de alta energía y de baja energía (Figura 12) [166].

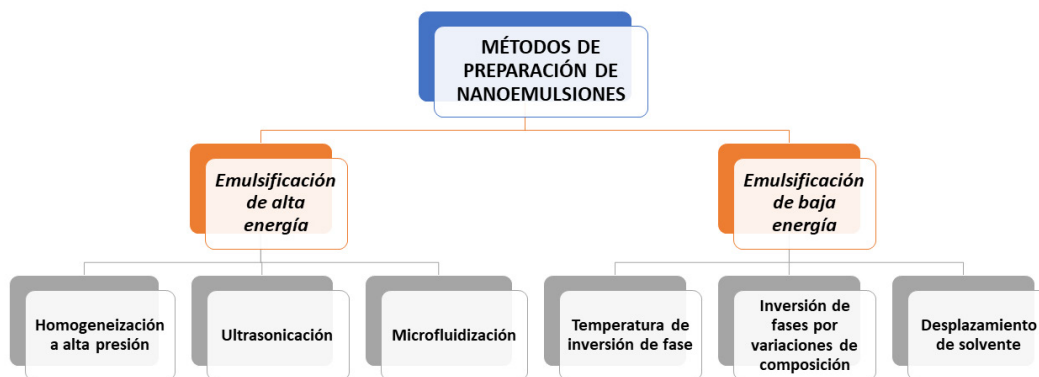


Figura 12. Métodos de preparación de nanoemulsiones

▪ ***Métodos de emulsificación de alta energía:***

Involucran la aplicación de un dispositivo mecánico para crear grandes fuerzas disruptivas con el objetivo de descomponer la fase interna y luego dispersarla en la fase continua. Los métodos más comunes de este grupo son: homogeneización a alta presión, ultrasonificación y microfluidización [41]. Estos métodos son preferidos en operaciones industriales debido al control flexible de la distribución del tamaño de las gotas del sistema y la capacidad de producir emulsiones finas a partir de una amplia variedad de materiales. Además, resultan más fáciles de escalar que los métodos de baja energía [180]. Las principales desventajas incluyen el costo instrumental y la generación de altas temperaturas operativas que constituye un inconveniente para medicamentos termolábiles [176].

Homogeneización a alta presión

Este método permite obtener NEs de tamaño de gota extremadamente pequeño utilizando un homogeneizador de alta presión. El proceso consiste en pasar la dispersión de dos líquidos (fase oleosa y fase acuosa) a través de un pequeño orificio

de entrada a presiones en el rango de 500 a 5000 psi para obtener partículas finas de emulsión de hasta 1 nm mediante la aplicación de turbulencia y cizallamiento hidráulico. Las principales desventajas de esta técnica son el alto consumo de energía y el aumento de la temperatura de la emulsión durante la preparación [172].

Ultrasonificación

Este proceso depende de ondas de sonido de alta frecuencia (20 kHz o de mayor intensidad y alta potencia) que conducen a la generación de NEs mediante un mecanismo de cavitación de las burbujas y se puede usar para formar una NE in situ o reducir el tamaño de una emulsión gruesa [176]. Los parámetros críticos para la emulsificación ultrasónica son la frecuencia, el tiempo de ultrasonidos y la potencia de irradiación. Las ondas de ultrasonido conducen a la formación secuencial, crecimiento y colapso de microburbujas en el medio líquido. El colapso repentino de estas cavidades genera microinyecciones ultrasónicas que resultan en la homogeneización de líquidos multifase o emulsiones [181].

Microfluidización

El instrumento utilizado para este proceso es el microfluidizador, el cual fuerza a un material de alimentación que corresponde a una emulsión gruesa a través de microcanales de una cámara de interacción bajo la influencia de una bomba de desplazamiento de alta presión para lograr la reducción de tamaño por medio de múltiples mecanismos que actúan juntos como impactación entre gotas, desgaste, cizallamiento, cavitación, etc. La NE se somete a varios pasos a través del instrumento para garantizar la uniformidad del tamaño y dependiendo de la formulación se obtienen tamaños de gota inferior a 600 nm [176].

▪ ***Métodos de emulsificación de baja energía:***

Esta categoría emplea la energía almacenada del sistema para formar las pequeñas gotas de la NE e incluye diferentes métodos, tales como temperatura

de inversión de fase (TIF), desplazamiento de solvente, inversión de fases por variaciones de composición, los cuales dependen principalmente de la inflexión de las propiedades interfaciales de los componentes (aceite, tensioactivo y S_{mix}) para proporcionar una formulación adecuada. Estos procesos son considerados “suaves” por lo que supone que no causan destrucción ni daño a las moléculas vehiculizadas. Adicionalmente, desde el punto de vista de producción a gran escala, estos métodos son más atractivos ya que ahorran más energía en la producción [169, 182].

Temperatura de inversión de fase (TIF)

Es una técnica que se basa en la propiedad específica de los emulsionantes sensibles a la temperatura, que consiste en su capacidad de cambiar la afinidad de distribución hacia el agua y el aceite dependiendo del cambio progresivo en la temperatura del sistema. Un ejemplo de tales emulsionantes constituye los derivados etoxilados que generalmente son hidrófilos a temperatura baja debido a la hidratación de grupos polares e hidrófobos a temperatura elevada debido a la presencia de grupos alifáticos. Por debajo de la temperatura de transición, el área de superficie ocupada por los grupos polares hidratados es mayor y por tanto se forman emulsiones de tipo aceite en agua (o/w), sin embargo, por encima de la temperatura de transición, el área de superficie ocupada por las cadenas de hidrocarburos se hace más grande y como resultado se forman emulsiones de tipo agua en aceite (w/o). El enfriamiento rápido del sistema produce nanoemulsiones cinéticamente estables con una distribución estrecha del tamaño de gota [169].

Método de inversión de fases por variaciones de composición

Esta técnica es conocida también como auto-nanoemulsificación y permite producir NEs mediante variaciones de composición, sin utilización de calor ni solventes. Este método específico de preparación consiste en agregar agua a una mezcla de aceite y tensioactivo bajo agitación constante. El método implica la transición de fases de w/o a o/w al diluir el sistema con agua, o viceversa según sea el caso. Este proceso utiliza la energía química liberada del proceso de emulsión como

consecuencia del cambio en la curvatura espontánea de las moléculas de tensioactivo de negativo a positivo (o/w) o de positivo a negativo (w/o) [180, 183].

Método de desplazamiento de solvente

Esta técnica se lleva a cabo de manera muy simple mediante la mezcla bajo agitación de dos líquidos a temperatura ambiente. Uno es una fase acuosa pura; el otro es una mezcla de aceite, tensioactivo y un solvente orgánico miscible en agua (alcohol, éter dietílico, acetona, etc). El desplazamiento del solvente de la fase oleosa a la acuosa induce una gran turbulencia en la interfaz agua/aceite dando como resultado un aumento dramático del área interfacial que conduce al estado de emulsión metaestable. La obtención de gotas de tamaño nanométrico se logra bajo condiciones experimentales en las cuales la relación solvente:aceite es muy alta. La difusión del solvente es, por lo tanto, aún más rápida y la turbulencia generada de este modo hace que se produzcan gotas de tamaño nanométrico. El principal inconveniente de este método es la eliminación del disolvente orgánico del sistema después de la preparación [170, 182].

1.5.4. Caracterización de micro y nanoemulsiones

Las MEs y NEs se caracterizan por una gama de propiedades físicas que determinan su estructura, liberación de fármacos y estabilidad. Las propiedades físicas básicas analizadas en la caracterización de las MEs y NEs son el tamaño de partícula, morfología, distribución del tamaño, propiedades de superficie, cristalinidad, estabilidad, etc, las mismas que se investigan utilizando diferentes técnicas.

Dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés): Es una técnica que permite evaluar el tamaño de gota, distribución de tamaño, así como la estabilidad del tamaño de gota durante el almacenamiento de MEs y NEs [163, 172]. El tamaño de gota es calculado mediante la iluminación de las partículas con un láser y el

análisis de las fluctuaciones de intensidad debidas al movimiento Browniano de la fase dispersa [184].

Potencial Zeta: Es un reflejo del potencial electrocinético de una dispersión coloidal y a menudo constituye la mejor representación de las características eléctricas de las gotas de una emulsión porque explica inherentemente la adsorción de cualquier contraión cargado. [185, 186]. El potencial zeta está influenciado por muchos factores, como los tensioactivos, la concentración de electrolitos (fuerza iónica), la morfología de las gotas de la fase interna, el tamaño, el pH de la solución y el estado de hidratación [172]. Este parámetro se mide generalmente usando un medidor zeta, en el cual la formulación se coloca en una cubeta y la lectura se registra en mV, siendo útil en la evaluación de la estabilidad de las NEs y MEs [187].

Técnicas de imagen: La microscopía se puede utilizar como una técnica de imagen directa para obtener información sobre el tamaño, la forma y el estado de agregación de la fase dispersa de las MEs y NEs. En este sentido, la microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), técnicas de preparación criogénicas (crio-TEM) y criofractura se han utilizado ampliamente para corroborar los datos obtenidos a través de DLS [188]. La caracterización mediante SEM produce imágenes bidimensionales considerablemente profundas y es beneficioso para identificar la topografía, los contornos y la morfología de las gotas. La criofractura puede agregar valor a los datos obtenidos mediante SEM, en donde las gotitas del sistema coloidal rápidamente congeladas se rompen para observar su interior, lo que permite la identificación, localización y captura exacta de la simetría relativa de los lípidos constitutivos, tensioactivos y co-tensioactivos [176]. TEM ofrece una imagen completa, ya que puede capturar estructuras coexistentes (como gotas recubiertas, cualquier desviación de la estructura esférica, presencia de agregados, etc.) y detalles microestructurales de la propia formulación [176, 189]. La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) es una técnica desarrollada recientemente, la cual es capaz de registrar continuamente la topografía de la muestra utilizando una

sonda, produciendo así un perfil tridimensional de alta resolución de la superficie de la muestra [190, 191].

Calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés): Es una técnica termoanalítica en la que la diferencia en la cantidad de calor requerida para aumentar la temperatura de una muestra y la referencia se mide en función de la temperatura [172]. DSC se puede utilizar para detectar transiciones de fase, incluida la fusión de regiones cristalinas, y para calcular el porcentaje de grasa desestabilizada en las emulsiones [190].

Resonancia magnética nuclear (RMN): Es una herramienta analítica potente y compleja que sirve tanto en análisis cuantitativo como estructural. Se puede usar como una técnica complementaria a los métodos de espectroscopía óptica y espectrometría de masas que conducen a información precisa sobre la fórmula estructural, estereoquímica e información sobre la conformación preferida de las moléculas [172, 192]. La aplicación de esta técnica en la caracterización de MEs y NEs ha sido solo ligeramente explotada. RMN se ha utilizado para estudiar los tipos, la estructura y las propiedades de difusión de los componentes de estos sistemas coloidales [188].

Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS, por sus siglas en inglés): Es una técnica para el estudio de las características estructurales de las partículas de tamaño coloidal que mide las intensidades de rayos X dispersados en una muestra como función del ángulo de dispersión. Las mediciones son llevadas a cabo en ángulos muy pequeños (típicamente 0.1-10 grados) [172]. SAXS se utiliza para caracterizar las partículas coloidales por su forma, tamaño y nanoestructura [193].

Viscosidad - Propiedades reológicas: La viscosidad es un parámetro crucial que influye en la estabilidad y la liberación de fármacos a partir del vehículo [163]. Este parámetro depende de los componentes de la formulación y sus concentraciones, ya que el aumento en el contenido de agua generalmente disminuye la viscosidad, mientras que la reducción de tensioactivo y co-tensioactivo conduce a un aumento

de la tensión interfacial y en consecuencia se incrementa la viscosidad. Con respecto al tipo de emulsión, los sistemas o/w a menudo poseen viscosidades aparentes más bajas [187]. La evaluación de la viscosidad y el comportamiento reológico de una formulación se realiza utilizando un dispositivo de corte que proporciona el valor de la viscosidad aparente y la relación dependiente entre la viscosidad aparente y el esfuerzo de corte, lo cual permite evaluar el comportamiento de flujo de la formulación. Las propiedades reológicas de las MEs y NEs se ven afectadas por los tensioactivos, la forma y la densidad de las gotas de la fase interna, y las interacciones entre ellas [188].

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Diseño, desarrollo y caracterización de sistemas de liberación de fármacos basados en micro y nanoemulsiones para el tratamiento del Alzheimer y enfermedades inflamatorias de la piel.

2.2. Objetivos específicos

- Optimización de micro y nanoemulsiones de donepezilo en base a estudios de solubilidad y diagramas pseudoternarios para el tratamiento del Alzheimer mediante administración intranasal.
- Optimización de nanoemulsiones tópicas de pioglitazona en base a estudios de solubilidad y diagramas pseudoternarios para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.
- Caracterización de las fórmulas desarrolladas a nivel fisico-químico y estudio de su estabilidad física.
- Evaluación biofarmacéutica de la liberación del fármaco *in vitro* y su permeación *ex vivo* a través de mucosa nasal porcina para las formulaciones de donepezilo y piel humana para las formulaciones de pioglitazona.
- Estudios de toxicidad de las formulaciones a través de ensayos *in vitro*, modelos *in vivo* y tolerancia en voluntarios.
- Evaluación de la eficacia terapéutica de las nanoemulsiones de pioglitazona en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel usando modelos animales.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

La investigación llevada a cabo durante el desarrollo de la presente tesis doctoral permitió la publicación de los artículos científicos detallados a continuación:

Artículo 1 Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer's Disease: *in vitro* and *ex vivo* Characterization

CNS & Neurological Disorders - Drug Targets

2018, 17(1):43-53

Artículo 2 Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil

Pharmaceutics

2019, 11(2): 64

Artículo 3 Nanoemulsion strategy of pioglitazone for the treatment of skin inflammatory diseases

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine

2019, 19:115-125

Artículo 4 Topical Pioglitazone Nanoformulation for the Treatment of Atopic Dermatitis: Design, Characterization and Efficacy in Hairless Mouse Model

Pharmaceutics

2020, 12(3):255

3.1. Artículo 1

Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer's Disease: *in vitro* and *ex vivo* Characterization

Lupe C. Espinoza^{1,2}, Marisol Vacacela¹, Beatriz Clares^{3,4,*}, Maria Luisa García^{1,4}, María-José Fábrega⁵ and Ana C. Calpena^{1,4}

¹ Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

² Departamento de Química y Ciencias Exactas, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja 1101608, Ecuador.

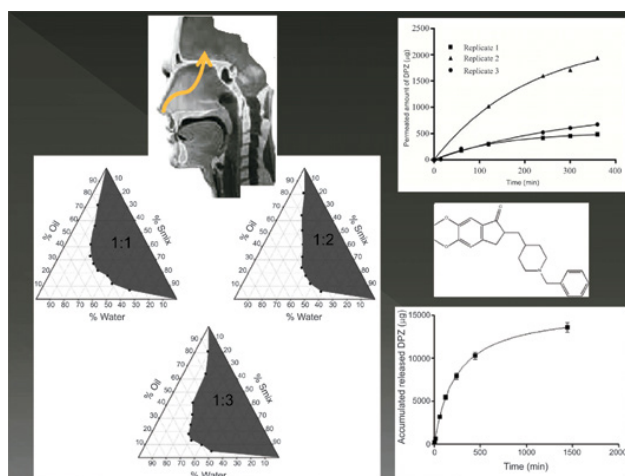
³ Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain.

⁴ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

⁵ Biochemistry and Physiology Department, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

<i>Revista:</i>	CNS & Neurological Disorders - Drug Targets
<i>Año de publicación:</i>	2018
<i>ISSN:</i>	18715273
<i>Factor de impacto:</i>	2.761
<i>DOI:</i>	10.2174/1871527317666180104122347

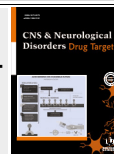
Graphical abstract



RESEARCH ARTICLE



Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer's Disease: *in vitro* and *ex vivo* Characterization



Lupe C. Espinoza^{1,2}, Marisol Vacacela¹, Beatriz Clares^{3,4,*}, Maria Luisa García^{1,4}, María-José Fábrega⁵ and Ana C. Calpena^{1,4}

¹Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; ²Departamento de Química y Ciencias Exactas, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja 1101608, Ecuador; ³Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain; ⁴Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; ⁵Biochemistry and Physiology Department, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Abstract: Background: Donepezil (DPZ) is widely prescribed as a specific and reversible acetylcholinesterase inhibitor for the symptomatic treatment of mild to moderate Alzheimer's disease (AD).

Objective: Considering the therapeutic potential of DPZ and the advantages offered by the intranasal route as an alternative for drug administration, the aim of this study was the development and characterization of a DPZ microemulsion (ME) for nose-to-brain delivery.

Method: The ME was developed by construction of pseudoternary phase diagrams and characterized by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. Flow properties and viscosity, as well as optical stability and stability under storage at different temperatures were evaluated. Finally, *in vitro* release and *ex vivo* permeation studies through porcine nasal mucosa were accomplished.

Results: A transparent and homogeneous DPZ-ME (12.5 mg/ml) was obtained. The pH and viscosity were 6.38 and 44.69 mPa·s, respectively, indicating nasal irritation prevention and low viscosity. The mean droplet size was 58.9±3.2 nm with a polydispersity index of 0.19±0.04. The morphological analysis revealed the spherical shape of droplets, as well as their smooth and regular surface. Optical stability evidenced no destabilization processes. DPZ release profile indicated that the ME followed a hyperbolic kinetic model while the *ex vivo* permeation profile showed that the highest permeation occurred during initial 4 h and the maximum permeated amount was approximately 2000 µg, which corresponds to 80% of the starting amount of drug.

Conclusion: We conclude that our nasal ME could be considered as a new potential tool for further investigation in the AD.

ARTICLE HISTORY

Received: August 08, 2017
Revised: December 21, 2017
Accepted: December 28, 2017

DOI:
10.2174/1871527317666180104122347

Keywords: Donepezil, Alzheimer's disease, intranasal route, microemulsion, permeation, delivery systems.

1. INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease characterized by a gradual decline in cognition, decreased ability to perform activities of daily living (ADL) and often neuropsychiatric behavioral disorders [1]. AD is the most common cause of dementia, accounting for between 60% and 70% of cases [2]. There are about 30

million people suffering from AD around the world, and these numbers are expected to triple by 2050 [3].

The development of AD has been associated with decreased acetylcholine levels, giving rise to the cholinergic hypothesis of AD. Acetylcholine (ACh) is a neurotransmitter synthesized from acetyl-CoA and choline, a reaction that is catalyzed by the enzyme choline acetyltransferase inside of cholinergic neurons [4]. ACh is released into the synaptic cleft during transmission of nerve impulses to activate muscarinic and nicotinic receptors and is hydrolyzed through the action of acetylcholinesterase (AChE) [5]. The cholinergic hypothesis states that cholinergic dysfunction in the central

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja, P.O. Box: 18071, Granada, Spain;
Tel/Fax: +34-958-246664; +34-958-248958; E-mail: beatrizclares@ugr.es

nervous system (CNS) contributes to the cognitive impairment that is characteristic of AD [6]. Because of this, pharmacological treatments such as cholinesterase inhibitors (ChEIs) have been developed in order to increase the available levels of acetylcholine [7, 8]. Rivastigmine, galantamine, donepezil (DPZ) and tacrine are ChEIs that are prescribed to treat cognitive symptoms of AD and are approved by the United States Food and Drug Administration (U.S. FDA). According to some experts, DPZ hydrochloride is preferable because it may be administered long-term on a daily basis with reduced side effects [9].

DPZ is a piperidine-based, specific and reversible AChE inhibitor (Fig.1) which prevents the hydrolysis of ACh, thus increasing its concentration in the cholinergic synapses [10-12]. Additionally, DPZ binds to sigma-1 receptor, a chaperone protein residing in the endoplasmic reticulum-mitochondrion interface whose activation by ligands produces a neuroprotective effect [13, 14]. This drug has fewer side effects (nausea, vomiting and diarrhea) than non-specific ChEIs such as physostigmine and tacrine [15, 16]. DPZ was the second AChE inhibitor approved by the U.S. FDA for the symptomatic treatment of mild to moderate AD at the recommended starting dosage of 5 mg administered once per day [17-19]. DPZ is available for oral administration in the following dosage forms: immediate release tablets (5 or 10 mg), orally disintegrating tablets (5 or 10 mg) and sustained release tablets (23 mg) [20, 21]. After oral administration, DPZ reaches peak plasma concentration in 3 to 4 h and achieves a relative bioavailability of 100%. It has an elimination half-life of about 70 h and its distribution is approximately 96% bound to human plasma proteins [22]. DPZ is metabolized in the liver by the cytochrome P-450 isoenzyme CYP 3A4 and CYP 2D6 [23]. However, this type of treatment has notable disadvantages among geriatric patients who might have difficulty swallowing solid dosage forms, and additional adverse side effects have been found in the gastrointestinal system caused by oral DPZ therapy [20, 24].

The development of oral delivery systems to treat AD is difficult for various reasons, such as: disintegration time, mechanical resistance, stability, poor solubility and ineffective ability to cross the blood-brain barrier with conventional treatment [21, 25]. This inefficient utilization of drug may require administrations of higher drug concentrations and thereby increase the toxic effects [2]. However, the pharmaceutical agents that are used to treat neurodegenerative diseases can provide important benefits if they are formulated through other technologies such as nanotechnology-based drug delivery systems, liposomes, polymeric and solid lipid nanoparticles, solid lipid carriers, liquid crystals, microemulsions (MEs), and hydrogels [25, 26]. In addition, these strategies seem to be promising tools for the delivery of therapeutic products to the brain through different routes, one of which is intranasal administration because it offers an alternative, non-invasive method of circumventing the blood-brain barrier to deliver drugs to the CNS [27-29].

The intranasal route has been widely explored as an option for local and systemic delivery of drugs due to its physiological and histological characteristics, which provide important advantages that include the high vascularization of the nasal mucosa, large absorptive surface area [30-32], po-

rous endothelial membrane, avoidance of first pass metabolism and rapid onset of action. Furthermore, this route is noninvasive, painless and offers uncomplicated drug administration as well as direct transport from the nasal cavity to the brain [33-35].

Some previous studies have proposed novel intranasal drug delivery systems such as ME as potential tools to improve the transportation and distribution of drugs into the brain because of their lipophilic nature and small globule size [36, 37]. MEs are thermodynamically stable systems with a homogeneous and transparent appearance that exhibit low viscosity. They are formed spontaneously under specific experimental conditions and adequate proportions of water, oil, surfactant and co-surfactant [38-40]. Improvement of drug absorption and modulation of drug release kinetics are some of the most representative advantages of MEs in the drug delivery process [41, 42]. Due to these advantages as well as other characteristics (reduced droplet size, ability to increase the solubility of poorly soluble drugs in aqueous medium, improved drug stability, biocompatibility, ability to cross biological membranes), MEs have been widely explored to enhance drug delivery to the CNS across nasal mucosa [37, 42].

The efficacy of pharmacological therapy by intranasal administration is contingent upon the correct formulation of the dosage form that allows rapid drug absorption across the nasal mucosa as well as its retention on the mucosa for a suitable period of time before being eliminated through nasal mucociliary clearance [43].

By taking into consideration the therapeutic potential of DPZ and the advantages offered by the intranasal route as an alternative for drug administration, the aim of this study was to design, develop and characterize a DPZ-ME for nose-to-brain delivery in order to treat AD.

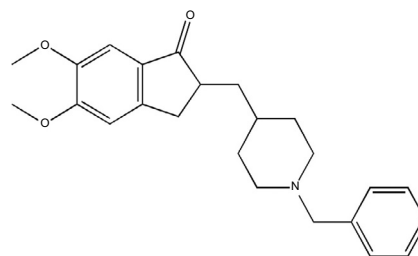


Fig. (1). Chemical structure of DPZ.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Materials

DPZ was purchased from Capot Chemical (Hangzhou, China). Labrasol, Transcutol-P, Plurol olique CC 497, Labrafac lipophile WL 1349 and Labrafil M1944 CS were provided as gift samples from Gattefossé (Saint-priest, France). Propylene glycol, HPLC-grade methanol (MeOH), potassium dihydrogen orthophosphate, trimethylamine and orthophosphoric acid were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. DPZ Quantification Methodology

The amount of DPZ in developed formulation was determined by UV spectroscopy using Thermo Spectronic Helios Beta UV-Visible Spectrophotometer at a wavelength of 230 nm and at room temperature. The validation of this analytical method was based on the following criteria: selectivity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification. A stock solution of DPZ of 100 µg/ml was prepared using methanol:water (1:1) as solvent. This stock solution was scanned in the range of 220-250 nm in order to determine the λ_{\max} value. Finally, the calibration curve of DPZ was plotted in the concentration range of 0.9375-100 µg/ml.

For permeation and release studies, DPZ was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using the Waters Alliance 2695 separations module and a Kromasil C₁₈ column (250×4.6 mm, I.D., 5µm). The mobile phase was a mixture of methanol and buffer (40:60 v/v) at a flow rate of 1.2 ml/min. The buffer was composed of potassium dihydrogen orthophosphate 0.05 M, water and trimethylamine, whose pH was adjusted to 2.3 ± 0.05 with orthophosphoric acid, using an injection volume of 20 µl and finally the elute was analyzed at 268 nm.

2.3. Solubility Study

The solubility of DPZ was determined in oils and surfactants Pluronic CC 497, Labrafac lipophile WL 1349, Labrafil M1944 CS, castor oil, Tween 80, Labrasol, Transcutol-P and propylene glycol. An excess of DPZ was added to 2 ml of these oils and surfactants and then mixed under stirring for 8 h at 25°C. After equilibrium for 24 h at room temperature, samples were centrifuged at 9000 rpm for 15 min. The supernatant was diluted using a water:methanol (50:50 v/v) solution. The concentration of solubilized DPZ was determined spectrophotometrically at 230 nm.

2.4. Construction of Phase Diagram

Pseudo-ternary phase diagram was constructed by spontaneous emulsification method using the components that showed a high solubilizing capacity for DPZ. Labrasol as nonionic surfactant as well as propylene glycol and Transcutol-P as co-surfactants, castor oil as the oil phase and purified water as the aqueous phase. Mixture labrasol and Transcutol-P were mixed in different ratios (1:1, 2:1 and 3:1) in order to yield three pseudo-ternary phase diagrams, whereas the ratio Transcutol-P:propylene glycol was maintained at 1:0.6 in all diagrams. Surfactant and cosurfactants mixture (S_{mix}) was mixed with castor oil at different ratios from 9:1 to 1:9. Finally, water was added progressively under stirring for 5 min. The determination of the emulsification region was performed by visual observation where the monophasic, transparent and homogeneous combinations were placed inside the emulsification area to obtain the boundaries of phases formed in the phase pseudo-ternary phase diagram.

2.5. Preparation of DPZ-ME

A predetermined amount of DPZ was added to castor oil. Labrasol, Transcutol-P and propylene glycol were added and mixed under stirring at 700 rpm until total dissolution of drug. Finally, water was incorporated dropwise under con-

tinuous stirring at 700 rpm until a transparent and homogeneous ME was produced.

2.6. Physicochemical Characterization of DPZ-ME

2.6.1. pH, Viscosity and Rheological Behavior

The pH of DPZ-ME was determined at room temperature using a calibrated digital pH meter GLP 22 (Crison Instruments, Barcelona, Spain). Viscosity and rheological profiles were performed without dilution at increasing shear rates (25 s⁻¹, 50 s⁻¹ and 100 s⁻¹) and at 25°C using a Haake RheoStress 1 rheometer (Termo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany). All measurements were performed in triplicate.

2.6.2. Droplet Size, Polydispersity Index and Zeta Potential

Droplet size, polydispersity index (PI) and zeta potential values of DPZ-ME were measured in triplicate by dynamic light scattering (DLS) at 25°C using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK).

2.6.3. Morphological Characterization

The morphology of DPZ-ME was examined by transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL 1010 (Aki-shima, Japan). A sample drop was analyzed by negative staining with uranyl acetate.

2.7. Stability Studies

Developed DPZ-ME was subjected to stability studies for a period of 4 weeks at different temperature conditions: room temperature, 4°C and 40°C. After predetermined time intervals (0, 7, 15 and 30 days) the DPZ-ME was characterized for physical and chemical stability parameters, such as: pH, droplet size, PI and drug content. In addition, the long-term stability of DPZ-ME was predicted using the TurbiScan Lab[®] (Formulation Co., L'Union, France) to measure back-scattering and transmission of droplet dispersed in solution, thereby detecting droplet size and location changes [44]. This assay was performed at room temperature using 20 ml of the formulation at time zero. The sample was analyzed for 24 h and the data were obtained at 1 h intervals.

2.8. In vitro Release Study

The release study was performed using Franz diffusion cells (Vidra Foc, Barcelona, Spain). The solubility of the drug was determined in different solvents: water, methanol, methanol:water (50:50 v/v), Transcutol-P:water (50:50 v/v) and methanol:Transcutol-P (50:50 v/v) to choose the medium that best maintained sink conditions throughout the entire experiment. Finally, methanol:Transcutol-P (50:50 v/v) was selected as receptor medium for this assay. The drug release profile was performed using a dialysis membrane with a pore size of 12-14 kDa and diffusion area of 2.54 cm². The membrane was mounted between the donor and receptor compartment which was subsequently filled with 15 ml of receptor medium and maintained at 37°C under stirring, while 1 ml of DPZ-ME was placed in the donor compartment. At pre-established intervals (5, 15, 60, 120, 240, 440, 1200 and 1440 min) aliquots of 200 µl were withdrawn and replaced with the same volume of fresh receptor

medium. The concentration of released DPZ was determined by HPLC at 268 nm as previously described. The study was performed in triplicate and the results were analyzed to determine the release kinetic model using several equations: Hyperbola, Higuchi, first order, Weibull and the Korsmeyer-Peppas equation. The Akaike Information Criterion (AIC) was determined for each model as an indicator of the model's suitability for a given dataset [45]. The model selected was the one with the lowest AIC value.

2.9. Ex Vivo Permeation Studies

Drug permeation studies were also conducted using Franz diffusion cells (Vidra Foc, Barcelona, Spain) with a permeation area of 0.64 cm². In this case porcine nasal mucosa was used as permeation membrane. For this task fresh porcine mucosae were obtained from the Animal Facility of the Faculty of Medicine (University of Barcelona). Porcine nasal mucosa was cut using an Aesculap GA 630 dermatome (Aesculap, Tuttlingen, Germany) into pieces of mucosa with thicknesses of 500±100 µm. The nasal mucosa membranes were mounted between the receptor and donor compartment. The receptor compartment was filled with 6 ml of Transcutol-P:water (50:50 v/v) and maintained at 37±1°C under continuous stirring. This medium provided the best dissolution properties. Samples (200 µl) of DPZ-ME were placed on the donor compartment for a period of 6 h during which samples of 300 µl were withdrawn from the receptor compartment at different time intervals (5, 15, 60, 120, 240, 300 and 360 min) and replaced with an equal volume of receptor medium. Samples were then analyzed by HPLC at 268 nm to determine the amount of drug diffused to the receptor compartment. The study was performed in triplicate and mean values of the percentage of drug diffused were reported and plotted versus time.

2.10. Determination of the Amount of Drug Remaining in the Nasal Mucosa

After permeation studies the porcine nasal mucosa used as membrane was removed from the Franz diffusion cell and cleaned with distilled water. The nasal mucosa was placed in a vial with 1 ml of water:methanol solvent (50:50 v/v) and subjected to sonication for 20 min using an ultrasonic bath. The amount of DPZ extracted was determined by HPLC at 268 nm. The study was performed in triplicate and the extracted amount of DPZ was reported as median, minimum and maximum values.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

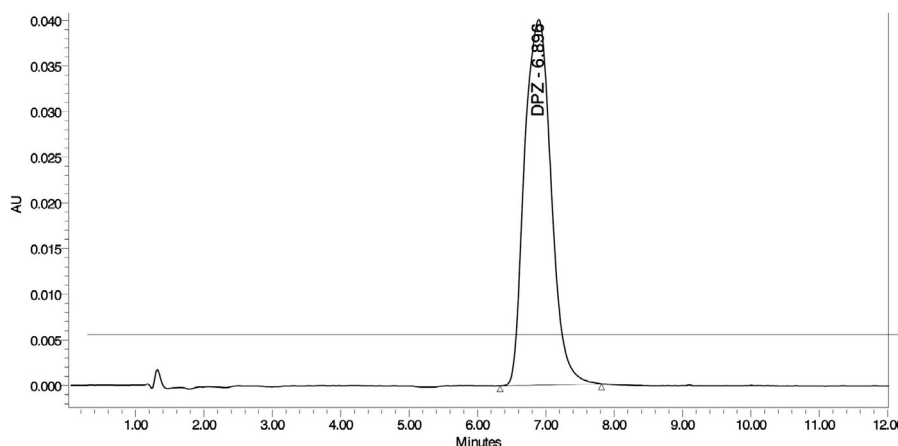
3.1. DPZ Determination

The validation of UV spectroscopic method met all criteria of selectivity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification. Spectra showed maximum absorbance at a wavelength of 230 nm when the standard solution of DPZ was scanned. Calibration curve indicated a correlation coefficient (r^2) value of 0.9993 in the concentration range of 0.9375-100 µg/ml.

For HPLC validation the calibration curve of DPZ was found to be linear in the concentration range of 0.234-60 µg/ml. In addition, it assured the quantification of the drug in small amounts contained in the samples to be analyzed. As shown in the chromatogram of DPZ (Fig. 2), the resolution of the peak is satisfactory without any interference present, so the integration of the peak is accurate [46].

3.2. DPZ Solubility

The solubility study allowed selecting the suitable components to load DPZ into the ME system. The intranasal drug



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	DPZ	6.896	1083438	100.00	40057	60.000	ppm

Fig. (2). Chromatogram of DPZ.

delivery systems require minimal administration volume, hence the components of ME should exhibit high solubilizing potential for the drug [42]. Solubility study of DPZ was performed using different oils, surfactants and co-surfactants. The obtained results are reported in Table 1. Among oils, castor oil exhibited the highest solubility capacity (5.82 ± 1.13 mg/ml). Among assayed surfactants and co-surfactants, Transcutol-P showed the highest solubilizing capacity for drug (19.16 mg/ml) along with propylene glycol (10.19 mg/ml), which also has permeation enhancing properties.

Table 1. Solubility study of DPZ in different oils, surfactants and co-surfactants.

Ingredient	Solubility (mg/ml)
Plurol olique CC 497	0.32 ± 0.12
Labrafac lipophile WL 1349	0.01 ± 0.00
Labrafil M1944 CS	1.06 ± 0.58
Castor oil	5.82 ± 1.13
Tween 80	3.17 ± 3.80
Labrasol	18.08 ± 0.36
Transcutol P	19.16 ± 0.61
Propylene glycol	10.19 ± 0.88

3.3. Phase Diagram Study and ME Formulation

Ingredients of the ME system for the development of intranasal formulations systems should be selected in accordance with the U.S. FDA as non-irritating, pharmaceutically acceptable substances that fall within the Generally Regarded As Safe (GRAS) category [43].

Three pseudo-ternary phase diagrams were constructed using the components that exhibited high solubilizing capacity for DPZ (Fig. 3). Different ratios of Labrasol and Transcutol-P were assayed (1:1, 2:1 and 3:1) whereas the ratio between Transcutol-P and propylene glycol was maintained at 1:0.6 in each case. As shown in Fig. 3, the ME region was greater for S_{mix} 3:1. Therefore, it was selected as the optimal S_{mix} for the incorporation of the drug. DPZ was easily dissolved in the ME because of its high solubility in all the components. Phase diagram allowed selecting a suitable concentration of components in the ME. The monophasic and transparent combinations are inside the ME area while in the other region of the ternary diagram are combinations that are turbid and not monophasic [47]. The final formulation was selected among those within the ME region. Labrasol has been used as nonionic O/W surfactant with a hydrophilic lipophilic balance (HLB) value of 14, as it acts as a vehicle for poorly water-soluble drugs [48]. However, the formation of a stable ME usually requires the addition of co-surfactants to achieve the reduction of interfacial tension necessary to obtain ME over an extended range of composition [49]. Thus, Transcutol-P and propylene glycol were used as co-surfactants in this study because Transcutol-P with

HLB value of 4.2 showed the highest solubilizing capacity for DPZ. Furthermore, it promotes the formation of transparent and stable MEs [43, 50].

The selected intranasal ME containing DPZ (12.5 mg/ml) was composed of purified water as the aqueous phase, castor oil as the oil phase, Labrasol as nonionic surfactant, Transcutol-P and propylene glycol as co-surfactants. The composition formula used for the preparation of the ME is detailed in Table 2, which resulted in a transparent, homogeneous and monophasic ME.

Recent studies provide evidence that Transcutol-P could improve the intranasal absorption of drugs, especially lipophilic ones such as DPZ [20, 51]. Furthermore, other components of our ME also possess reported permeation enhancing properties such as propylene glycol [52] and Labrasol, which has also been suggested to be a permeation enhancer in intranasal delivery systems [53].

Table 2. Composition of the ME.

Components	% (w/w)
Castor oil	5.00
Labrasol	52.2
Transcutol P	17.4
Propylene glycol	10.4
Water	15

3.4. Physicochemical Characterization of DPZ-ME

The results of physicochemical characterization are tabulated in Table 3. The pH of the ME was 6.38, which falls within the ideal pH range (4.5-6.5) of a formulation for intranasal application, consequently suggesting that the formulation would avoid nasal irritation and ensure drug absorption [54, 55]. The control of this parameter is necessary because at alkaline pH the lysozyme in the nasal mucosa becomes inactive, therefore pH of the formulation should be slightly acidic [56].

Viscosity and rheological behavior are essential criteria in the development of products in both pharmaceutical and cosmetic fields [57]. All fluid will deform to a greater or lesser extent when it is subjected to a system of external forces. The rheogram of the DPZ-ME is depicted in Fig. (4). A linear relationship between the shear stress and the strain rate can be observed which is indicative of a Newtonian behavior. The flow curve represents the shear stress versus the strain rate, while the viscosity curve represents the viscosity versus the strain rate. The data in Fig. 4 (flow curve) shows that the viscosity value is the tangent of the angle forming the shear force and the strain rate, which is constant for any applied value [56]. The Newtonian behavior of the ME makes it ideal for nasal spray application because it is able to deliver the drug in difficult to reach anatomical areas [55, 58]. Viscosity plays a vital role in nasal administration formulations because it influences the residence time of drug in

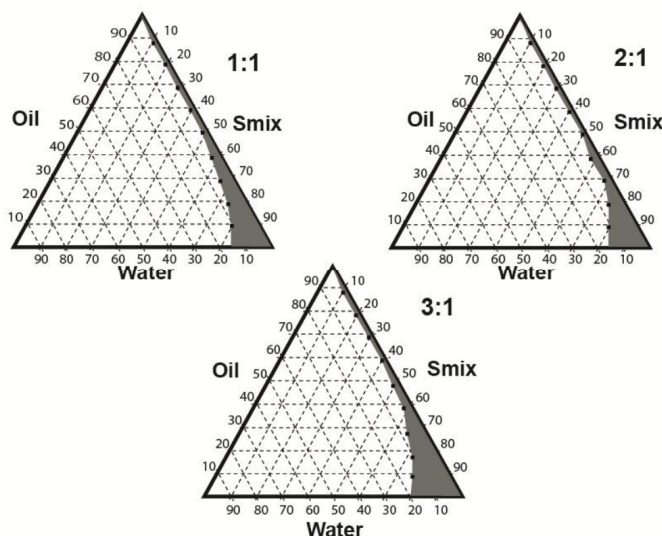


Fig. (3). Pseudo-ternary phase diagrams showing emulsification region at different weight ratios 1:1, 2:1 and 3:1.

the nasal cavity [56]. The viscosity of DPZ-ME was $44.69 \pm 6.286 \cdot 10^{-2}$ mPa·s, indicating low viscosity. A high viscosity of the formula helps to prevent loss of the product to the nasal vestibule or nasopharynx, however very high viscosities stimulate the cleaning mechanism, whereas the lower the viscosity of the vehicle then the greater the drug release because it will have a higher diffusion coefficient [54, 59]. Drug delivery systems with low viscosity provide high tolerance and are easy to handle and thus allow hassle-free administration of formulations [60, 61].

drug release as well as drug absorption. Accordingly, the droplet size should be less than 150 nm in MEs [62, 63]. The monodisperse property of the formulation provides appropriate physical stability because creaming is prevented by Brownian movement [37]. The mean droplet size of DPZ-ME was 58.9 ± 3.2 nm with a PI value of 0.19 ± 0.04 , which suggests uniformity of globule size in the formulation and indicated that the DPZ-ME could present an adequate drug release [64].

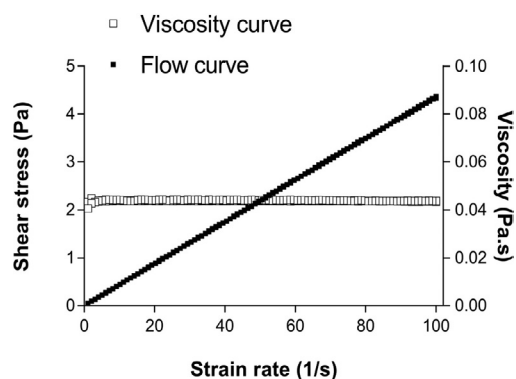


Fig. (4). Rheogram of the DPZ-ME showing flow and viscosity curves of the formulation.

The droplet size and the PI are crucial parameters in the development of MEs. The droplet size determines the bioavailability because it influences the rate and extent of

Table 3. Physicochemical parameters of DPZ-ME.

Parameters	Mean \pm SD
Viscosity (mPa·s)	$44.69 \pm 6.286 \cdot 10^{-2}$
pH	6.38
Droplet size (nm)	58.9 ± 3.2
Polydispersity index	0.19 ± 0.04

Morphological analysis of DPZ-ME using TEM showed the spherical shape of the lipid droplets in addition to their smooth and regular surface. This examination took place in accordance with a droplet size of approximately 60 nm (Fig. 5).

3.5. Stability Assays

Among the methods that have been reported on for the stability of the formulations, TurbiScanLab[®] is an optical analyzer instrument which detects the destabilization process of the formulation by measuring backscattering (BS) and

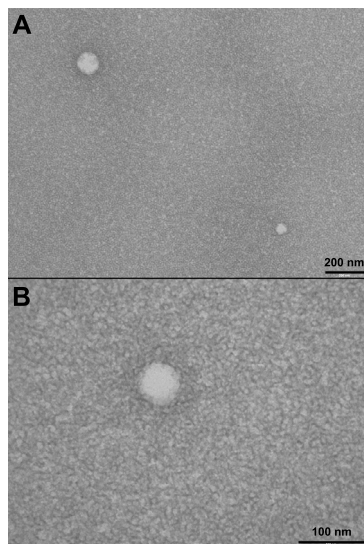


Fig. (5). Transmission electron microscopy images of DPZ-ME at different resolutions; **A:** 60,000 \times , **B:** 75,000 \times .

transmission (T) signals resulting from changes in the volume and size of the particles [65]. This measurement offers information about the type of destabilization phenomena: particle migration (a reversible process like creaming or sedimentation) or droplet size change (an irreversible process like flocculation or coalescence) [66]. Fig. 6 shows the transmission profile of a DPZ-loaded ME after 24 h. The left side of the curve corresponds to the bottom of the vial while the right side corresponds to the behavior of the sample on the top of the vial. There is no variation of droplet size when

the T profile has a deviation of $\pm 2\%$ or less whereas deviations up to $\pm 10\%$ indicate an unstable formulation. The obtained T profile reflects the stability of the dispersion with fluctuations in the T signals lower than 2%. Therefore, no aggregation phenomena, sedimentation or creaming process were expected to occur in the DPZ-ME (after 24 h). Fig. 6 shows peaks located at the top and the bottom of the vial that correspond to the meniscus, which is formed by the contact between the sample and the glass [58].

Moreover, the DPZ-ME was subjected to stability studies for four weeks at room temperature, 4°C and 40°C. After predetermined time intervals (0, 7, 15 and 30 days), the DPZ-ME was characterized by physical and chemical stability, such as: pH, droplet size, PI and drug content. No significant changes in organoleptic characteristics were detected at room temperature after storage. The pH values were maintained over time within the range suitable for intranasal application (4.5-6.5) [54]. The droplet size values exhibited a slight but not significant increase over the assay time at room temperature. Conversely, the droplet size for samples stored at 4 and 40°C increased significantly, thereby producing increased IP values for both samples (stored at 4°C and 40°C), confirming the presence of a wide polydispersity of values and also the formation of small agglomerations at these temperatures. Finally, the percentage of drug content was maintained at 100% throughout the analysis time at room temperature as well as at 4°C and 40°C, ensuring high stability of DPZ at temperature variations.

3.6. *In Vitro* Release Study of DPZ-ME

In vitro release study of DPZ was successfully done using samples collected from the receptor medium at predetermined time intervals. The results of the concentration of released DPZ are shown in Fig. 7. According to this profile, the formulation showed sustained release for DPZ and it was faster during the first 4 h. In order to study the mechanism of DPZ release from ME, the results were fitted to several

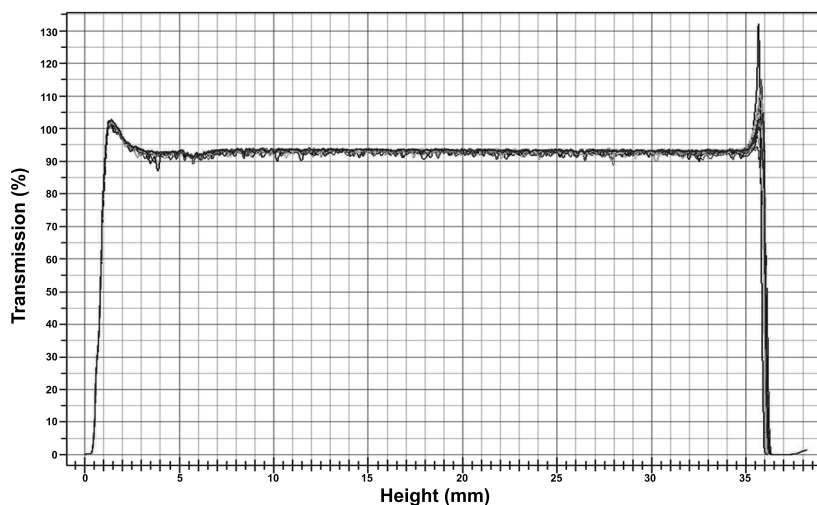


Fig. (6). Transmission profiles of DPZ-ME after 24 h.

kinetic equations: Hyperbola, Higuchi, first order, Weibull and the Korsmeyer-Peppas equation. Based on the lowest AIC value the hyperbola kinetic model was the model that statistically best described the release mechanism of DPZ with a release constant (K_d) of 238.5 h^{-1} and a total release of drug after 24 h of 74.66% of the starting dose (Table 4). On the other hand, the adjustment by the kinetic models of Korsmeyer-Peppas and Weibull was not possible. The equation of the kinetic model of hyperbola describes the binding of a ligand to a receptor following the mass action law, where B_{\max} is the maximum binding and K_d is the concentration of ligand required to reach the maximum mean union [67]. The evaluation of the release kinetic model is an important parameter in the development of formulations because the mathematical model is useful for evaluating the excipients' effect on the drug release. It is a helpful tool that accelerates the development of the product and helps evaluate its quality because it detects changes in the formulation over time [52, 58].

Table 4. Parameters of kinetic models.

	AIC	Parameter	Unit	Value (CV%)
Hyperbola	77.99	K_d	h^{-1}	238.53 (21.27)
Higuchi	108.18	K_h	$\text{h}^{-1/2}$	406.99 (0.14)
First order	92.75	K_o	h^{-1}	0.00386 (1.04)

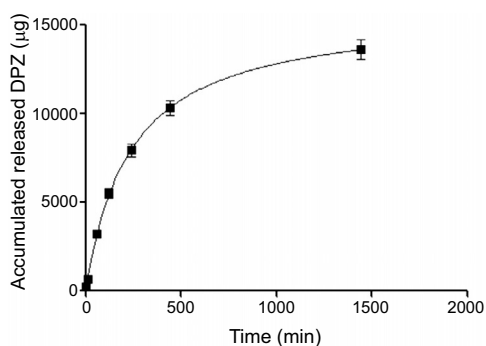


Fig. (7). *In vitro* release results of DPZ-ME, each point represent the mean value of 3 replicates \pm SD.

3.7. Ex Vivo Permeation Study of DPZ-ME

In order to study the intrinsic ability of DPZ to cross the nasal mucosa, a transmembrane permeation study of DPZ using porcine nasal mucosa as permeation membrane was performed in order to simulate the actual *in vivo* barrier to drug diffusion. Fig. (8) shows the *ex vivo* permeation profile of DPZ-loaded ME and Table 5 details the minimum, maximum and median values of Y_{\max} (maximum amount of drug permeated), K (permeation rate constant) and the half-life of the accumulated amount of drug that permeated nasal mucosa.

Table 5. Median, minimum and maximum values of Y_{\max} , K and half-life of cumulative amount of drug permeated across nasal mucosa.

	Median (min-max)	Unit
Y_{\max}	993.80 (524.10-2321.00)	μg
K	0.004774 (0.003143-0.006939)	min^{-1}
Half-life	145.20 (99.89-220.50)	min

The graphical representation of the permeation time versus accumulated amounts of drug (μg) showed that the highest permeation occurred during the first 4 h and the maximum permeated amount was approximately 2000 μg , which corresponds to 80% of the starting drug. This percentage can be attributed to Labrasol that has been reported as an enhancer of bioavailability as well as a promoter of the solubility and permeation of active ingredient [43]. Additionally, the evaporation of volatile excipients of ME is likely to occur and thus influences drug permeation. DPZ diffused through the fresh porcine nasal mucosa at 80% of the initial seeded amount, which presented constant amounts of drug at the predetermined times. The variability that is present is usually observed when working with this type of biological material.

The process demonstrated that the release of DPZ is controlled by passive diffusion, which is the most significant transport mechanism for most drugs where the physico-chemical properties of both the drug and the permeation barrier are the main determinants of drug delivery rate [68].

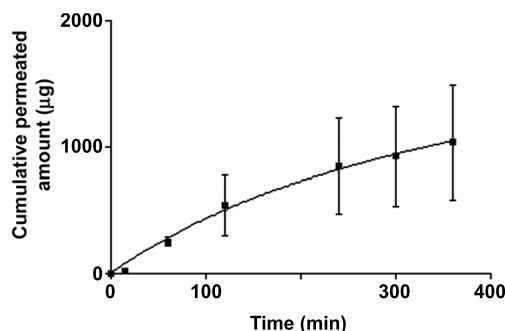


Fig. (8). *Ex vivo* permeation profile of DPZ-ME through porcine nasal mucosa membrane.

3.8. Determination of Amount of Drug Remaining in Nasal Mucosa

At the end of the permeation study, the pig nasal mucosa was treated with an extraction solution of water-methanol (50:50, v/v) to extract the drug from the mucosa. The maximum amount of DPZ retained after 6 h of the treatment was 812.9 μg per gram of tissue, equivalent to 32.52% of the initial DPZ dose placed in the donor compartment. These values suggested that the mucosa acted as a reservoir, which allows sustained release of the drug to the brain [45].

Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion

The high permeation level of the DPZ-ME to the nasal mucosa was attributed to the presence of excipients such as Transcutol-P and propylene glycol in the formulation having permeation enhancing properties.

CONCLUSION

A transparent and homogeneous DPZ-ME (12.5 mg/ml) was successfully developed with a mean droplet size of 58.9 nm and low PI, which suggests uniformity of globule size in the formulation. The lipid droplets had spherical shape and smooth and regular surface. The ME has a Newtonian flow and a viscosity value less than 50 mPa, which facilitates administration by intranasal sprays. The study using TurbiScanLab® to detect any destabilization process evidenced the stability of the dispersion with fluctuations in the transmission signals lower than 2% while the results of the physico-chemical characterization after 30 days demonstrated that the ME is stable and does not present significant changes in organoleptic characteristics. *In vitro* release study of DPZ indicated that the ME follows a kinetic model of Hyperbola, ensuring prolonged release of the drug, while the *ex vivo* permeation profile demonstrated that the highest permeation occurred during the initial 4 h and the maximum permeated amount was approximately 2000 µg, which corresponds to 80% of the starting drug.

LIST OF ABBREVIATIONS

AD	=	Alzheimer's Disease
ADLs	=	Activities of Daily Living
ACh	=	Acetylcholine
AChE	=	Acetylcholinesterase
CNS	=	Central Nervous System
ChEIs	=	Ccholinesterase Inhibitors
DPZ	=	Donepezil
FDA	=	Food and Drug Administration
MEs	=	Microemulsions
HPLC	=	High-performance Liquid Chromatography
TEM	=	Transmission Electron Microscopy
S _{mix}	=	Surfactant and Cosurfactants Mixture
AIC	=	Akaike Information Criteria
PI	=	Polydispersity Index
DLS	=	Dynamic Light Scattering
BS	=	Backscattering
T	=	Transmission

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are base of this research.

CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, 2018, Vol. 17, No. 1 51**CONSENT FOR PUBLICATION**

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation MAT 2014-59134R is gratefully acknowledged. Lupe Carolina Espinoza and Marisol Vacacela gratefully acknowledge the financial support from Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Sensescyt - Ecuador) and Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador. The authors would also like to thank Gattefossé for their kind provision of excipients necessary for the formulation. Jonathan Proctor (M.Ed.) and Vladimir Morcho (Ph.D.) are also acknowledged for their review and suggestions in the drafting of the manuscript.

REFERENCES

- [1] Wilkinson D, Schindler R, Schwam E, *et al.* Effectiveness of donepezil in reducing clinical worsening in patients with mild-to-moderate alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2009; 28(3): 244-51.
- [2] Spuch C, Navarro C. Liposomes for targeted delivery of active agents against neurodegenerative diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). *J Drug Deliv* 2011; 2011: 469679.
- [3] Onofri E, Mercuri M, Archer T, Rapp-Ricciardi M, Ricci S. Legal medical consideration of Alzheimer's disease patients' dysgraphia and cognitive dysfunction: a 6 month follow up. *Clin Interv Aging* 2016; 11: 279-84.
- [4] Colovic M, Krstic D, Lazarevic-Pasti T, Bondzic A. Acetylcholinesterase Inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11(3): 315-35.
- [5] Ferreira-Vieira T, Guimaraes I, Silva F, Ribeiro F. Alzheimer's Disease: targeting the cholinergic system. *Curr Neuropharmacol* 2016; 14(1): 101-15.
- [6] Terry AV, Jr., Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(3): 821-7.
- [7] Contestabile A. The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res* 2011; 221(2): 334-40.
- [8] Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35(6): 1397-409.
- [9] Meguro K, Kasai M, Meguro M, Ishii H, Yamaguchi S. Donepezil and life expectancy in Alzheimer's disease: a retrospective analysis in the Tajiri Project. *BMC Neurol* 2014; 14: 83.
- [10] Cacabelo R. Donepezil in Alzheimer's disease: from conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2007; 3(3): 303-33.
- [11] Unzeta M, Esteban G, Bolea I, *et al.* Multi-Target directed donepezil-like ligands for Alzheimer's disease. *Front Neurosci* 2016; 10: 205.
- [12] Bautista-Aguilera OM, Esteban G, Chioua M, *et al.* Multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: design, synthesis, biochemical evaluation, ADMET, molecular modeling, and QSAR analysis of novel donepezil-pyridyl hybrids. *Drug Des Devel Ther* 2014; 8: 1893-910.
- [13] Hashimoto K. Activation of sigma-1 receptor chaperone in the treatment of neuropsychiatric diseases and its clinical implication. *J Pharmacol Sci* 2015; 127(1): 6-9.

- [14] Maurice T. Protection by sigma-1 receptor agonists is synergic with donepezil, but not with memantine, in a mouse model of amyloid-induced memory impairments. *Behav Brain Res* 2016; 296: 270-8.
- [15] Bhavna, Md S, Ali M, *et al.* Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: *in vitro* and *in vivo* safety evaluation. *Int J Biol Macromol* 2014; 67: 418-25.
- [16] Singh BK, Srivastava RK, Kumar S, Dutta PK. Stability-Indicative HPLC determination of Donepezil Hydrochloride in tablet dosage form. *Pharm Chem J* 2012; 45(12): 766-70.
- [17] Sugimoto H, Ogura H, Arai Y, Iimura Y, Yamanishi Y. Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *Jpn J Pharmacol* 2002; 89(1): 7-20.
- [18] Racchi M, Mazzucchelli M, Porrello E, Lanni C, Govoni S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol Res* 2004; 50(4): 441-51.
- [19] Jackson S, Ham R, Wilkinson D. The safety and tolerability of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58(S1): 1-8.
- [20] Sozio P, Cerasa LS, Marinelli L, Di Stefano A. Transdermal donepezil on the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2012; 8: 361-8.
- [21] Deardorff WJ, Grossberg GT. A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther* 2016; 10: 3267-79.
- [22] Chase TN, Farlow MR, Clarence-Smith K. Donepezil plus solifenacin (cpc-201) treatment for alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 2017; 14(2): 405-16.
- [23] Ravic M, Warrington S, Boyce M, Dunn K, Johnston A. Repeated dosing with donepezil does not affect the safety, tolerability or pharmacokinetics of single-dose thioridazine in young volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58(S1): 34-40.
- [24] Liew KB, Tan YT, Peh KK. Characterization of oral disintegrating film containing donepezil for Alzheimer disease. *AAPS Pharm Sci Tech* 2012; 13(1): 134-42.
- [25] Fonseca-Santos B, Gremiao MP, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Nanomed* 2015; 10: 4981-5003.
- [26] Azizi M, Esmaili F, Partoazar A, Ejtemaei Mehr S, Amani A. Efficacy of nano- and microemulsion-based topical gels in delivery of ibuprofen: an *in vivo* study. *J Microencapsul* 2017; 31: 1-7.
- [27] Lochhead JJ, Thome RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64(7): 614-28.
- [28] Yarragudi SB, Richter R, Lee H, *et al.* Formulation of olfactory-targeted microparticles with tamarind seed polysaccharide to improve nose-to-brain transport of drugs. *Carbohydr Polym* 2017; 163: 216-26.
- [29] Khan S, Patil K, Bobade N, Yeole P, Gaikwad R. Formulation of intranasal mucoadhesive temperature-mediated in situ gel containing ropinirole and evaluation of brain targeting efficiency in rats. *J Drug Target* 2010; 18(3): 223-34.
- [30] Touitou E, Illum L. Nasal drug delivery. *Drug Deliv Transl Res* 2013; 3(1): 1-3.
- [31] Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, Quay SC. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm* 2007; 337(1-2): 1-24.
- [32] Pardeshi CV, Belgamwar VS. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv* 2013; 10(7): 957-72.
- [33] Fortuna A, Alves G, Serralheiro A, Sousa J, Falcao A. Intranasal delivery of systemic-acting drugs: small-molecules and biomacromolecules. *Eur J Pharm Biopharm* 2014; 88(1): 8-27.
- [34] Ayoub AM, Ibrahim MM, Abdallah MH, Mahdy MA. Sulpiride microemulsions as antipsychotic nasal drug delivery systems: *In vitro* and pharmacodynamic study. *J Drug Deliv Sci Technol* 2016; 36: 10-22.
- [35] Shah V, Sharma M, Pandya R, *et al.* Quality by Design approach for an in situ gelling microemulsion of Lorazepam *via* intranasal route. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 75: 1231-41.
- [36] Kumar A, Pandey AN, Jain SK. Nasal-nanotechnology: revolution for efficient therapeutics delivery. *Drug Deliv* 2016; 23(3): 681-93.
- [37] Lalani J, Baradia D, Lalani R, Misra A. Brain targeted intranasal delivery of tramadol: comparative study of microemulsion and nanoemulsion. *Pharm Dev Technol* 2014: 1-10.
- [38] Chiappisi L, Noirez L, Gradzielski M. A journey through the phase diagram of a pharmaceutically relevant microemulsion system. *J Colloid Interface Sci* 2016; 473: 52-9.
- [39] Puri A, Kaur A, Raza K, Goindi S, Katare OP. Development and evaluation of topical microemulsion of dibenzoylmethane for treatment of UV induced photoaging. *J Drug Deliv Sci Technol* 2017; 37: 1-12.
- [40] Li L, Nandi I, Kim K. Development of an ethyl laurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam. *Int J Pharm* 2002; 2367(1-2): 77-85.
- [41] Shinde RL, Devarajan PV. Docosahexaenoic acid-mediated, targeted and sustained brain delivery of curcumin microemulsion. *Drug Deliv* 2017; 24(1): 152-61.
- [42] Mandal S, Mandal SD, Chuttani K, Sawant KK, Subudhi BB. Design and evaluation of mucoadhesive microemulsion for neuroprotective effect of ibuprofen following intranasal route in the MPTP mice model. *Drug Dev Ind Pharm* 2016; 42(8): 1340-50.
- [43] Shah BM, Misra M, Shishoo CJ, Padh H. Nose to brain microemulsion-based drug delivery system of rivastigmine: formulation and *ex-vivo* characterization. *Drug Deliv* 2015; 22(7): 918-30.
- [44] Sanchez-Lopez E, Egea MA, Cano A, *et al.* PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen-*in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016; 145: 241-50.
- [45] Fernandez-Campos F, Clares Naveros B, Lopez Serrano O, Alonso Merino C, Calpena Campmany AC. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. *Mycoses* 2013; 56(1): 70-81.
- [46] Shabir G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr* 2003; 987(1-2): 57-66.
- [47] Ustundag Okur N, Caglar ES, Arpa MD, Karasulu HY. Preparation and evaluation of novel microemulsion-based hydrogels for dermal delivery of benzocaine. *Pharm Dev Technol* 2017; 22(4): 500-10.
- [48] Solanki SS, Sarkar B, Dhanwanj RK. Microemulsion drug delivery system: for bioavailability enhancement of amprolopin. *ISRN Pharm* 2012; 2012: 108164.
- [49] Xavier-Junior FH, Vauthier C, Morais AR, Alencar EN, Egitto ES. Microemulsion systems containing bioactive natural oils: an overview on the state of the art. *Drug Dev Ind Pharm* 2017; 43(5): 700-14.
- [50] Szumala P. Structure of Microemulsion Formulated with Monoacylglycerols in the Presence of Polyols and Ethanol. *J Surfactants Deterg* 2015; 18: 97-106.
- [51] Wang S, Chen P, Zhang L, Yang C, Zhai G. Formulation and evaluation of microemulsion-based *in situ* ion-sensitive gelling systems for intranasal administration of curcumin. *J Drug Target* 2012; 20(10): 831-40.
- [52] Acharya SP, Pundarikakshudu K, Panchal A, Lalwani A. Development of carbamazepine transnasal microemulsion for treatment of epilepsy. *Drug Deliv Transl Res* 2013; 3(3): 252-9.
- [53] Cho HJ, Ku WS, Termsarasab U, *et al.* Development of udenafil-loaded microemulsions for intranasal delivery: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Int J Pharm* 2012; 423(2): 153-60.
- [54] Thorat S. Formulation and product development of nasal spray: an overview. *SJAMS* 2016; 4(8D): 2976-85.
- [55] Pathak R, Prasad R, Misra M, Nivsarkar M. Role of mucoadhesive polymers in enhancing delivery of nimodipine microemulsion to brain via intranasal route. *Acta Pharm Sin B* 2014; 4(2): 151-60.
- [56] Patel N, Baldaniya M, Raval M, Sheth N. Formulation and development of in situ nasal gelling systems for quetiapine fumarate-loaded mucoadhesive microemulsion. *J Pharm Innov* 2015; 10(4): 357-73.
- [57] Wei Lu G, Gao P. Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. *Handbook of non-invasive drug delivery system* Elsevier Inc. 2010: 59-94.
- [58] Fernandez Campos F, Calpena Campmany AC, Rodriguez Delgado G, Lopez Serrano O, Clares Naveros B. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. *J Pharm Sci* 2012; 101(10): 3739-52.
- [59] Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 175-93.

Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion**CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, 2018, Vol. 17, No. 1 53**

- [60] Broniarz-Press L, Sosnowski T, Matuszak M, Ochowiak M, Jablczynska K. The effect of shear and extensional viscosities on atomization of Newtonian and non-Newtonian fluids in ultrasonic inhaler. *Int J Pharm* 2015; 485(1-2): 41-9.
- [61] Yuan Y, Che X, Zhao M, *et al.* Development of cyclosporine A microemulsion for parenteral delivery. *J Microencapsul.* 2015; 32(3): 273-80.
- [62] Patel MR, Hirani SN, Patel RB. Microemulsion for nasal delivery of Asenapine maleate in treatment of schizophrenia: formulation considerations. *J Pharm Invest* 2017; 18(2): 81-99.
- [63] Ma L, Fan Y, Wu H, *et al.* Tissue distribution and targeting evaluation of TMP after oral administration of TMP-loaded microemulsion to mice. *Drug Dev Ind Pharm* 2013; 39(12): 1951-8.
- [64] Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54(S1): S77-298.
- [65] Alvarado HL, Abrego G, Souto EB, *et al.* Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015; 130: 40-7.
- [66] Trotta M, Pattarino F, Ignoni T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53(2): 203-8.
- [67] Gallego-Yerga L, Posadas I, de la Torre C, *et al.* Docetaxel-loaded nanoparticles assembled from beta-cyclodextrin/calixarene giant surfactants: physicochemical properties and cytotoxic effect in prostate cancer and glioblastoma cells. *Front Pharmacol* 2017; 8: 249.
- [68] Campbell SD, Regina KJ, Kharasch ED. Significance of lipid composition in a blood-brain barrier-mimetic PAMPA assay. *J Biomol Screen* 2014; 19(3): 437-44.

3.2. Artículo 2

Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil

Lupe Carolina Espinoza^{1,2}, Marcelle Silva-Abreu^{1,3}, Beatriz Clares^{3,4,7}, María José Rodríguez-Lagunas^{5,6}, Lyda Halbaut¹, María-Alexandra Cañas⁵ and Ana Cristina Calpena^{1,3,*}

¹ Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

² Departamento de Química y Ciencias Exactas, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja 1101608, Ecuador.

³ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

⁴ Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain.

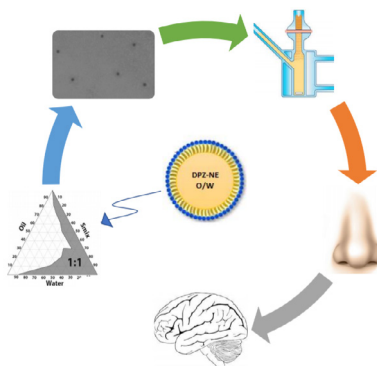
⁵ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

⁶ Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain.

⁷ Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, 18012 Granada, Spain.

<i>Revista:</i>	Pharmaceutics
<i>Año de publicación:</i>	2019
<i>ISSN:</i>	1999-4923
<i>Factor de impacto:</i>	4.773
<i>DOI:</i>	10.3390/pharmaceutics11020064

Graphical abstract



Article

Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil

Lupe Carolina Espinoza ^{1,2}, Marcelle Silva-Abreu ^{1,3}, Beatriz Clares ^{3,4,7},
 María José Rodríguez-Lagunas ^{5,6}, Lyda Halbaut ¹, María-Alexandra Cañas ⁵ and
 Ana Cristina Calpena ^{1,3,*}

¹ Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; lcespinoza@utpl.edu.ec (L.C.E.); marcellesabreu@gmail.com (M.S.-A.); halbaut@ub.edu (L.H.)

² Departamento de Química y Ciencias Exactas, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja 1101608, Ecuador

³ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; beatrizclares@ugr.es

⁴ Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain

⁵ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; mjrodriguez@ub.edu (M.J.R.-L.); mariaalexandra5@gmail.com (M.-A.C.)

⁶ Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain

⁷ Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, 18012 Granada, Spain

* Correspondence: anacalpena@ub.edu; Tel.: +34-93-402-4560

Received: 30 November 2018; Accepted: 29 January 2019; Published: 1 February 2019



Abstract: Donepezil (DPZ) is widely used in the treatment of Alzheimer's disease in tablet form for oral administration. The pharmacological efficacy of this drug can be enhanced by the use of intranasal administration because this route makes bypassing the blood–brain barrier (BBB) possible. The aim of this study was to develop a nanoemulsion (NE) as well as a nanoemulsion with a combination of bioadhesion and penetration enhancing properties (PNE) in order to facilitate the transport of DPZ from nose-to-brain. Composition of NE was established using three pseudo-ternary diagrams and PNE was developed by incorporating Pluronic F-127 to the aqueous phase. Parameters such as physical properties, stability, in vitro release profile, and ex vivo permeation were determined for both formulations. The tolerability was evaluated by in vitro and in vivo models. DPZ-NE and DPZ-PNE were transparent, monophasic, homogeneous, and physically stable with droplets of nanometric size and spherical shape. DPZ-NE showed Newtonian behavior whereas a shear thinning (pseudoplastic) behavior was observed for DPZ-PNE. The release profile of both formulations followed a hyperbolic kinetic. The permeation and prediction parameters were significantly higher for DPZ-PNE, suggesting the use of polymers to be an effective strategy to improve the bioadhesion and penetration of the drug through nasal mucosa, which consequently increase its bioavailability.

Keywords: Donepezil; Alzheimer's disease; nanoemulsion; mucoadhesion; nose-to-brain; Pluronic F-127

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive cognitive dysfunction, memory loss, and difficulties carrying out daily routine activities [1]. The exact

etiology of AD is still unknown although it is considered a multifactorial disease whose pathogenesis includes neuro-cholinergic changes as well as development of amyloid plaques and neurofibrillary tangles [2–4]. To date, there are four pharmacological options approved for the symptomatic treatment of AD: Memantine, which is a *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, and three acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, namely Rivastigmine, Donepezil (DPZ), and Galantamine [5]. DPZ is a non-competitive and reversible AChE inhibitor with high selectivity in both targets and tissues. Its main action is to increase cholinergic transmission, although other mechanisms of DPZ for AD treatment have been reported, including a decrease of neural toxicity caused by β -amyloid protein, prevention of the reduction in nicotinic binding, and decline of glutamate-induced neurotoxicity [6]. These pharmacological activities enable this drug to have significant efficacy and as a result it is widely used to reduce the severity of neuropsychiatric symptoms as well as to improve the cognitive capacity of patients with mild-to-moderate AD [7]. DPZ is commercially available in solid dosage forms (5, 10, and 23 mg) for oral administration [8]. However, this route of administration presents notable disadvantages, such as first-pass metabolism, adverse effects in the gastrointestinal system, and low bioavailability in the brain due to the drug's poor ability to penetrate the blood–brain barrier (BBB), all of which evidence the need to use alternative routes of administration and to develop new drug delivery systems that improve pharmacological efficacy in the treatment of AD [9].

The intranasal route represents an alternative and painless method to noninvasively bypass the BBB [10]. The advantages of intranasal administration are manifold. For one, due to rapid absorption without enzymatic degradation and first-pass metabolism, bioavailability is improved and therefore allows rapid onset of the pharmacological action. Additionally, reduced systemic exposure minimizes drug distribution to non-targeted sites, thus reducing adverse side effects. Furthermore, this route allows the delivery of drug directly to the brain from the nasal cavity via olfactory and trigeminal nerve pathways [11–13]. This route is also convenient for geriatric patients unable to swallow oral dosage forms [14]. Despite these benefits, there are also some disadvantages associated with intranasal route administration, such as low epithelial permeability, limited surface area, enzymatic degradation, small volume used for drug administration, and mucociliary clearance that leads to the removal of drugs from the site of absorption [15]. Therefore, formulation strategies that ought to be adapted in order to achieve the success of the treatment using the nasal route include improvement of solubility and permeability, extension of residence time, and protection against enzymatic degradation [9,16,17].

The use of nanocarriers as a promising tool to overcome the limitations of the intranasal route has been gaining interest over recent decades. Nanotechnology-based drug delivery systems (polymeric nanoparticles, solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, microemulsions, nanoemulsions, and liposomes) are characterized by their nanoscale size range, which can be appropriate to transport drugs to the brain and enhance the therapeutic performance of active agents used in the treatment of neurodegenerative disorders [15,18].

Nanoemulsions (NEs) are colloidal nanocarriers of low viscosity formed by droplets with size in nanometer scale usually <250 nm and characterized by being kinetically stable with a transparent and translucent appearance with a bluish tint due to their weak interaction with light [15,19,20]. NEs are promising systems for intranasal delivery due to their reduced droplet size, high permeability, solubilizing potential, and, in particular, their protecting effect for lipophilic molecules [21]. However, one drawback of this type of formulation is its rapid nasal clearance, but this can be readily overcome by the addition of mucoadhesive and mucus-penetrating agents in order to increase the residence time at the site of absorption and improve the penetration of drug through the mucosa layer, which subsequently enhances bioavailability [22,23].

Considering these remarkable findings, the purpose of this study was to develop and characterize a nanoemulsion (NE), as well as a nanoemulsion containing Pluronic F-127 (PNE) as polymer, to improve the bioadhesion and penetration of drug in order to facilitate the transport of DPZ from nose-to-brain and thereby increase its efficacy in the treatment of AD.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The DPZ was purchased from Capot Chemical (Hangzhou, China). Plurol oleique CC 497 (polyglyceryl-3 dioleate), Labrafil M1944 CS (oleoyl polyoxyyl-6 glycerides), Labrafac lipophile WL 1349 (medium chain triglycerides), Capryol 90 (propylene glycol monocaprylate), Lauroglycol 90 (propylene glycol monolaurate), Labrasol (caprylocaproyl polyoxyyl-8 glycerides), and Transcutol-P (diethylene glycol monoethyl ether) were all supplied by Gattefossé (Saint-Priest, France). Macrogolglycerol ricinoleate (Cremophor EL) was obtained from Fagron Ibérica (Barcelona, Spain). Tween 80, castor oil, polyethylene glycol, and propylene glycol were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Mucin from porcine stomach was purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Components for histological assays were acquired from Sigma and Thermo Fisher Scientific (Barcelona, Spain). Chemicals for analytical experiments were purchased from Panreac (Barcelona, Spain) and the water used was obtained from a Millipore Milli-Q purification system (Millipore Corporation, Burlington, MA, USA).

2.2. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

DPZ was determined using a Waters HPLC with 2487 (UV/Vis) Detector & 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, MA, USA). The assay was carried out using a Kromasil C₁₈ column (250 × 4.6 mm × 5 μm). The mobile phase was a mixture of methanol:buffer (50:50, *v/v*) which was filtered using a 0.45 μm polyvinylidene fluoride (PVDF) filter (Millipore Corp., Madrid, Spain). The buffer consisted of a mixture of potassium dihydrogen orthophosphate 0.05 M, water, and trimethylamine, and by adjusting pH to 2.5 ± 0.05 with orthophosphoric acid. The mobile phase was pumped through the C₁₈ column at a flow rate of 1.2 mL/min. A volume of 20 μL was injected and the elute was analyzed at 268 nm. Data were evaluated using Empower 3 software—Build 3471 (Waters, Milford, MA, USA, 2010) [24].

2.3. Solubility Study

The solubility of DPZ was evaluated in several oils (Capryol 90, castor oil, Plurol oleique CC 497, Labrafac lipophile WL 1349, Labrafil M1944 CS, and Lauroglycol 90), surfactants (Tween 80, Cremophor and Labrasol), and cosurfactants (Transcutol-P, propylene glycol, and polyethylene glycol). An excess of DPZ was added to 3 g of each of these oils, surfactants, and cosurfactants and then subsequently mixed at 25 °C for 6 h under stirring. The samples were equilibrated overnight at room temperature and later centrifuged at 9000 rpm for 15 min. The supernatant was diluted with a solution of methanol:water (50:50, *v/v*). DPZ was subsequently determined at 312 nm using a DR 6000 UV-Visible Spectrophotometer (Hach, Düsseldorf, Germany).

2.4. Construction of Pseudo-Ternary Phase Diagrams

Three pseudo-ternary phase diagrams were constructed by water titration method using the components that exhibited the highest solubilizing potential for DPZ. Capryol 90 was selected as the oil phase, a mixture (S_{mix}) of Labrasol as surfactant, Transcutol-P as cosurfactant at three different ratios (1:1, 2:1 and 3:1), and purified water as the aqueous phase. For each pseudo-ternary diagram, oil and S_{mix} were mixed at ratios from 9:1 to 1:9 (*w/w*) while the aqueous phase was added by titration until turbidity or phase separation was observable so that it was possible to delineate the boundaries of phases formed. NE area was formed only by monophasic and transparent mixtures. From the three pseudo-ternary phase diagrams obtained, the one showing the highest NE area was selected as the optimal S_{mix} ratio.

2.5. Preparation of DPZ-NE and DPZ-PNE

DPZ-loaded NE (6.25 mg/mL) was prepared by incorporating DPZ in oil under stirring at 700 rpm until dissolution of drug, after which S_{mix} was incorporated under the same condition of stirring. Finally, water was slowly added until obtaining transparent and homogeneous NE. To prepare DPZ-PNE, Pluronic F-127 was incorporated into the aqueous phase of NE.

2.6. Characterization of DPZ-NE and DPZ-PNE

The pH of DPZ-NE and DPZ-PNE were determined using a pH meter GLP 22 (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

The droplet size and polydispersity index (PI) were determined by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). These measurements were carried out with 1 mL of the formulation without dilution at 25 °C using polystyrene cells. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) of 3 replicates.

The morphology of DPZ-NE and DPZ-PNE was examined by transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL JEM-1010 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). The sample preparation of both was carried out by negative staining with uranyl acetate and 24 h of drying.

Entrapment efficacy (EE) was determined by centrifugation of the formulation at 5000 rpm for 50 min. The free drug present in the supernatant was measured using UV spectroscopy at 230 nm. The experiment was carried out in triplicate and EE (%) was calculated using Equation (1).

$$EE(\%) = \frac{\text{Total amount of DPZ} - \text{Free amount of DPZ}}{\text{Total amount of PGZ}} \times 100 \quad (1)$$

Viscosity and rheological behavior were evaluated 24 h after DPZ-NE and DPZ-PNE preparation using a Haake RheoStress 1 rheometer connected to a temperature control Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) and equipped with cone-plate geometry (0.105 mm gap) including a Haake C60/2Ti mobile cone (60 mm diameter and 2° angle). Samples tested in 2 replicates at 25 °C underwent a program of 3-step shear profile: a ramp-up period (0–50 s⁻¹) for 3 min, constant shear rate period at 50 s⁻¹ for 1 min, and a ramp-down period (50 to 0 s⁻¹) for 3 min. The data from the flow curve (shear stress (τ) versus shear rate ($\dot{\gamma}$)) were fitted to the following mathematical models: Newton, Bingham, Ostwald-de-Waele, Casson, Herschel-Bulkley, and Cross. The model that best statistically describes the experimental data was selected based on the correlation coefficient value (r) and chi-squared value. The viscosity value was determined from the viscosity curve.

Mucoadhesive properties of DPZ-NE and DPZ-PNE were evaluated by falling liquid film technique [25]. Pieces of porcine nasal mucosa of 3 cm were hydrated with artificial nasal mucus prepared with 8% of mucin from porcine stomach dispersed in a solution of 7.45 mg/mL NaCl, 1.29 mg/mL, 1.29 mg/mL KCl and 0.32 mg/mL CaCl₂·2H₂O, and subsequently situated on a semi-cylindrical plastic tube held in an inclined position at an angle of 45°. A sample of 100 μ L of each formulation was placed on 2 individual mucosal surfaces. After 15 min, 20 mL of PBS (pH 6.4) previously warmed at 37 °C were distributed by droplet flow onto the mucosa and the eluted PBS was collected in a beaker. Afterwards, the amount of DPZ collected in the eluted PBS was determined at 312 nm using a DR 6000 UV-Visible Spectrophotometer (Hach, Düsseldorf, Germany) [26,27].

2.7. Stability Studies

The physical stability of DPZ-NE and DPZ-PNE was studied by multiple light scattering analysis using a TurbiScanLab (Formulation, Toulouse, France). This technology has two synchronous detectors to analyze particle migration or particle size changes. The transmission detector measures the light flux transmitted through the formulation (T) while the backscattering detector measures the light backscattered by the formulation (BS). Samples of 20 mL were stored at 4, 25, and 40 °C for 45 days.

Final formulations were transparent, hence only the T profile obtained after predetermined time intervals (1, 30, and 45 days) was used to study the stability of the formulation. The sample was analyzed at room temperature for 3 h and the data were obtained at intervals of 15 min.

2.8. In Vitro Release Study

The release study of DPZ from NE and PNE was performed using Franz diffusion cells (FDC 400; Crown Grass, Somerville, NJ, USA) and dialysis membranes (MWCO 12 KDa) previously hydrated in methanol:water (50:50, *v/v*) for 24 h. The effective diffusion area was 2.54 cm² and the receptor volume was 13 mL. The dialysis membrane was mounted between the donor and receptor compartment. The receptor compartment was filled with receptor medium (RM) formed by methanol:Transcutol-P (50:50, *v/v*). The temperature and stirring rate in the system were set at 37 ± 0.5 °C and 100 rpm, respectively, to accomplish sink conditions. A sample of 0.3 mL of formulation was placed in the donor compartment. At predetermined time intervals (0.17, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 23, 26, and 30 h), aliquots of 0.3 mL were extracted from the receptor compartment and replaced with the same volume of fresh RM. DPZ released from NE and PNE was quantified by HPLC (Section 2.2). The experiment was carried out in triplicate and data are given as mean ± SD. The released amount of DPZ (μg) was plotted versus time (h) using GraphPad Prism[®] 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, 2014). Five kinetic models (first order, Hyperbolic, Higuchi, Weibull, and Korsmeyer-Peppas) were used to determine the release kinetic profile and the one with the highest *r*² was subsequently selected.

2.9. Ex Vivo Permeation Studies

Transmucosal permeation studies were performed using porcine nasal mucosa obtained from the Animal Facility of the Faculty of Medicine, in accordance with Animal Experimentation Ethical Committee of the University of Barcelona, Spain (CEEAA-UB). Sacrifice with sodium pentobarbital (250 mg/kg) was administered through the auricular vein under deep anesthesia, and afterwards the nasal mucosa membranes were removed, preserved in Hank's balanced salt solution, and refrigerated until the initiation of the experiments. The experiment was carried out using Franz diffusion cell (FDC 400; Crown Grass, Somerville, NJ, USA) with a receptor volume of 6 mL and a diffusion area of 0.64 cm². Nasal mucosa membranes with thicknesses of 500 ± 100 μm were placed between the donor and receptor compartment. A mixture of Transcutol-P:water (60:40, *v/v*) was used as RM and was maintained under stirring at 100 rpm. The temperature in the system was kept at 37 ± 0.5 °C. A sample of 0.3 mL of formulation was placed in the donor compartment in contact with nasal mucosa. At pre-established time intervals (0.1, 0.25, 0.4, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, and 6 h), aliquots of 0.3 mL were extracted from the receptor compartment and replaced with an equal volume of fresh RM. The determination of DPZ permeated through the nasal mucosa was performed by HPLC. Data were expressed as mean ± SD (*n* = 6). A graphical representation of the cumulative permeated amount of DPZ (μg) versus time (h) was performed and the slope of the linear stretch was determined by linear regression analysis.

Further biopharmaceutical evaluation was performed to determine different permeation parameters, such as flux or permeation rate (J_{ss} , μg/(min/cm²)), permeability coefficient (K_p , (cm/min)·10³). Moreover, the theoretical human steady-state plasma concentration (C_{ss}) of drug, which estimates the concentration of drug that could be reached in the blood after nasal administration, was obtained using Equation (2).

$$C_{ss} = J_{ss} \frac{A}{Cl_p} \quad (2)$$

where J_{ss} is the flux, A is the hypothetical area of application (150 cm² for nasal mucosa), and Cl_p is the plasmatic clearance (human Cl_p value for DPZ according to the Food and Drug Administration is 10 L/h) [28].

After permeation studies, the nasal mucosa was removed from the Franz diffusion cell and cleaned with distilled water. The DPZ retained in these samples was extracted with 1 mL of methanol

using an ultrasonic bath for 20 min. The resulting solution was filtered and analyzed by HPLC to determine the amount of DPZ retained in the mucosa (Q_{ret} , $\mu\text{g DPZ/g tissue/cm}^2$).

2.10. Cytotoxicity Assay

The effect of DPZ-NE and DPZ-PNE on cell viability was evaluated using Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) cytotoxicity assay, which measures the reduction of tetrazolium salt realized by intracellular dehydrogenases of viable living cells. In order to perform this assay, human nasal septum carcinoma cell line RPMI 2650 (Sigma Aldrich) (2×10^5 cells/mL) was plated in 96-wells plates (Corning Inc., Corning, NY, USA) and cultured in a humidified incubator at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 24 h to facilitate adhesion [29]. Cells were grown in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 1% non-essential amino acids (NEAA), 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin, and 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS). The cells were treated with different dilutions (3.125 to 125 $\mu\text{g/mL}$) of DPZ-NE, DPZ-PNE, and the blank formulations for 24 h, and then subsequently incubated with fresh medium and 10% MTT (5 mg/mL in phosphate buffered saline) for 2 h at 37 °C. Afterwards, the medium was removed carefully and 100 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) 99% purity was added to lysate the cells and dissolve the purple insoluble crystals of MTT. The cell lysate was transferred to a new 96-well plate and then the absorbance was read using a Microplate Autoreader at excitation/emission of 540/630 nm (Modulus Microplate Multimode Reader-Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA). In a parallel manner, a negative control (cells without any stimulation or treatment) was processed for comparison. Absorbance values were considered directly proportional to cell viability.

2.11. Histological Analysis

The in vivo tolerance of the developed formulations was evaluated using pigs from the Animal Facility of the Faculty at Bellvitge Campus of the University of Barcelona in accordance with both the Animal Experimentation Ethical Committee of the University of Barcelona, Spain (CEEA-UB) and Animal Experimentation Commission of the Generalitat de Catalunya. Pigs were designated as the following groups: negative control (non-treated pig), positive control (pig treated intranasally with isopropyl alcohol), pig treated with DPZ-NE, and pig treated with DPZ-PNE. A volume of 300 μL of developed formulation or isopropyl alcohol was administered using a nasal spray pump. After 1 h of treatment, the pigs were euthanized and the nasal mucosae were removed and set in 4% buffered formaldehyde for 24 h at room temperature. Next, the samples were embedded in paraffin blocks and cut into 6 μm sections which were then stained with hematoxylin and eosin before finally viewing them under a microscope (Leica DM2000LED and Leica camera DFC550).

3. Results

3.1. Solubility Studies

Figure 1 shows the solubilization capacity of DPZ in different oils, surfactants, and cosurfactants. The components that showed the maximum solubilizing potential were selected for the formulation of DPZ-NE. Capryol 90 was used as oil phase, Labrasol as surfactant, and Transcutol-P as cosurfactant.

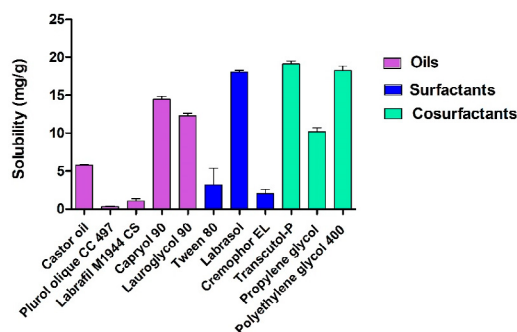


Figure 1. Solubility study of Donepezil (DPZ) in oils, surfactants, and cosurfactants.

3.2. Pseudo-Ternary Diagrams and Formulation of DPZ-NE and DPZ-PNE

Figure 2 shows the phase diagrams obtained from three different ratios (1:1, 2:1 and 3:1) of Labrasol:Transcutol-P (S_{mix}). The phase diagram at S_{mix} ratio of 1:1 exhibited the highest area of emulsification and therefore was selected for the preparation of DPZ-loaded formulation.

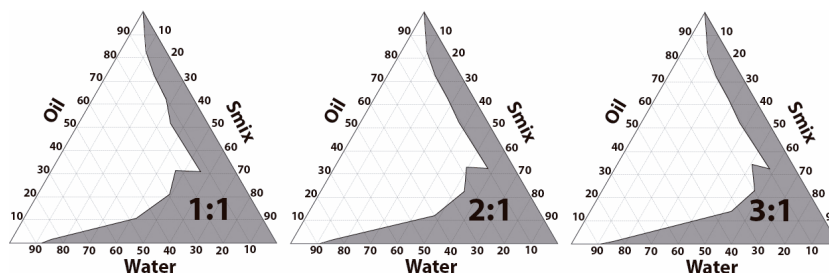


Figure 2. Pseudo-ternary phase diagrams using Capryol 90 as oil phase, Labrasol as surfactant, Transcutol-P as cosurfactant, and water as hydrophilic phase. Labrasol and Transcutol-P were analyzed at different ratios (1:1, 2:1 and 3:1, w/w).

Table 1 details the final formulations of DPZ-NE and DPZ-PNE (6.25 mg/mL). DPZ-NE was prepared by incorporating DPZ in: 6% Capryol 90, 20% Labrasol, 20% Transcutol-P, and 54% water. It was transparent, monophasic, and did not show signs of precipitated drug. DPZ-PNE formed with 24% Pluronic F-127 showed homogeneous and transparent appearance without thermosensitive properties, likely due to the high content of oil, surfactant, and cosurfactant.

Table 1. Final formulations of Donepezil-loaded Nanoemulsion (DPZ-NE) and Donepezil-loaded Pluronic F-127 Nanoemulsion (DPZ-PNE).

Components (%)	DPZ-NE	DPZ-PNE
DPZ (6.25 mg/mL)	-	-
Capryol 90	6	6
Labrasol	20	20
Transcutol-P	20	20
Water	54	30
Pluronic F-127	-	24

3.3. Characterization of DPZ-NE and DPZ-PNE

The pH values of DPZ-NE and DPZ-PNE were 5.82 and 6.14, respectively. These values are within the pH range (5.0–6.5) required for nasal formulations [22]. After 24 h of preparation, DPZ-NE showed a mean droplet size around 128.50 ± 1.03 nm with a PI value of 0.12 ± 0.01 , which indicated homogeneity of the system. TEM photomicrograph showed small spherical droplets and uniform distribution, which were consistent with the DLS results (Figure 3). The EE (%) of DPZ-NE and DPZ-PNE were $94.32 \pm 0.12\%$ and $93.85 \pm 0.095\%$, respectively. These results show a high incorporation of the drug in the inner phase.

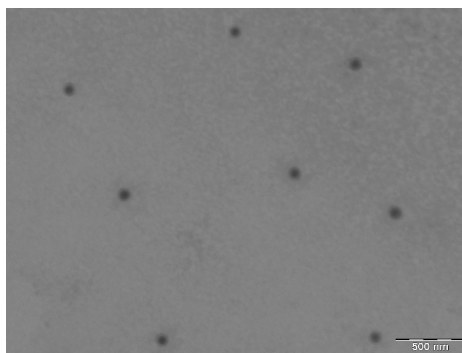


Figure 3. Transmission electron microscopy (TEM) image of DPZ-NE. Magnification $40,000\times$.

Figure 4A,B represents the flow curves $\tau = f(\dot{\gamma})$ and the viscosity curves $\eta = f(\dot{\gamma})$ obtained from the rheological characterization of DPZ-NE and DPZ-PNE at 24 h after preparation at 25°C . The flow curve represented by the relationship between shear stress and shear rate was linear in both formulations.

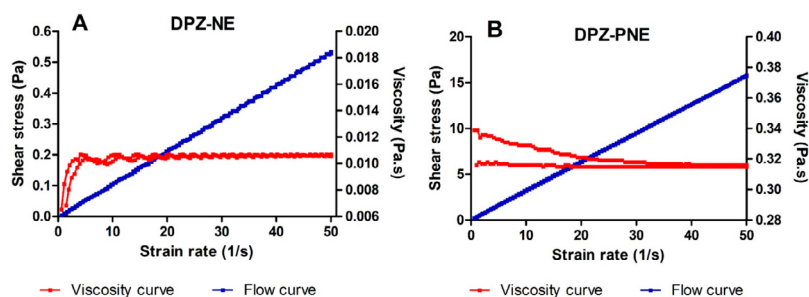


Figure 4. Rheogram showing both flow and viscosity curves. (A) DPZ-NE and (B) DPZ-PNE.

Table 2 displays the corresponding results of the analysis of the obtained data. DPZ-NE showed nearly constant viscosity values with an increasing shear rate from 0 to 50 s^{-1} , which is clearly indicative of Newtonian behavior confirmed by Newton equation fitting. The viscosity of DPZ-NE was about 10.69 ± 0.04 mPa·s. For DPZ-PNE, it was observed that the Ostwald-de Waele model provided the best overall match statistically of the experimental data, which indicates a shear thinning (pseudoplastic) behavior since the viscosity tends to decrease as the shear rate increases. Additionally, the results indicated that the DPZ-PNE viscosity at 50 s^{-1} was 315.40 ± 0.22 mPa·s.

Table 2. Rotational testing results for DPZ-NE and DPZ-PNE at 25 °C.

Rotational Testing		DPZ-NE	DPZ-PNE
Better mathematical model for fitting	Ramp-up section	Newton $r = 0.9998$	Ostwald de Waele $r = 1$
	Ramp-down section	Newton $r = 0.9998$	Ostwald de Waele $r = 1$
Rheological behavior		Newtonian	Pseudoplastic
Viscosity mean values		10.69 ± 0.04 mPa·s	315.40 ± 0.22 mPa·s

From the ex vivo mucoadhesion study, it was observed that DPZ-PNE exhibited the highest mucoadhesion value of $82.43 \pm 1.72\%$ compared with $71.31 \pm 1.53\%$ obtained from DPZ-NE. These results indicate the adequacy of DPZ-PNE to adhere to the nasal mucosa, which prolongs the residence time at the site of absorption.

3.4. Stability Studies

Figure 5 shows the transmission profiles (%) obtained for DPZ-NE and DPZ-PNE at 4, 25, and 40 °C over a span of 45 days. Peaks on the left and right side of the curve are the result of the meniscus formed by contact between the formulation and the glass. Both DPZ-NE and DPZ-PNE exhibited physical stability without signs of precipitation or changes in the system over 45 days under the conditions studied.

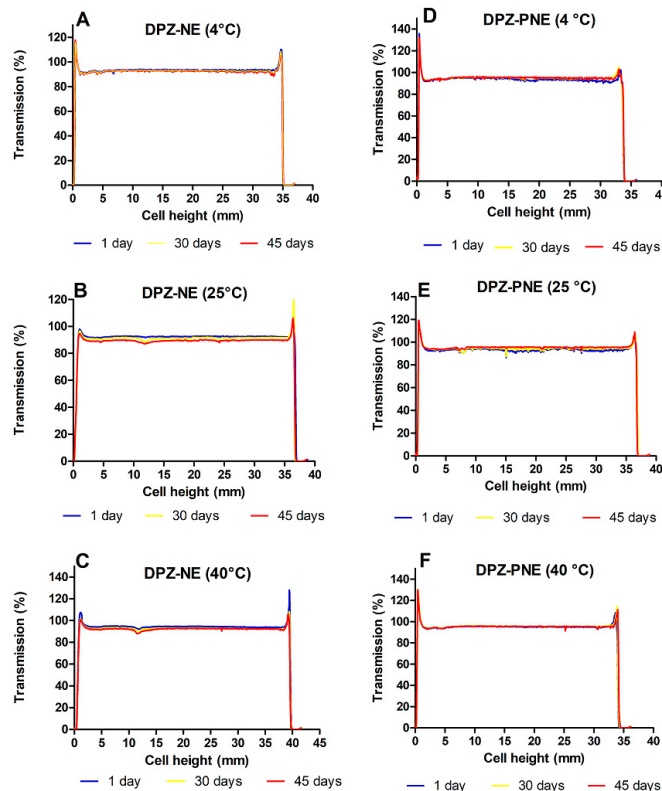


Figure 5. Transmission profiles after 1, 30, and 45 days of production. (A) DPZ-NE (4 °C); (B) DPZ-NE (25 °C); (C) DPZ-NE (40 °C); (D) DPZ-PNE (4 °C); (E) DPZ-PNE (25 °C), and (F) DPZ-PNE (40 °C).

3.5. In Vitro Release Study

Figure 6 shows the amount of DPZ released from formulations over time. After 30 h of assay, amounts of 850 and 635.5 μg of DPZ were released from the NE and PNE, respectively. The mathematical equation that best fit experimental data based on the highest coefficient of determination (r^2) was the hyperbolic model for both formulations with $r^2 = 0.9283$ for DPZ-NE and $r^2 = 0.9253$ for DPZ-PNE. $p < 0.05$ between B_{max} (the maximum concentration of drug released) of DPZ-NE (911.1 μg) with respect to B_{max} of DPZ-PNE (726.3 μg) was observed. The release constant (K_d) was found to be 3.77 h for DPZ-NE and 3.57 h for DPZ-PNE without significant statistical differences between both formulations.

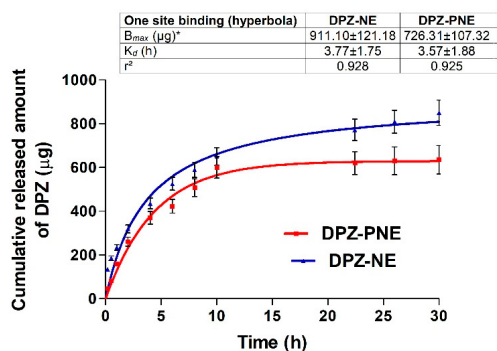


Figure 6. In vitro release profile of DPZ from NE and PNE fitted to Hyperbolic model. Results are expressed as mean \pm SD using parametric Student's *t*-test * $p < 0.05$ ($n = 6$).

3.6. Ex Vivo Permeation Studies

Ex vivo permeation profile of both formulations (Figure 7) shows that the amount of drug permeated through nasal mucosa after 6 h of assay was higher for DPZ-PNE (532.30 μg) compared to DPZ-NE (199.56 μg).

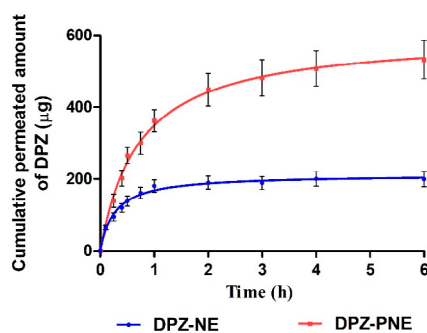


Figure 7. Ex vivo permeation profile of DPZ from NE and PNE through nasal mucosa ($n = 6$).

Table 3 exhibits different permeation and prediction parameters of both formulations. These biopharmaceutical analyses revealed significant statistical differences between DPZ-PNE with respect to DPZ-NE in each one of parameters studied. J_{ss} , K_p , and C_{ss} calculated for DPZ-PNE showed values were more than double than those which corresponded to DPZ-NE. With respect to Q_{ret} , a higher amount of drug retained in nasal mucosa was observed for DPZ-PNE (295.50 $\mu\text{g DPZ/g tissue/cm}^2$) when compared with DPZ-NE (192.65 $\mu\text{g DPZ/g tissue/cm}^2$).

Table 3. Permeation and prediction parameters of DPZ-NE and DPZ-PNE through nasal mucosa.

Formulations	J_{ss} ($\mu\text{g}/(\text{min}/\text{cm}^2)$)	K_p (cm/min) 10^3	Q_{ret} ($\mu\text{g DPZ}/\text{g tissue}/\text{cm}^2$)	C_{ss} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
DPZ-NE	6.58 (5.22–7.83)	1.05 (0.83–1.25)	192.65 (108.44–266.26)	0.09 (0.07–0.11)
DPZ-PNE	13.30 (12.31–14.07) **	2.13 (1.97–2.25) **	295.50 (239.71–523.36) *	0.19 (0.18–0.21) **

Data are compared for each parameter of DPZ-PNE vs. DPZ-NE * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by non-parametric Student's t -test ($n = 6$).

3.7. Cytotoxicity Assay

Figure 8 shows the results of cytotoxicity studies using human nasal cell line RPMI 2650. In both cases, DPZ-NE and DPZ-PNE apparently have dose-dependent cytotoxicity. Cell viability greater than 80% was observed in the assayed dilutions from 3.125 to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for DPZ-NE and from 3.125 to 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for DPZ-PNE.

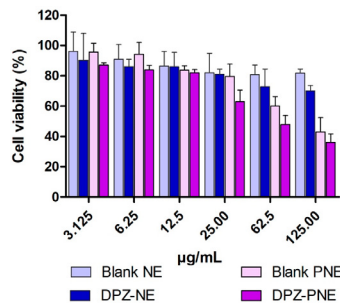


Figure 8. In vitro cytotoxicity studies on human nasal cell line RPMI 2650 of DPZ-NE and DPZ-PNE. The cell viability is recorded as a percentage in contrast to non-treated cells. Results are represented as mean \pm SD from 4 independent experiments.

3.8. Histological Analysis

Histologically, nasal mucosa of negative control (Figure 9A) consisted of a normal mucosa with normal lamina propria with the presence of venules. Nasal mucosa of positive control (Figure 9B) showed infiltration with inflammatory cells and erythrocytes (indicated with an arrow) as well as alteration of the lamina propria. However, the groups treated intranasally with DPZ-NE and DPZ-PNE showed a similar pattern to the negative control without detection of inflammatory signs (Figure 9C,D).

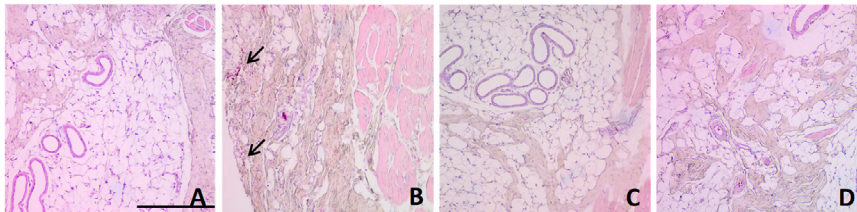


Figure 9. Optical microscopic images of nasal mucosa. (A) Negative control (non-treated pig); (B) positive control (pig treated with isopropyl alcohol); (C) pig treated with DPZ-NE, and (D) pig treated with DPZ-PNE. Hematoxylin and eosin stains nuclei blue/black while keratin and cytoplasm are stained red. The arrow indicates infiltration of inflammatory cells. Scale bar = 100 μm .

4. Discussion

Currently, the treatment of AD is focused on controlling the symptoms by reducing the cholinergic deficiency that is characteristic of the disease using AChE inhibitors to compensate the deficiency of acetylcholine (ACh) in the central nervous system (CNS) [30]. DPZ is widely used in tablet form for oral administration due to its substantial efficacy in improving cognitive functions. Pharmacological efficacy of this drug can be enhanced by the use of alternative routes of administration and development of nanotechnology-based drug delivery systems to overcome the remarkable disadvantages of oral route administration in addition to increasing the bioavailability of the drug in the target area [31]. The connection between the nasal cavity and the brain provides the possibility to bypass the BBB and reach the CNS. Therefore, intranasal administration represents a promising strategy to effectively treat AD [32]. In this study, the development of a NE and PNE was proposed to improve nose-to-brain delivery of DPZ based on their ability to protect the drug from biological and chemical degradation, increase extracellular transport, and provide a high contact surface area.

DPZ-NE was prepared using the pharmaceutical excipients that exhibited the highest solubilizing potential for the drug (Figure 1). Solubilizing capacity of the oil phase is critical to decrease the proportion of oil used and consequently reduce the amount of surfactant. In this study, Capryol 90 was selected as the oil phase based on the solubility results, Labrasol with a hydrophilic lipophilic balance (HLB) of 14 was used as nonionic O/W surfactant, and Transcutol-P was selected as the cosurfactant based on its solubilizing potential, non-toxic properties, and high biocompatibility [33]. Pseudo-ternary diagram with a mixture of surfactant-cosurfactant (S_{mix}) in the weight ratio of 1:1 displayed the greatest NE region and therefore was used for the incorporation of DPZ (Figure 2). DPZ-NE (6.25 mg/mL) was prepared by phase titration method, where spontaneous emulsification is produced by a low energy process [34]. In order to overcome rapid mucociliary clearance of the drug from the nose and increase the mucopenetrative ability of the drug, a non-ionic triblock copolymer of poly(ethylene glycol)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene glycol) (PEG-PPO-PEG) was incorporated in the aqueous phase of the formulation to obtain DPZ-PNE. Pluronic F-127 was selected based on its amphiphilic nature, high solubilizing capacity, non-toxicity properties, and the ability to interact with hydrophobic surfaces and biological membranes [35,36].

DPZ-NE and DPZ-PNE were monophasic, transparent, and homogenous with pH values suitable for nasal administration, which suggests that the formulations obtained would not cause nasal irritation [22]. TEM photomicrographs revealed that DPZ-NE was constituted by droplets of spherical shape and dispersed uniformly throughout the system with sizes between 85 and 130 nm, all of which were consistent with the DLS results.

The rheological analysis supported by mathematical modeling confirmed Newtonian-type flow behavior of DPZ-NE with a constant viscosity when the shear rate increased (Figure 4A), which is ideal for nasal spray application [37]. DPZ-PNE exhibited a shear thinning (pseudoplastic) behavior (Figure 4B) with a viscosity almost 30 times greater than the DPZ-NE viscosity, which favors the nasal mucoretenion in order to avoid the mucociliary clearance [38].

The ex vivo mucoadhesion study showed that DPZ-PNE exhibited improved bioadhesive properties due to the presence of polymer. Pluronic F-127 is a non-ionic water soluble polymer whose mucoadhesive effect could be related to the rheological properties of the formulation and specific interaction of polymer with the mucosa surface because its amphiphilic nature would allow it to interpenetrate into glycoprotein mucin chains and to form entanglements with mucus, which increases both the drug residence time in the nasal cavity and the drug permeation through nasal mucosa [36,39,40]. Although this bioadhesive effect of Pluronic F-127 is disputed due to its rapid dissolution in aqueous media, the interaction of this polymer with the solvents of DPZ-PNE could favor the adhesive traits of the system, while its surfactant properties allow diffusion via mucous in order to reach the epithelia in a simultaneous manner.

The physical stability studies of both formulations did not detect signs of destabilization, such as creaming, sedimentation, flocculation, or coalescence, over a span of 45 days of study at 4, 25, and

40 °C (Figure 5). The high stability that these vehicles offer is likely due to their small size, which favors the generation of only minimal gravitational force between nanodroplets. Therefore, Brownian motion could be enough to provide the necessary stability to prevent sedimentation or creaming [41].

The ability of formulations to release the drug incorporated into the system was evaluated by in vitro release study using an artificial membrane as the rate-limiting step. The drug release kinetic profile estimated by mathematical models provides crucial information on the formulation and its behavior. Consequently, it is used in quality control studies [42]. DPZ-NE and DPZ-PNE showed faster diffusion of the drug during the first 10 h, followed by a sustained release where it was possible to observe significant differences between the systems (Figure 6). The best kinetic fit was described by hyperbolic profile, which is one of the typical kinetic models for nanostructured systems [43].

Ex vivo permeation studies provide useful information to predict in vivo behavior of the formulation. In this research, the drug permeation through nasal mucosa after 6 h of assay was greater for DPZ-PNE compared to DPZ-NE with values that represent 28.39% and 10.64% of the drug placed in the donor compartment, respectively (Figure 7). The high permeability potential of both formulations can be attributed to Labrasol and Transcutol-P, due to their solubilizing capacity and permeation enhancing properties [44]. However, it should be noted that the presence of Pluronic F-127 in DPZ-PNE could provide additional advantages, possibly due to its chemical structure consisting of a hydrophobic core of poly(propylene oxide) between two hydrophilic units of poly(ethylene glycol). Consequently, this makes it a useful surfactant that improves the diffusion ability and permeation of the drug through the mucosa [45–47]. In accordance with this approach, the permeation and prediction parameters calculated by biopharmaceutical analysis were significantly higher for DPZ-PNE. This formulation presented a flux or permeation rate more than double than that obtained for DPZ-NE. In the same way, the permeability coefficient proportional to the flux showed a value of 2.13×10^{-3} cm/min with respect to 1.05×10^{-3} cm/min obtained from DPZ-NE, confirming that the incorporation of Pluronic F-127 constitutes a valuable strategy to improve the drug permeation through nasal mucosa. This approach corroborates with the result obtained from Q_{ret} , where a high amount of drug retained in nasal mucosa was observed using DPZ-PNE. The combination of bioadhesion and penetration enhancing properties of this formulation increase its permanence and retention in the nasal mucosa while facilitating its transport in order to overcome mucociliary clearance and deliver sustained concentrations of drug to the brain [48]. Since plasma clearance is a constant parameter, when comparing two formulations on the same contact surface the one that facilitates penetration by having higher K_p and inflow values will correlate with high C_{ss} values. In our study, the highest K_p and flow are exhibited by DPZ-PNE and consequently it showed a value of C_{ss} 2.11 times greater than DPZ-NE, confirming that K_p and flow are proportional parameters to C_{ss} . This parameter estimates the concentration of drug that could be reached in the blood in stationary equilibrium state. Previous studies in healthy patients have reported maximum plasmatic concentration of 33.26 ± 6.58 ng/mL for oral administration of 10 mg of DPZ, whereas in this study DPZ-NE and DPZ-PNE showed values of 2.7 and 5.7 times greater, respectively [49]. Based on these results and after further in vivo studies to corroborate our findings, these formulations could be used as therapeutic strategies to increase the efficacy or reduce the dose and/or dosage schedule, thus decreasing the adverse effects of conventional delivery methods [50].

The tolerability of both DPZ-NE and DPZ-PNE was evaluated by in vitro and in vivo models. Cytotoxicity assays using human nasal cell line RPMI 2650 to represent real nasal mucosa had been used previously to test formulations of nanoparticles [51,52]. In this study using this model, no apparent cytotoxicity was observed for either DPZ-NE nor DPZ-PNE. These results were confirmed by in vivo model, where histopathological analysis of porcine nasal mucosa showed that there was no infiltration of inflammatory cells nor significant changes with respect to the negative control after spray application of both DPZ-NE and DPZ-PNE.

In conclusion, the present research suggests that optimized DPZ-NE and DPZ-PNE could be promising systems for nose-to-brain delivery of DPZ. The comparison of both formulations provides

evidence that the incorporation of Pluronic F-127 can be proposed as a reasonable strategy to provide bioadhesion and penetration enhancement in order to prolong residence time at the site of absorption while increasing the penetration of drug through nasal mucosa, thus improving its biopharmaceutical profile. Based on the results of this investigation, further studies are encouraged to use in vivo models to explore the use of these systems as alternatives to improve the efficacy of DPZ or reduce the dose and/or dosage schedule, thus decreasing adverse effects. Furthermore, these systems can be convenient as therapeutic tools in the clinical practice for AD treatment, especially for patients in advanced stages of the disease who could be resistant to cooperation and who might have difficulty swallowing conventional dosage forms.

Author Contributions: L.C.E. carried out all the experiments, analyzed the data/results and wrote the paper; M.S.-A. carried out in vivo experiments and analyzed the data/results; B.C. analyzed the data/results; L.H. carried out the rheological studies; M.J.R.-L. analyzed histologically the samples of in vivo experiments; M.-A.C. carried out cytotoxicity studies and A.C.C. conceived and designed all the experiments.

Funding: This research was funded by the Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT—Ecuador).

Acknowledgments: Lupe Carolina Espinoza acknowledges the support received from Universidad Técnica Particular de Loja—Ecuador. Marcelle Silva-Abreu also acknowledges the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)—Brazil. The authors would like to extend their gratitude to Gattefossé for their generous provision of pharmaceutical excipients. Additionally, the authors also acknowledge Jonathan Proctor for his review of the use of the English language and Paulo Sarango for his technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Scheltens, P.; Blennow, K.; Breteler, M.M.B.; de Strooper, B.; Frisoni, G.B.; Salloway, S.; Van der Flier, W.M. Alzheimer's disease. *Lancet* **2016**, *388*, 505–517. [[CrossRef](#)]
2. Coman, H.; Nemeş, B. New Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease. *Int. J. Gerontol.* **2017**, *11*, 2–6. [[CrossRef](#)]
3. Robinson, N.; Grabowski, P.; Rehman, I. Alzheimer's disease pathogenesis: Is there a role for folate? *Mech. Ageing Dev.* **2018**, *174*, 86–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. D'Arrigo, J. Alzheimer's Disease, Brain Injury, and CNS Nanotherapy in Humans: Sonoporation Augmenting Drug Targeting. *Med. Sci.* **2017**, *5*, 1–17. [[CrossRef](#)]
5. Kumar, A.; Nisha, C.M.; Silakari, C.; Sharma, I.; Anusha, K.; Gupta, N.; Nair, P.; Tripathi, T.; Kumar, A. Current and novel therapeutic molecules and targets in Alzheimer's disease. *J. Med. Assoc.* **2016**, *115*, 3–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Jacobson, S.A.; Sabbagh, M.N. Donepezil: Potential neuroprotective and disease-modifying effects. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 1363–1369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Li, Q.; He, S.; Chen, Y.; Feng, F.; Qu, W.; Sun, H. Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 463–477. [[CrossRef](#)]
8. Sozio, P.; Cerasa, L.S.; Marinelli, L.; Di Stefano, A. Transdermal donepezil on the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2012**, *8*, 361–368. [[CrossRef](#)]
9. Agrawal, M.; Saraf, S.; Saraf, S.; Antimisariis, S.G.; Chougule, M.B.; Shoyele, S.A.; Alexander, A. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J. Control. Release* **2018**, *281*, 139–177. [[CrossRef](#)]
10. Rohrer, J.; Lupo, N.; Bernkop-Schnurch, A. Advanced formulations for intranasal delivery of biologics. *Int. J. Pharm.* **2018**, *553*, 8–20. [[CrossRef](#)]
11. Faustino, C.; Rijo, P.; Reis, C.P. Nanotechnological strategies for nerve growth factor delivery: Therapeutic implications in Alzheimer's disease. *Pharm. Res.* **2017**, *120*, 68–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Crowe, T.P.; Greenlee, M.H.W.; Kanthasamy, A.G.; Hsu, W.H. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci.* **2018**, *195*, 44–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Khan, A.R.; Liu, M.; Khan, M.W.; Zhai, G. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. *J. Control. Release* **2017**, *268*, 364–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Kappelle, W.F.; Siersema, P.D.; Bogte, A.; Vleggaar, F.P. Challenges in oral drug delivery in patients with esophageal dysphagia. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 645–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Md, S.; Bhattamisra, S.K.; Zeeshan, F.; Shahzad, N.; Mujtaba, M.A.; Srikanth Meka, V.; Radhakrishnan, A.; Kesharwani, P.; Baboota, S.; Ali, J. Nano-carrier enabled drug delivery systems for nose to brain targeting for the treatment of neurodegenerative disorders. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *43*, 295–310. [[CrossRef](#)]
16. Katare, Y.K.; Piazza, J.E.; Bhandari, J.; Daya, R.P.; Akilan, K.; Simpson, M.J.; Hoare, T.; Mishra, R.K. Intranasal delivery of antipsychotic drugs. *Schizophr. Res.* **2017**, *184*, 2–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Aderibigbe, B.A. In Situ-Based Gels for Nose to Brain Delivery for the Treatment of Neurological Diseases. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. De la Torre, C.; Cena, V. The Delivery Challenge in Neurodegenerative Disorders: The Nanoparticles Role in Alzheimer's Disease Therapeutics and Diagnostics. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 190. [[CrossRef](#)]
19. Gallarate, M.; Chirio, D.; Bussano, R.; Peira, E.; Battaglia, L.; Baratta, F.; Trotta, M. Development of O/W nanoemulsions for ophthalmic administration of timolol. *Int. J. Pharm.* **2013**, *440*, 126–134. [[CrossRef](#)]
20. Singh, Y.; Meher, J.G.; Raval, K.; Khan, F.A.; Chaurasia, M.; Jain, N.K.; Chourasia, M.K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J. Control. Release* **2017**, *252*, 28–49. [[CrossRef](#)]
21. Wen, M.M.; El-Salamouni, N.S.; El-Refai, W.M.; Hazzah, H.A.; Ali, M.M.; Tosi, G.; Farid, R.M.; Blanco-Prieto, M.J.; Billa, N.; Hanafy, A.S. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges. *J. Control. Release* **2017**, *245*, 95–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Pires, P.C.; Santos, A.O. Nanosystems in nose-to-brain drug delivery: A review of non-clinical brain targeting studies. *J. Control. Release* **2018**, *270*, 89–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bourganis, V.; Kammona, O.; Alexopoulos, A.; Kiparissides, C. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *128*, 337–362. [[CrossRef](#)]
24. Singh, B.K.; Srivastava, R.K.; Kumar, S.S.; Dutta, P.K. Stability-indicative HPLC determination of donepezil hydrochloride in tablet dosage form. *Pharm. Chem. J.* **2012**, *45*, 766–770. [[CrossRef](#)]
25. Bassi da Silva, J.; Ferreira, S.B.S.; de Freitas, O.; Bruschi, M.L. A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43*, 1053–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Colombo, M.; Figueiro, F.; de Fraga Dias, A.; Teixeira, H.F.; Battastini, A.M.O.; Koester, L.S. Kaempferol-loaded mucoadhesive nanoemulsion for intranasal administration reduces glioma growth in vitro. *Int. J. Pharm.* **2018**, *543*, 214–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Shah, B.M.; Misra, M.; Shishoo, C.J.; Padh, H. Nose to brain microemulsion-based drug delivery system of rivastigmine: Formulation and ex-vivo characterization. *Drug Deliv.* **2015**, *22*, 918–930. [[CrossRef](#)]
28. Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Halbaut, L.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Comparative Study of Ex Vivo Transmucosal Permeation of Pioglitazone Nanoparticles for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Polymers* **2018**, *10*, 316. [[CrossRef](#)]
29. Horvath, T.; Bartos, C.; Bocsik, A.; Kiss, L.; Veszelka, S.; Deli, M.A.; Ujhelyi, G.; Szabo-Revesz, P.; Ambrus, R. Cytotoxicity of Different Excipients on RPMI 2650 Human Nasal Epithelial Cells. *Molecules* **2016**, *21*, 658. [[CrossRef](#)]
30. Leung, K.C.; Li, V.; Ng, Y.Z.; Chan, T.T.; Chang, R.; Wong, R. Systematic Review of Cholinesterase Inhibitors on Cognition and Behavioral Symptoms in Patients of Chinese Descent with Alzheimer's Disease, Vascular Dementia, or Mixed Dementia. *Geriatrics* **2017**, *2*, 29. [[CrossRef](#)]
31. Feng, Y.; He, H.; Li, F.; Lu, Y.; Qi, J.; Wu, W. An update on the role of nanovehicles in nose-to-brain drug delivery. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 1079–1088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kozlovskaya, L.; Abou-Kaoud, M.; Stepensky, D. Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. *J. Control. Release* **2014**, *189*, 133–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sullivan, D.W., Jr.; Gad, S.C.; Julien, M. A review of the nonclinical safety of Transcutol(R), a highly purified form of diethylene glycol monoethyl ether (DEGEE) used as a pharmaceutical excipient. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *72*, 40–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gue, E.; Since, M.; Ropars, S.; Herbinet, R.; Le Pluart, L.; Malzert-Freon, A. Evaluation of the versatile character of a nanoemulsion formulation. *Int. J. Pharm.* **2016**, *498*, 49–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pisal, S.S.; Paradkar, A.R.; Mahadik, K.R.; Kadam, S.S. Pluronic gels for nasal delivery of Vitamin B12. Part I: Preformulation study. *Int. J. Pharm.* **2004**, *270*, 37–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Al Khateb, K.; Ozhmukhametova, E.K.; Mussin, M.N.; Seilkhanov, S.K.; Rakhypbekov, T.K.; Lau, W.M.; Khutoryanskiy, V.V. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2016**, *502*, 70–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Espinoza, L.C.; Vacacela, M.; Clares, B.; Garcia, M.L.; Fabrega, M.J.; Calpena, A.C. Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer's Disease: In vitro and ex vivo Characterization. *CNS Neurol Disord. Drug Targets* **2018**, *17*, 43–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Warnken, Z.N.; Smyth, H.D.; Watts, A.B.; Weitman, S.; Kuhn, J.G.; Williams, R.O., III. Formulation and device design to increase nose to brain drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2016**, *35*, 213–222. [[CrossRef](#)]
39. Dumortier, G.; Grossiord, J.L.; Agnely, F.; Chaumeil, J.C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 2709–2728. [[CrossRef](#)]
40. Chatterjee, B.; Amalina, N.; Sengupta, P.; Kumar, U. Mucoadhesive Polymers and Their Mode of Action: A Recent Update. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2017**, *7*, 195–203. [[CrossRef](#)]
41. Sengupta, P.; Chatterjee, B. Potential and future scope of nanoemulgel formulation for topical delivery of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* **2017**, *526*, 353–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Balzus, B.; Colombo, M.; Sahle, F.F.; Zoubari, G.; Staufenbiel, S.; Bodmeier, R. Comparison of different in vitro release methods used to investigate nanocarriers intended for dermal application. *Int. J. Pharm.* **2016**, *513*, 247–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Andres-Benito, P.; Aso, E.; Romero, I.A.; Roig-Carles, D.; Gromnicova, R.; Espina, M.; Ferrer, I.; Garcia, M.L.; et al. PPARgamma agonist-loaded PLGA-PEG nanocarriers as a potential treatment for Alzheimer's disease: In vitro and in vivo studies. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 5577–5590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Moghadam, S.H.; Saliq, E.; Wettig, S.D.; Dong, C.; Ivanova, M.V.; Huzil, J.T.; Foldvari, M. Effect of chemical permeation enhancers on stratum corneum barrier lipid organizational structure and interferon alpha permeability. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 2248–2260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chen, D.; Xia, D.; Li, X.; Zhu, Q.; Yu, H.; Zhu, C.; Gan, Y. Comparative study of Pluronic(R) F127-modified liposomes and chitosan-modified liposomes for mucus penetration and oral absorption of cyclosporine A in rats. *Int. J. Pharm.* **2013**, *449*, 1–9. [[CrossRef](#)]
46. Sonvico, F.; Clementino, A.; Buttini, F.; Colombo, G.; Pescina, S.; Staniscuaski Guterres, S.; Raffin Pohlmann, A.; Nicoli, S. Surface-Modified Nanocarriers for Nose-to-Brain Delivery: From Bioadhesion to Targeting. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 34. [[CrossRef](#)]
47. Giuliano, E.; Paolino, D.; Fresta, M.; Cosco, D. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 159. [[CrossRef](#)]
48. Lai, S.K.; Wang, Y.Y.; Hanes, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 158–171. [[CrossRef](#)]
49. Kim, K.A.; Lim, J.L.; Kim, C.; Park, J.Y. Pharmacokinetic comparison of orally disintegrating and conventional donepezil formulations in healthy Korean male subjects: A single-dose, randomized, open-label, 2-sequence, 2-period crossover study. *Clin. Ther.* **2011**, *33*, 965–972. [[CrossRef](#)]
50. Erdo, F.; Bors, L.A.; Farkas, D.; Bajza, A.; Gizurarson, S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Res. Bull.* **2018**, *143*, 155–170. [[CrossRef](#)]
51. Wengst, A.; Reichl, S. RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *74*, 290–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Clementino, A.; Batger, M.; Garrastazu, G.; Pozzoli, M.; Del Favero, E.; Rondelli, V.; Gutfilen, B.; Barboza, T.; Sukkar, M.B.; Souza, S.A.; et al. The nasal delivery of nanoencapsulated statins—An approach for brain delivery. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 6575–6590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.3. Artículo 3

Nanoemulsion strategy of pioglitazone for the treatment of skin inflammatory diseases

Lupe C. Espinoza, MSc^{a,b}, Marcelle Silva-Abreu, PhD^{a,c}, Ana C. Calpena, PhD^{a,c}, María J. Rodríguez-Lagunas, PhD^d, María-José Fábrega, PhD^{d,e}, María L. Garduño-Ramírez, PhD^f, Beatriz Clares, PhD^{g,*}

^a Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

^b Departamento de Química y Ciencias Exactas, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.

^c Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

^d Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

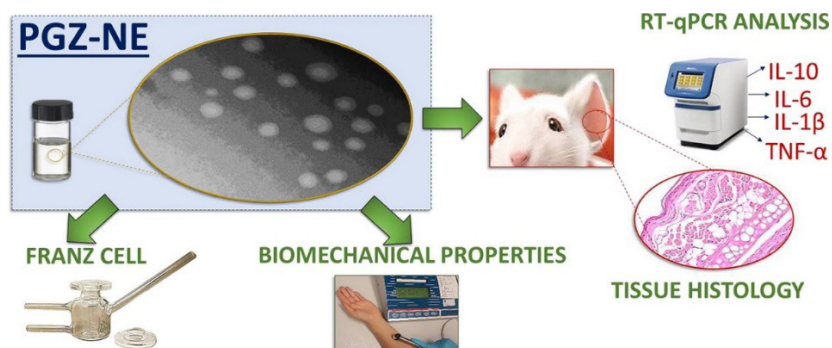
^e Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^f Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^g Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

<i>Revista:</i>	Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
<i>Año de publicación:</i>	2019
<i>ISSN:</i>	1549-9634
<i>Factor de impacto:</i>	5.57
<i>DOI:</i>	10.1016/j.nano.2019.03.017

Graphical abstract





Nanoemulsion strategy of pioglitazone for the treatment of skin inflammatory diseases

Lupe C. Espinoza, MSc^{a,b}, Marcelle Silva-Abreu, PhD^{a,c}, Ana C. Calpena, PhD^{a,c},
María J. Rodríguez-Lagunas, PhD^d, María-José Fábrega, PhD^{d,e},
María L. Garduño-Ramírez, PhD^f, Beatriz Clares, PhD^{c,g,*}

^aDepartment of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^bDepartamento de Química y Ciencias Exactas, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador

^cInstitute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, Barcelona, Spain

^dDepartment of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^eInstitute of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^fCentro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^gDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

Revised 17 February 2019

Abstract

Pioglitazone (PGZ) is a peroxisome proliferator-activated receptor agonist. Its role in the inflammatory response modulation paves the way for additional therapeutic applications. The purpose of this study was to develop a pioglitazone nanoemulsion (PGZ-NE) in order to investigate its anti-inflammatory efficacy on the skin. To that end, an NE vehicle developed for skin delivery was optimized and characterized. The resulting PGZ-NE showed good anti-inflammatory efficacy by decreasing the expression of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and TNF- α . The properties of the developed nanocarrier allowed achievement of a high permeation flux of PGZ through the skin as well as a high retained amount in the skin, likely due to the depot effect of ingredients, which assured a prolonged local action, with good skin tolerability among participating individuals. Consequently, these results suggest that PGZ-NE may be used as an alternative treatment for inflammatory skin diseases such as rosacea, atopic dermatitis or psoriasis.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Pioglitazone; Nanoemulsion; Cytokines; Anti-inflammatory activity; Skin disorders

Financial Disclosure: The authors have no financial, personal or other relationships with other people or organizations within five years of the beginning of the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. The authors declared that no competing interests exist.

Acknowledgements: This work was supported by the Generalitat de Catalunya (grant number 2017 SGR 1477), the Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT – Ecuador) (grant number 073-CIBAE-2015), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)—Brazil (grant number 0869/14-7) and the Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador (grant number 20-VI-UTPL). The authors also acknowledge Jonathan Proctor (M.Ed) for his help in the language review.

*Corresponding author at: Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Granada, 18071 Granada, Spain.

E-mail address: beatrizclares@ugr.es. (B. Clares).

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.03.017>

1549-9634/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Inflammation is a defense mechanism against external changes or cellular injury that induces the release of mediators of the immune system at the site of inflammation.¹ However, an excess of inflammatory responses may damage normal tissues and cause chronic inflammation, which is the basis of inflammatory skin diseases such as atopic dermatitis, psoriasis and rosacea.² Inflammatory skin diseases are the most common disorders in dermatology and have considerable impact on quality of life and self-esteem of patients with these conditions.³ Several cytokines, particularly interleukin(IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), are key mediators of skin inflammatory response.⁴ Therefore, therapeutic molecules with the ability to decrease the overproduction of pro-inflammatory cytokines or interrupt the inflammatory process could be effective treatments for skin inflammation.⁵

Pioglitazone (PGZ) is a peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonist currently used in the treatment of type 2 diabetes mellitus for its ability to act as an insulin sensitizer and improve glycemic control.⁶ PPAR γ is a ligand-activated nuclear transcription factor that modulates the expression of genes involved in physiological functions including glucose homeostasis, lipid metabolism and inflammatory processes.^{7,8} Additional therapeutic activities reported for PGZ include its regulatory role on inflammatory markers like IL-6, IL-17 and TNF- α , suggesting that PGZ may be an effective candidate for autoimmune diseases and inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis, rosacea and multiple sclerosis.⁹ PGZ has been classified as class II drug with low solubility and high permeability, according to the Biopharmaceutical Classification System. It is a weak base that is poorly soluble in water with a log *P* value of 2.3. It is commercially available in tablets for oral administration.¹⁰

Topical delivery constitutes an alternative route for anti-inflammatory drug administration that allows the direct application of active molecules to the intended site of action without entering the bloodstream, resulting in a reduction of systemic side effects. Nevertheless, a key drawback of topical drug delivery is the limited permeability of the skin barrier to several substances including drugs.¹¹ Topical formulations should be able to penetrate the skin and allow an effective drug concentration to achieve the intended therapeutic effect.¹² Successful therapy using topical application is dependent on the physicochemical characteristics of drug, skin permeability, and the chemical composition, as well as the physical properties of the carrier.¹³

Therapeutic potential of PGZ makes it a promising candidate to treat inflammatory dermatological conditions *via* topical application on skin.⁹ Despite its high permeability, the pharmacological efficacy of PGZ could be limited because of its low aqueous solubility.¹⁴ The incorporation of PGZ into colloidal carrier nanosystems could improve dermal bioavailability of the drug in order to achieve higher therapeutic efficacy.¹⁵

Nanoemulsions (NEs) are kinetically stable colloidal nanocarriers that exhibit low viscosity and homogenous appearance.¹⁶ They offer a series of advantages: reduced droplet size, improved solubility of poorly water-soluble drugs, high drug loading capacity, facile and low cost preparation which account for their broad utilization in pharmaceutical and cosmetic industries.¹⁷ However, the crucial feature of NEs is their capacity of improving permeation into the skin by offering high solubilizing potential for lipophilic and hydrophilic drugs, providing large surface area and good skin contact, and a direct permeation-enhancing effect through the *stratum corneum* (SC) due to their composition of oil and surfactants.¹⁸ Considering these remarkable findings along with the aim to improve the solubility and, consequently, the dermal efficacy of PGZ, the purpose of this study was to develop and characterize an NE-based colloidal nanocarrier of PGZ in order to increase its permeation through the skin and evaluate its anti-inflammatory activity using *in vivo* mouse models.

Methods

Materials

The PGZ was purchased from Capot Chemical (Hangzhou, China). Labrasol®, transcutool® P, pluriol® oleique CC 497,

labrafil® M1944 CS, lauroglycol® 90 were gift samples from Gattefossé (Saint-Priest, France). Macrogolglycerol ricinoleate (cremophor® EL) was purchased from Fagron Iberica (Barcelona, Spain). Tween 80, castor oil, polyethylene glycol and propylene glycol were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Components for histological assays were purchased from Sigma and Thermo Fisher Scientific (Barcelona, Spain). Ultrapure water obtained from a Milli-Q purification system (Millipore Corporation, MA, USA) and chemicals of analytical grade were used for all the experiments.

Pseudo-ternary phase diagrams and preparation of PGZ-NE

Six pseudo-ternary phase diagrams were constructed with components that showed the highest solubilizing capacity for PGZ by water titration method. Castor oil was the oily phase; a mixture of labrasol® as surfactant, transcutool® P and propylene glycol as co-surfactants were the surfactant mixture (S_{mix}); and purified water was the aqueous phase. Slow titration with water was addressed for each mass ratio of oil: S_{mix} until turbidity or phase separation. The monophasic and transparent combinations were placed inside the emulsification area in order to delineate the boundaries of the phase diagram formed. The composition showing the highest emulsification area was selected as the optimized S_{mix} ratio. PGZ-loaded NE (1 mg/mL) was prepared by incorporating of PGZ to oil and S_{mix} under stirring at 700 rpm until dissolution of drug. Afterwards, purified water was slowly added under constant stirring until a transparent NE was obtained.

Characterization of PGZ-NE

The pH values of PGZ-NE were determined using a calibrated digital pH meter GLP 22 (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

The droplet size and polydispersity index (PI) were determined without dilution at 25 °C by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Zeta potential was calculated from electrophoretic mobility. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) of three replicates.

Morphometrical examination of PGZ-NE was examined by transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL JEM-1010 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) by negative staining with uranyl acetate.

Viscosity and rheological behavior were analyzed without dilution at 25 °C using a Haake RheoStress 1 rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany). PGZ-NE was evaluated in two replicates by a program that consisted of three steps: a ramp-up period (0-50 s⁻¹) for 3 min, followed by a constant shear rate period at 50 s⁻¹ for 1 min, and a ramp-down period (50-0 s⁻¹) for 3 min. Results from the flow curves were fitted to several mathematical models (Newton, Bingham, Ostwald-de-Waele, Herschel-Bulkley, Casson and Cross).

Stability studies

The physical stability of the PGZ-NE was evaluated by multiple light scattering analysis of transmission (T) profiles of a pulsed near-infrared light source ($\lambda = 880$ nm) using the TurbiScan Lab (Formulation, L'Union, France). The T profiles

of samples of PGZ-NE (20 mL) stored at 25 °C and 40 °C were recorded at predetermined time intervals (1, 30 and 60 days).

In vitro release study

The release study of PGZ from NE was carried out using vertical Franz diffusion cells (FDC 400; Crown Grass, Somerville, NJ, USA) with a receptor volume of 13 mL and dialysis membranes (MWCO 12 kDa) with effective diffusion area of 2.54 cm², which were previously hydrated for 24 h. A mixture of DMSO: water (60:40, v/v) at pH 7.4 was used as receptor medium under continuous stirring (100 rpm). 0.3 mL samples of PGZ-NE were placed in the donor compartment and the system was maintained at 32 ± 0.5 °C. Aliquots of 0.3 mL were extracted from the receptor compartment at predetermined time intervals up to 34 h and replaced with the same volume of tempered receptor medium. The concentration of PGZ released was quantified by HPLC (Supporting information 1). Data are given as mean ± SD (n = 3). Five kinetic models (first order, Hyperbolic, Higuchi, Weibull and Korsmeyer-Peppas) were utilized to determine the release kinetic profile that best fitted experimental data. Coefficients of determination (r²) were utilized as discrimination criteria.

Ex vivo skin permeation studies

Human skin from abdominal lipectomy of healthy 38-year old women (Hospital of Barcelona, SCIAS, Barcelona, Spain) was used as diffusion membranes. Voluntary written informed consent was obtained previously in accordance with the Ethical Committee of the Hospital of Barcelona (number 001, dated 20 January, 2016). Skin samples with thicknesses of 0.4 mm were mounted between the donor and receptor compartment of vertical Franz diffusion cells (0.64 cm² diffusion area). A solution of transcutol@ P:water (60:40, v/v) continuously stirred was used as receptor medium. 1 mL samples of PGZ-NE were placed in the donor compartment in contact with the outer surface of skin. The temperature was kept at 32 ± 0.5 °C. Aliquots of 0.3 mL were extracted from the receptor compartment at pre-established time intervals of up to 12.5 h and replaced with the same volume of tempered receptor medium. Amounts of PGZ permeated through the skin were determined by HPLC. Data are represented as mean ± SD (n = 3).

The cumulative permeated amount of PGZ (µg) was plotted versus time (h) and the slope of the linear stretch was determined by linear regression. Further biopharmaceutical evaluation was performed to determine different permeation and prediction parameters such as flux (J_{ss} , µg/cm²/h), permeability coefficient (K_p , cm/h), lag time (T_L , h), vehicle/tissue partition coefficient (P_1 , cm), diffusion coefficient (P_2 , h⁻¹), mean transit time (MTT , day), theoretical human steady-state plasma concentrations (C_{ss}) the amount of PGZ retained in the skin (Q_{ret} mg/g skin/cm²).¹⁹ Data are expressed as median (min-max) (n = 3).

In vivo anti-inflammatory efficacy: arachidonic acid (AA)-induced mouse ear inflammation model

The anti-inflammatory skin efficacy of PGZ-NE was evaluated using male BALB/c mice (four months old) in accordance with the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona with date 28/01/2016 (CEEA/UB

Table 1
Primer sequences used for quantitative RT-qPCR.

Gene (Mouse)	Primer sequences (5'-3')	Gene accession number
IL-6	FW: TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC	NM_031168.2
	RV: TTGGTCCTTAGCCTCCTCC	
IL-10	FW: TCCTTAATGCAGGACTTAAAGGG	NM_010548.2
	RV: GGCTTTGGAGCTTATATAAAT	
IL-1β	FW: TGATGAGAATGACCTCTTCT	NM_008361.4
	RV: CTTCTCAAAGATGAAGGAAA	
TNF-α	FW: AACTAGTGGTGCCAGCCGAT	NM_013693.3
	RV: CTTACAGAGCAATGACTCC	
GAPDH	FW: CCATCACCATCTTCAGGAG	NM_008084
	RV: CCTGCTCACCACCTTCTTG	

ref. 4/16 and Generalitat ref. 8756). The inflammatory process was induced in mice by applying 60 µL AA (5 mg/mL diluted in PBS) on the right ears. Animals were divided into six groups (n = 3): negative control group (non-treated mice), positive control (mice treated only with AA), drug reference group (mice treated with commercial ibuprofen gel (50 mg/g; "Code: 886192")), vehicle group (blank-NE), prevention group (animals treated with PGZ-NE 20 min before application of AA in order to evaluate whether PGZ-NE is able to prevent the inflammatory process) and group treated with PGZ-NE 20 min after inducing inflammation. After 20 min of treatment the ears were cut and stored to carry out histological examination and to analyze the gene expression by RT-qPCR and the TNF-α concentration by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Total RNA from small sections of mouse ear tissue from each group was isolated by phenol-chloroform followed by isopropanol precipitation. Purity and RNA concentration were measured at 260 nm and 260/280 ratio in a Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 spectrophotometer. RNA integrity was verified by visualization of 28S and 18S rRNAs after 1% agarose/formaldehyde gel electrophoresis. For mRNA quantification, reverse transcription was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). RT-qPCRs were performed in a StepOne Plus PCR cyclor (Applied Biosystems) by using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific oligonucleotides for IL-6, IL-10, IL-1β, TNF-α and the housekeeping GAPDH (Table 1) were used. The standard PCR program used was the following, one denaturation cycle for 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Relative gene expression of each gene was normalized to GAPDH and the 2-ΔΔCt formula was used to calculate fold changes. Statistical analysis was performed using SPSS® software V. 20.0 (IBM analytics, Chicago, IL, USA). Results are presented as the mean ± SD (n = 3).

Tissue homogenates at 100 ng/mL were obtained using a Polytron homogenizer (Kinematica, Switzerland). Concentration of TNFα present in ear homogenates was quantified by ELISA using a TNFα OptEIA set (BD Biosciences, Madrid, Spain), in accordance with the manufacturer's instructions. Results are expressed as pg/mL.

Histological evaluation of ear samples (5 µm thickness) were stained with hematoxylin and eosin and observed by optical microscopy.

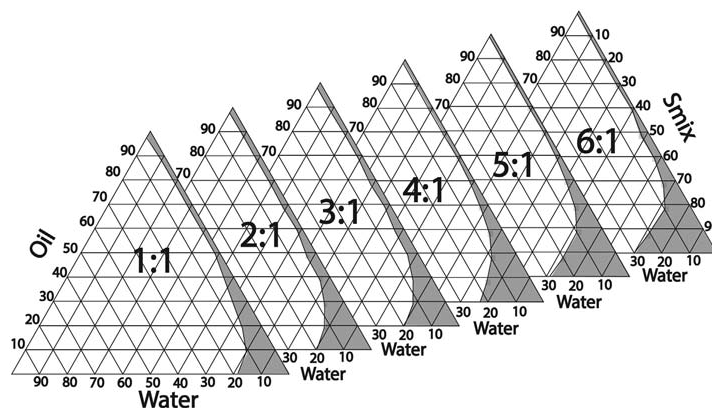


Figure 1. Pseudo-ternary phase diagrams using different ratios of surfactant:co-surfactants (Smix) at 25 °C.

In vivo anti-inflammatory efficacy: TPA-induced mouse ear inflammation model

Groups of six adult male Wistar CD-1 mice (20-25 g) were used for the study. All experiments were performed in compliance with the Official Mexican Rule: NOM-062-ZOO-1999 Guidelines (Technical Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals) following the protocol previously described.²⁰ Edema was induced by topical application of 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) dissolved in ethanol (2.5 µg) on the outer and inner surfaces of the right ear. PGZ-NE (100 µL), blank-NE (100 µL) and indomethacin (1 mg; used as the reference anti-inflammatory drug) were applied topically on the right ear of each corresponding group, respectively immediately after TPA application. The animals were sacrificed 4 h after treatment, and 6 mm circular sections were taken from both ears: treated ear (right) and non-treated ear (left). These sections were weighed to determine the percentage of inhibition of inflammation with respect to the TPA control group (100% inflammation).

In vivo tolerance study

A tolerance study was carried out in twelve female volunteers with healthy skin between 25 and 30 years old. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona (IRB00003099) in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki in which all volunteers provided a signed a written informed consent.²¹ Readings of transepidermal water loss (TEWL) and stratum corneum hydration (SCH) were recorded using a Tewameter TM 300 and a Corneometer 825 (Courage & Khazaka Electronics GmbH, Cologne, Germany), respectively. TEWL and SCH were measured in basal state and after topical application of PGZ-NE at predetermined time intervals (5 min, 1, 2 and 16 h). To determine TEWL value, the probe was kept on the skin surface during 2 min and the results were expressed as g/cm²/h. To determine SCH value, the probe was pressed on the skin in order to measure the dielectric constant of the skin, which is dependent

on the water content of the stratum corneum. The measurements are given in arbitrary units (AU). TEWL and SCH results were reported as the mean ± SD (n = 12).

Statistical analysis

Obtained experimental data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to compare mean values. A P value <0.05 was set for considering statistically significant differences.

Results

Pseudo-ternary phase diagrams and preparation of PGZ-NE

Results of PGZ solubility in different ingredients are reported in supporting information 2. The components that exhibited the greatest solubilizing potential were selected as constituents of PGZ-NE. Thus, castor oil was used as oil phase, labrasol® as surfactant, transcuto® P and propylene glycol as co-surfactants. Six pseudo-ternary phase diagrams were performed in order to establish which exhibited the largest area of NE formation (Figure 1). Several ratios labrasol®:transcuto® P were analyzed (1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 and 6:1) while maintaining both transcuto® P and propylene glycol in a ratio of 1:0.5 in each case. Maximum area of NE was obtained with S_{mix} 6:1 and was consequently selected as the optimized S_{mix} ratio in the preparation of PGZ-NE. Final composition was: PGZ (1 mg/mL), 6% castor oil, 59.2% labrasol®, 9.87% transcuto® P, 4.93% propylene glycol and 20% purified water. This formulation was homogenous, transparent and did not present signs of precipitation of drug.

Characterization of PGZ-NE

The pH value of PGZ-NE was 5.42. After 24 h of preparation, the mean droplet size was 182 ± 11.36 nm and mean zeta potential value was 12.37 ± 1.64 mV. PI value obtained was less

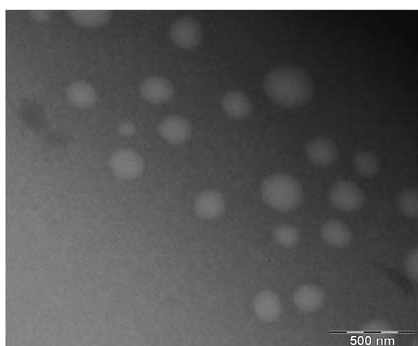


Figure 2. Transmission electron microscopy image of PGZ-NE (magnification 40,000 \times).

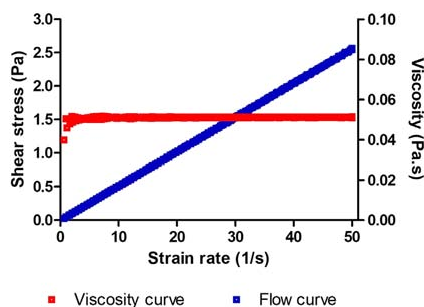


Figure 3. Rheogram of PGZ-NE showing both flow and viscosity curves at 25 °C.

than 0.5 (0.352 ± 0.04), which indicated homogeneity of the system. Morphometric properties are represented in TEM photomicrograph of PGZ-NE (Figure 2).

Figure 3 shows the viscosity and rheological behavior of PGZ-NE. The viscosity was found to be $51.08 \pm 10.03 \times 10^{-2}$ mPa·s. The shear stress–shear rate relationship (flow curve) was linear whereas the viscosity remained constant. The mathematical model that best describes the experimental data was the Newton model with $r^2 = 1$.

Stability studies

Figure 4, A and B shows the transmission profiles (%) of PGZ-NE at 25 °C and 40 °C, respectively. The left side of the graphic corresponds to the bottom of the vial and the right side corresponds to the top of the vial. Peaks on the left and right side of the graphic correspond to the meniscus formed by the contact between sample and the glass.²² Samples were physically stable at the conditions studied without presence of precipitates or phase separation over 60 days at both temperature conditions.

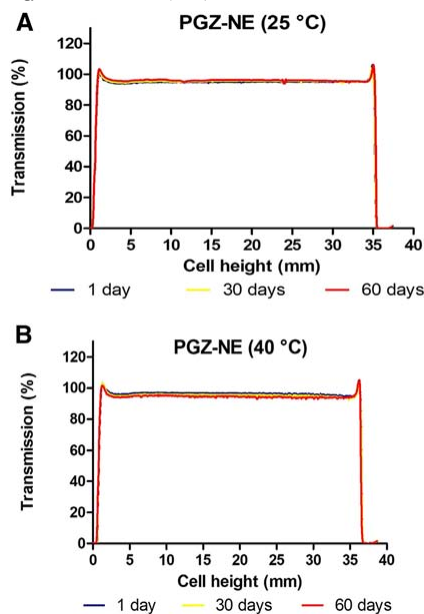


Figure 4. Transmission profiles of PGZ-NE after 1, 30 and 60 days of production. (A) Storage at 25 °C. (B) Storage at 40 °C.

In vitro release study

Figure 5, A shows the amount of PGZ released over time. An amount of 221.06 μg of PGZ was released from NE after 34 h of assay representing 73.6% of drug. The hyperbolic model was the mathematical equation that best fitted experimental data with $r^2 = 0.9974$.

Ex vivo skin permeation studies

Figure 5, B shows the *ex vivo* permeation profile of PGZ-NE. It can be observed that the amount of drug permeated after 12.5 h of assay was 250 μg , which corresponds to 25% of the drug placed in the donor compartment. Further biopharmaceutical analysis allowed determination of different permeation and prediction parameters of PGZ-NE (Table 2). Results showed a K_p of 0.039 cm/h, a vehicle/tissue P_1 of 0.63 cm and a P_2 of 0.06 h^{-1} . J_{ss} was determined to be 39.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. The time taken for PGZ to appear in systemic circulation was 2.6 h and C_{ss} was 0.089 $\mu\text{g}/\text{mL}$ within an area of application of 5 cm^2 taking into account a PGZ plasmatic clearance value of $2.26 \pm 1.22 \text{ L/h}$. Lastly, the amount of PGZ retained in the skin was 4.07 $\text{mg/g skin}/\text{cm}^2$.

Anti-inflammatory efficacy (AA-induced model)

Results from the RT-qPCR analysis are shown in Figure 6, A, B, C and D. When compared to the non-treated mice, samples of mouse ears from the positive control showed significantly higher

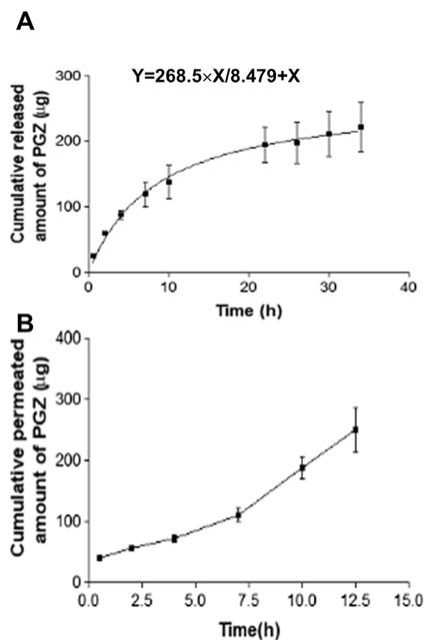


Figure 5. (A) *In vitro* release profile of PGZ from NE fitted to hyperbolic model. (B) *Ex vivo* permeation profile of PGZ from NE through human skin. Results are expressed as mean \pm SD (n = 3).

mRNA expression of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and TNF- α . A trend of reduced expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was also observed in the positive control. However the values did not reach statistical significance when compared to the non-treated mice. The groups treated with PGZ-NE before and after inducing inflammation showed a significant decrease in the expression of all assayed pro-inflammatory cytokines, as opposed to the positive control.

Figure 6, E shows the TNF- α concentration in the tissue detected by ELISA. In accordance with the changes in the mRNA levels, the production of TNF- α dramatically increased in the positive control and significantly decreased with the application of PGZ-NE (either as treatment or prevention) as well as with the use of commercial ibuprofen gel. Finally, no significant changes with respect to the positive control in either mRNA expression of cytokines or in TNF- α production were observed in the group treated with Blank-NE.

Micrographs of the negative control group revealed a relatively thin epidermis with a contiguous SC and relatively little leucocyte (Figure 7, A). The topical application of AA caused an increase in the epidermis and dermis thickness with loss of SC, which was accompanied by presence of inflammatory cells and a loosening of connective tissue (Figure 7, B). The topical application of Blank-NE did not improve the histological alterations observed in the tissue after inducing inflammation (Figure 7, C). A similar profile to the negative control was

Table 2
Permeation and prediction parameters of PGZ-NE through human skin. Results are expressed as median (minimum and maximum) (n = 3).

Permeation and prediction parameters	Median (minimum and maximum)
J_{ss} ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2/\text{h})$)	39.7 (32.81-42.18)
TI (h)	2.64 (1.2-3)
P_1 (cm)	0.63 (0.23-0.75)
P_2 (h^{-1})	0.06 (0.05-0.13)
K_p (cm/h)	0.039 (0.032-0.042)
MTT (day)	0.82 (0.03-0.04)
C_{ss} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.089 (0.073-0.093)
Q_{ret} ($\text{mg}/\text{g skin}/\text{cm}^2$)	4.07 (3.92-4.22)

Abbreviations: J_{ss} (flux), K_p (permeability coefficient), TI (lag time), P_1 (vehicle/tissue partition coefficient), P_2 (diffusion coefficient), MTT (mean transit time), C_{ss} (steady-state plasma concentration), Q_{ret} (amount of drug retained in the tissue).

observed in the ears treated with PGZ-NE before and after inducing inflammation with less inflammatory cells infiltrates and lower dermis thickness (Figure 7, D and E). A loss of the SC was also evident in the ears treated with PGZ-NE prior to inducing inflammation, although it was not as pronounced as that of the positive control (Figure 7, E). The treatment with the commercial ibuprofen gel (Figure 7, F) yielded a result comparable to that obtained from the application of PGZ-NE after inducing inflammation.

Anti-inflammatory efficacy (TPA-induced model)

TPA group exhibited an evident erythema and vasodilation after topical application of TPA, resulting in marked increases in ear thickness and weight. The group treated with PGZ-NE showed a slight reduction of redness and a notable inhibition of inflammation ($43.9189 \pm 1.7877\%$) compared to the TPA group but without reaching the anti-inflammatory potency of indomethacin (87.2536 ± 2.6392). Blank-NE did not cause changes in the inflammatory process induced by the application of TPA (Figure 8).

In vivo tolerance

Figure 9, A shows a statistically significant reduction in the TEWL value after 2 h of application whereas Figure 9, B displays significant differences on the SCH value after 5 min of NE application compared with the basal state. In addition, a tendency to return to the basal states was observed in both TEWL and SCH parameters.

Discussion

In recent years, studies of the therapeutic potential of PGZ have gone far beyond its primary use as an antidiabetic drug. The anti-

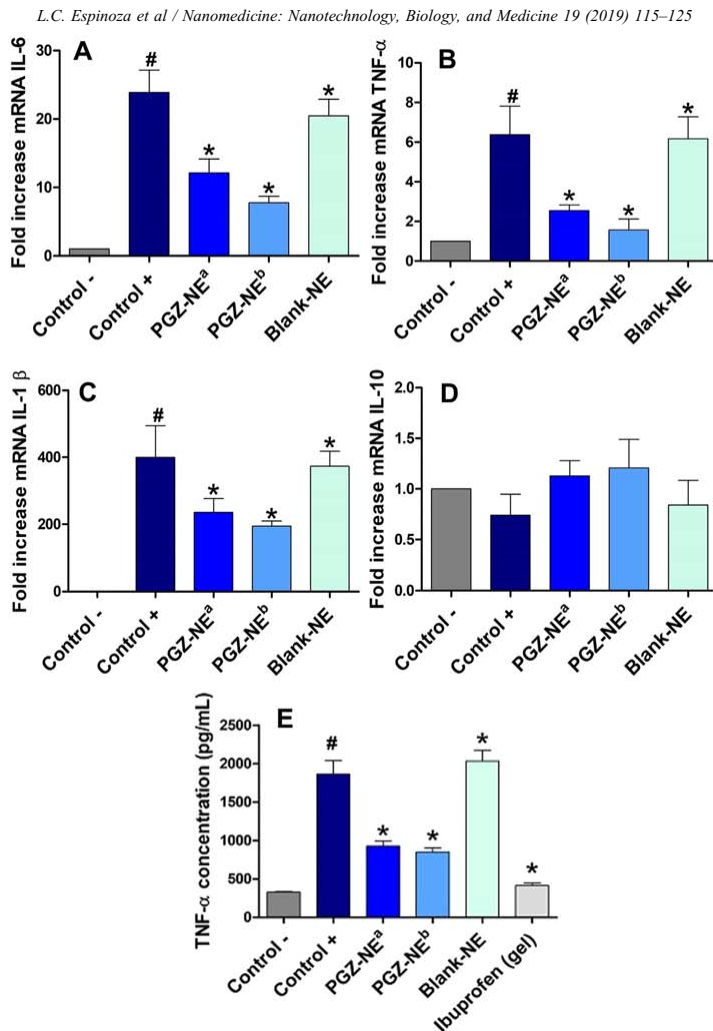


Figure 6. Relative expression of cytokines: (A) IL-6; (B) TNF- α ; (C) IL-1 β ; (D) IL-10. (E) TNF- α quantification by ELISA. Non-treated mice (Control -), mice treated only with arachidonic acid (Control +), mice treated with PGZ-NE after inducing inflammation (PGZ-NE^a), mice treated with PGZ-NE prior to inducing inflammation (PGZ-NE^b), mice treated with blank nanoemulsion (Blank-NE), mice treated with reference anti-inflammatory drug (Ibuprofen gel). # $P < 0.05$ negative control vs positive control. * $P < 0.05$ positive control vs different treatments.

inflammatory effect of this drug has made it a compelling candidate for the treatment of dermatological disorders *via* topical application.⁹ However, its low aqueous solubility and the limited permeability of SC to external substances could hinder its penetration through the target area. NEs improve solubility, absorption and diffusion of drugs. Therefore it can constitute a promising strategy for drug delivery, especially in dermatology.²³ During the development of NE, the evaluation of solubility of the drug in various oils, surfactants and co-surfactants is a critical step in obtaining an effective vehicle capable of allowing high drug loading, as well as providing chemical and

physical stability to the formulation.²⁴ In this study, PGZ-NE was formulated using the excipients that showed the highest solubilizing potential for the drug (supporting material 2) since the drug solubilizing capacity of the NE constrains the drug concentration gradient towards the skin.²¹ Labrasol® is a nonionic surfactant with low irritability of skin.²⁵ It is frequently utilized in conjunction with plurol® oleique in dermal delivery systems. The ratio 6:1 was selected on the basis of the best emulsification properties (Figure 1). Finally, transcutol® P and propylene glycol were selected as co-surfactants based on their solubilizing capacity, non-toxic properties

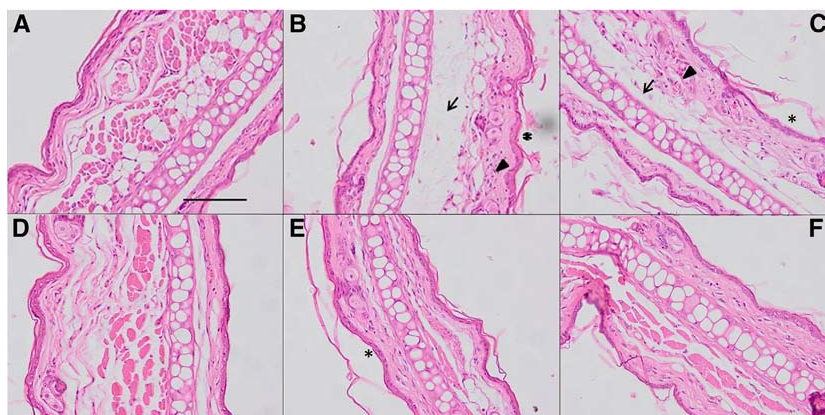


Figure 7. Micrographs of mouse ears (magnification 200×). (A) Negative control; (B) Positive control (arachidonic acid, 1 mg/mL); (C) Blank-NE; (D) Application of PGZ-NE 20 min after arachidonic acid; (E) Application of PGZ-NE 20 min before arachidonic acid; (F) Application of commercial ibuprofen gel. Scale bar = 100 μ m. Arrowheads indicate neutrophilic infiltrates, arrows indicate edema and asterisks indicate loss of *stratum corneum*.

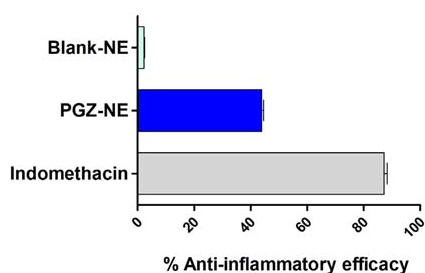


Figure 8. Anti-inflammatory efficacy after TPA-induced mouse ear edema. Mean \pm SD (n = 6).

and biocompatibility with the skin. Furthermore, transcuto!® P is also able to provide a depot effect by swelling of intercellular lipids of the SC without disruption of the multiple bilayer structure.²⁶ PGZ-NE (1 mg/mL) was transparent with monophasic appearance and had a structure constituted by spherical nanodroplets (150–220 nm) distributed uniformly in the system, which was consistent with DLS results. The small droplets provide a large surface area and uniform distribution on the skin by topical application.¹⁸ The pH was suitable for skin application which suggested non-irritating effect of formulation.²⁷

The rheological properties of dermal medications are particularly important since they are responsible for administration properties such as sensorial characteristics, spreadness and dosing behavior.²⁸ The viscosity remained constant when the shear rate increased whereas the relationship between the shear stress and shear rate was linear, which is indicative of Newtonian behavior (Figure 3). This was confirmed by mathematical modeling. The low viscosity exhibited is a typical feature of NEs. All these properties make PGZ-NE suitable for skin spray application.²²

The physical stability studies did not detect signs of destabilization of the system (creaming, sedimentation, flocculation or coalescence) over 60 days at 25 °C and 40 °C. Variations exceeding 10% in the T signals would be indicative of instability. However, as shown in Figure 4, A and B, the T signals in both cases remained constant throughout the study, confirming the stability of the system. This stability could be enhanced by the small droplet size due to the Brownian motion and steric contribution from non-ionic surfactants.²⁹

In vitro release study reveals crucial information about the drug delivery system that could be used as quality control data to predict *in vivo* behavior and to delve further into the analysis of the mechanisms involved.³⁰ The release profile of PGZ-NE revealed that PGZ was diffused faster during the first 10 h, followed by sustained release of drug (Figure 5, A). The mathematical modeling of PGZ-NE release data followed the hyperbolic equation:

$$Y = \frac{B_{max} * X}{K_d + X} \quad (1)$$

where Y is the amount of drug released at time X , B_{max} is the maximum amount of drug released, X is the release time and K_d is the release constant.³¹ In this research, B_{max} was 268.5 μ g and K_d was 8.479 h.

One of the main stages in the topical application of drugs involves the penetration through the SC and the distribution to the epidermis and dermis.³² Local efficacy of drugs administered topically depends on the ability to pass through the SC as it blocks the permeation of drug. For this reason *ex vivo* permeation studies are useful to predict *in vivo* behavior. Figure 5, B shows high permeability of PGZ from NE through the skin with a J_{ss} value of 39.7 μ g/cm²/h. This can be attributed to labrasol®, which acts as a promoter of the solubility and permeation of active molecules. In a similar manner, co-surfactants like transcuto!® P have also been reported as permeation

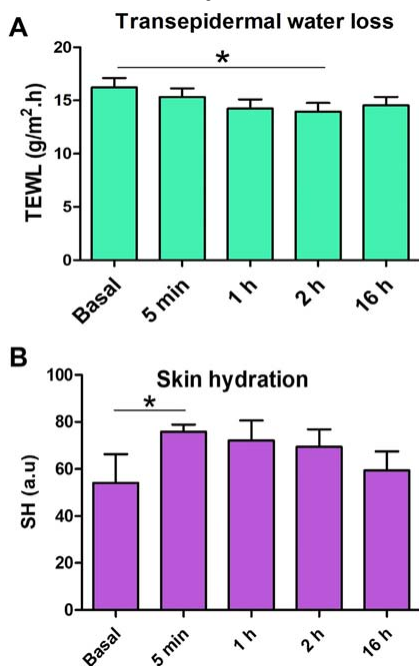


Figure 9. Tolerance studies human individuals. (A) TEWL values. (B) SCH values. Data bars represent the mean values and SD. Significant statistical differences: * $P < 0.05$.

enhancers.³³ Equally the predominance of P_l is evident likely due to the high solubility of PGZ in the NE system. The T_L value of PGZ-NE equal to 2.6 h signifies that during this period of time, the drug is being distributed into the skin and afterwards the drug is transported to the bloodstream in equilibrium form. This high value of T_L favors the achievement of the local effect, which minimizes adverse reactions. The C_{ss} of 0.089 $\mu\text{g/mL}$ allows the avoidance of the antidiabetic effect of PGZ, since it is reached at a concentration of 0.1 $\mu\text{g/mL}$ thus solely ensuring the anti-inflammatory activity.³⁴ In this line, the high value of Q_{ret} (4.07 mg/g skin/cm^2) indicates that NE formulation favors the retention of drug in the skin, which could extend the duration of drug action and, in effect, could reduce the dosing frequency in clinical practice.

Regarding the pharmacological efficacy, the anti-inflammatory potential of the proposed therapeutic agent in our study was evaluated in two different models AA and TPA-induced mouse ear edema model. Increased skin thickening is the first hallmark of skin inflammation, which is indicative of a variety of events that occur during the inflammatory process, including edema, increased vascular permeability and proliferation of epidermal keratinocytes.³⁵

Topical application of AA on mice's ears immediately caused vasodilation and erythema followed by formation of edema. The inflammatory process induced by AA was counteracted by PGZ-

NE treatment, which restored the anti-inflammatory mRNA values. This effect was evident with a significant decrease in the expression of cytokines IL-6, IL-1 β and TNF- α (Figure 6, A, B and C). In all cases studied, there was a better anti-inflammatory response when PGZ-NE was administered before the damage induction (prevention group), as compared to the response observed when PGZ-NE was applied after the inflammation. These findings corroborate with those reported in previous studies carried out on obese subjects in which the treatment with PGZ decreased the expression of adipose inflammatory parameters such as IL-6, IL-1 β and TNF- α .³⁶ Among the cytokines, TNF- α has a critical role in several inflammatory skin disorders and immunological diseases. TNF- α and interferon- γ (IFN- γ) are primary inflammatory factors that induce the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines such as IL-6, IL-8 and IL-1 β as well as adhesion molecules that stimulate accumulation of immune cells into inflammatory lesions in the skin.³⁷ Based on this approach, the anti-inflammatory potential of PGZ-NE was confirmed by its ability to decrease the production of TNF- α in the tissue (Figure 6, E). Therefore, inhibition of these cytokines represents an attractive strategy for the treatment of skin disorders such as atopic dermatitis, rosacea and psoriasis. In addition to the inhibitory effect of PGZ-NE on the expression of proinflammatory cytokines, histopathological analysis showed that topical application of AA produced loss of the SC, evident edema and leukocyte infiltrate as a result of the inflammatory process, whereas the treatment with PGZ-NE notably improved the structural characteristics of the tissue and decreased the inflammatory cell infiltrate at the area of inflammation (Figure 7).

On the other hand, topical application of TPA on the ears of the mice caused an evident increase in ear thickness and weight while the treatment with PGZ-NE notably inhibited the inflammatory effect caused by TPA (Figure 8). The inhibition of inflammation percentage was of 43.9189% \pm 1.7877%, indicating the therapeutic effect of formulation.

Together, these results reflect the role of PGZ in different events experienced during inflammatory processes and support the notion that PGZ-NE has meaningful therapeutic potential in the treatment of inflammatory skin diseases.

In order to confirm the tolerance of PGZ-NE, biomechanical skin properties were analyzed. TEWL is a noninvasive *in vivo* method that determines water loss across the SC. Therefore, it is used to assess the integrity of the skin barrier.³⁸ Thus, this technique could make manifest disturbances of the functionality of the skin barrier in early stages, even before they become visible. Hence, it is a useful tool in dermatology to detect skin irritation.³⁹ On the other hand, SCH is also a useful factor that determines the appearance and correct function of the skin due to water is the key plasticizer that confers flexibility to SC.⁴⁰ When the skin is damaged by exposure to physical or chemical agents, TEWL increases and SCH declines and these variations cause SC to become hard and brittle with subsequent cracking and fissuring following suit.⁴¹ As a general result based on TEWL and SCH values determined from this study, our PGZ-NE did not cause destabilization or damage to the skin surface of volunteers throughout the study. A significant reduction of TEWL after 2 h and an increase of SCH after 5 min were observed with respect

to the basal state, which suggest an improvement of the hydration level of SC probably due to the swelling of intercellular lipids of the SC by transcutool® P.²⁶ However, a tendency to return to the basal state was observed in both TEWL and SCH parameters, which indicates biocompatibility and suitability for human use (Figure 9, A and B).

In conclusion the present study provides evidences that topical application of the optimized PGZ-NE could be an effective system for the delivery and controlled release of PGZ, improving the biopharmaceutical profile of this drug, facilitating the contact on the skin, enhancing its dermal retention, and thus assuring a safe anti-inflammatory efficacy linked to a significant decrease in the expression of cytokines IL-6, IL-1 β and TNF- α , and avoiding systemic antidiabetic effect. The reduction of these cytokines also represents an attractive strategy for treatment of skin disorders such as atopic dermatitis, rosacea and psoriasis. The Newtonian behavior of PGZ-NE facilitates its administration by spray or roll-on and guarantees an extended duration of local action due to the high skin retention ability and tolerability. For these reasons our developed PGZ-NE can be proposed as a reasonable future treatment option of inflammation and skin disorders. These results encourage further investigation for exploiting the use of this therapeutic tool and nurture further clinical investigation in specific inflammatory skin diseases.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.03.017>.

References

- Pireddu R, Caddeo C, Valenti D, Marongiu F, Scano A, Ennas G, et al. Diclofenac acid nanocrystals as an effective strategy to reduce in vivo skin inflammation by improving dermal drug bioavailability. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;**43**:64-70.
- Zeng WJ, Tan Z, Lai XF, Xu YN, Mai CL, Zhang J, et al. Topical delivery of l-theanine ameliorates TPA-induced acute skin inflammation via downregulating endothelial PECAM-1 and neutrophil infiltration and activation. *Chem Biol Interact* 2018;**284**:69-79.
- Maurya AK, Mohanty S, Pal A, Chanotiya CS, Bawankule DU. The essential oil from Citrus limetta Risso peels alleviates skin inflammation: in-vitro and in-vivo study. *J Ethnopharmacol* 2018;**212**:86-94.
- Juránová J, Franková J, Ulrichová J. The role of keratinocytes in inflammation. *J Appl Biomed* 2017;**15**:169-79.
- Wittmann M, McGonagle D, Werfel T. Cytokines as therapeutic targets in skin inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;**25**:443-51.
- Furue K, Mitoma C, Tsuji G, Furue M. Protective role of peroxisome proliferator-activated receptor α agonists in skin barrier and inflammation. *Immunobiology* 2018;**223**(3):327-30.
- Derosa G, Sahebkar A, Maffioli P. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. *J Cell Physiol* 2018;**233**(1):153-61.
- Kothari V, Galdo JA, Mathews ST. Hypoglycemic agents and potential anti-inflammatory activity. *J Inflamm Res* 2016;**9**:27-38.
- Silva-Abreu M, Espinoza L, Rodríguez-Lagunas M, Fábrega MJ, Espina M, García M, et al. Human skin permeation studies with PPAR γ agonist to improve its permeability and efficacy in inflammatory processes. *Int J Mol Sci* 2017;**18**(12):2548.
- Taupitz T, Dressman JB, Klein S. New formulation approaches to improve solubility and drug release from fixed dose combinations: case examples pioglitazone/glimepiride and ezetimibe/simvastatin. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;**84**(1):208-18.
- Froelich A, Osmalek T, Snela A, Kunstman P, Jadach B, Olejniczak M, et al. Novel microemulsion-based gels for topical delivery of indomethacin: formulation, physicochemical properties and in vitro drug release studies. *J Colloid Interface Sci* 2017;**507**:323-36.
- Hagen M, Baker M. Skin penetration and tissue permeation after topical administration of diclofenac. *Curr Med Res Opin* 2017;**33**(9):1623-34.
- Marwah H, Garg T, Goyal AK, Rath G. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv* 2016;**23**(2):564-78.
- Pandey V, Kohli S. SMEDDS of pioglitazone: formulation, in-vitro evaluation and stability studies. *Pharm Sci* 2017;**3**:53-9.
- Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm* 2012;**2012**:195727.
- Nastiti CMRR, Ponto T, Abd E, Grice JE, Benson HAE, Roberts MS. Topical nano and microemulsions for skin delivery. *Pharmaceutics* 2017;**9**(4):E37.
- Yu M, Ma H, Lei M, Li N, Tan F. In vitro/in vivo characterization of nanoemulsion formulation of metronidazole with improved skin targeting and anti-rosacea properties. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;**88**(1):92-103.
- Alvarado HL, Calpena AC, Garduno-Ramirez ML, Ortiz R, Melguizo C, Prados JM, et al. Nanoemulsion strategy for ursolic and oleanic acids isolates from *Plumeria obtusa* improves antioxidant and cytotoxic activity in melanoma cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2018, <https://doi.org/10.2174/1871520618666180111151846>.
- Silva-Abreu M, Espinoza L, Halbaut L, Espina M, García M, Calpena A. Comparative study of ex vivo transmucosal permeation of pioglitazone nanoparticles for the treatment of Alzheimer's disease. *Polymers* 2018;**10**:316.
- Domínguez-Villegas V, Clares-Naveros B, García-López ML, Calpena-Campmany AC, Bustos-Zagal P, Garduño-Ramirez ML. Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*. *Biointerfases* 2014;**116**:183-92.
- Sosa L, Clares B, Alvarado HL, Bozal N, Domenech O, Calpena AC. Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis. *Nanomedicine* 2017;**13**(7):2303-12.
- Fernandez-Campos F, Clares Naveros B, Lopez Serrano O, Alonso Merino C, Calpena Campmany AC. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. *Mycoses* 2013;**56**:70-81.
- Mahamat Nor SB, Woi PM, Ng SH. Characterisation of ionic liquids nanoemulsion loaded with piroxicam for drug delivery system. *J Mol Liq* 2017;**234**:30-9.
- Spernath A, Aserin A. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. *Adv Colloid Interface Sci* 2006;**128-130**:47-64.
- Fernandez Campos F, Calpena Campmany AC, Rodriguez Delgado G, Lopez Serrano O, Clares Naveros B. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultra-structural effects and release studies. *J Pharm Sci* 2012;**101**:3739-52.
- Godwin DA, Kim NH, Felton LA. Influence of transcutol CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. *Eur J Pharm Biopharm* 2002;**23**(1):114-23.
- Sierra AF, Ramirez ML, Campmany AC, Martinez AR, Naveros BC. In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J Dermatol Sci* 2013;**69**(3):202-14.
- Ciurlizza C, Fernández F, Calpena AC, Lázaro R, Parra A, Clares B. Semisolid formulations containing cetirizine: human skin permeation and topical antihistaminic evaluation in a rabbit model. *Arch Dermatol Res* 2014;**306**(8):711-7.
- Sengupta P, Chatterjee B. Potential and future scope of nanoemulgel formulation for topical delivery of lipophilic drugs. *Int J Pharm* 2017;**526**:353-65.

30. Alvarado HL, Abrego G, Garduño-Ramirez ML, Clares B, Calpena AC, García ML. Design and optimization of oleanolic/ursolic acid loaded nanoplatfoms for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomedicine* 2015;**11**(3):521-30.
31. Espinoza LC, Vacacela M, Clares B, García ML, Fabrega MJ, Calpena AC. Development of a nasal donepezil-loaded microemulsion for the treatment of Alzheimer's disease: in vitro and ex vivo characterization. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2018;**17**(1):43-53.
32. Alvarado HL, Abrego G, Souto EB, Garduno-Ramirez ML, Clares B, García ML, et al. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: in vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Biointerfases* 2015;**130**:40-7.
33. Moghadam SH, Saliq E, Wettig SD, Dong C, Ivanova MV, Huzil JT, et al. Effect of chemical permeation enhancers on stratum corneum barrier lipid organizational structure and interferon alpha permeability. *Mol Pharm* 2013;**10**:2248-60.
34. Eckland D, Danhof M. Clinical pharmacokinetics of pioglitazone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000;**108**:234-42.
35. Xu XT, Mou XQ, Xi QM, Liu WT, Liu WF, Sheng ZJ, et al. Anti-inflammatory activity effect of 2-substituted-1,4,5,6-tetrahydrocyclopenta[b]pyrrole on TPA-induced skin inflammation in mice. *Bioorg Med Chem Lett* 2016;**26**(21):5334-9.
36. Esterson Y, Zhang K, Koppaka S, Kehlenbrink S, Kishore P, Raghavan P, et al. Insulin sensitizing and antiinflammatory effects of thiazolidinediones are heightened in obese patients. *J Invest Med* 2013;**61**:1152-60.
37. Lin ZM, Ma M, Li H, Qi Q, Liu YT, Yan YX, et al. Topical administration of reversible SAHH inhibitor ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in mice via suppression of TNF-alpha/IFN-gamma-induced inflammatory response in keratinocytes and T cell-derived IL-17. *Pharm Res* 2018;**129**:443-52.
38. Kelleher M, Dunn-Galvin A, Hourihane JO, Murray D, Campbell LE, McLean WH, et al. Skin barrier dysfunction measured by transepidermal water loss at 2 days and 2 months predates and predicts atopic dermatitis at 1 year. *J Allergy Clin Immunol* 2015;**135**(4):930-5.
39. Gardien KL, Baas DC, de Vet HC, Middelkoop E. Transepidermal water loss measured with the Tewameter TM300 in burn scars. *Burns* 2016;**42**(7):1455-62.
40. Sator PG, Schmidt JB, Honigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2003;**48**(3):352-8.
41. Choi EH, Man MQ, Wang F, Zhang X, Brown BE, Feingold KR, et al. Is endogenous glycerol a determinant of stratum corneum hydration in humans? *J Invest Dermatol* 2005;**125**(2):288-93.

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of PGZ

The HPLC system consisted of a Waters 1525 pump and a 2487 UV-Visible detector (Waters, Milford, CT, USA). The assay was carried out using a C18 HPLC column (250 mm × 4.6 mm, I.D., 5 µm). The mobile phase was a mixture of acetonitrile:ammonium acetate:glacial acetic acid (75:25:2, v/v). It was filtered using a membrane filter PVDF of 0.45 µm (Millipore Corp., Madrid, Spain). The mobile phase was pumped through the HPLC column at a flow rate of 0.7 mL/min. Injection volume was 20 µL. Finally the elute was analyzed at 269 nm. Data were processed using Empower Pro software (Waters, Milford, CT, USA).

Solubility of PGZ in different ingredients

The solubility of PGZ at 25 °C in several oils (plurol[®] oleique CC 497, labrafil[®] M1944 CS, labrafac[®] lipophile WL 1349 and castor oil), surfactants (cremophor[®] EL, tween 80 and labrasol[®]) and co-surfactants (transcutol[®] P, propylene glycol and polyethylene glycol) was determined. An excess of PGZ was added to 2 g of these ingredients and then mixed under stirring for 8 h. The equilibrated samples were centrifuged at 9000 rpm for 15 min and the supernatant was diluted with methanol. PGZ was subsequently quantified using Thermo Spectronic Helios Beta UV-Visible spectrophotometer.

Ingredient	Solubility (mg/g)
Plurol [®] oleique CC497	0.03 ± 0.07
Castor oil	0.9 ± 0.5
Labrafil [®] M1944 CS	0.05 ± 0.05
Lauroglycol [®] 90	0.08 ± 0.13
Tween [®] 80	1.15 ± 1.23
Labrasol [®]	1.50 ± 0.09
Cremophor [®] EL	0.09 ± 0.03
Transcutol [®] P	1.89 ± 0.18
Propylene glycol	1.73 ± 0.72
Polyethylene glycol 400	1.46 ± 1.02

3.4. Artículo 4

Topical Pioglitazone Nanoformulation for the Treatment of Atopic Dermatitis: Design, Characterization and Efficacy in Hairless Mouse Model

Lupe Carolina Espinoza^{1,2,*}, Rodrigo Vera-García^{3,4}, Marcelle Silva-Abreu^{1,5}, Òscar Domènech^{1,5}, Josefa Badia^{3,4}, María J. Rodríguez-Lagunas^{3,6}, Beatriz Clares^{5,7} and Ana Cristina Calpena^{1,5}

¹ Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

² Departamento de Química y Ciencias Exactas, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja 1101608, Ecuador.

³ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

⁴ Institute of Biomedicine, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

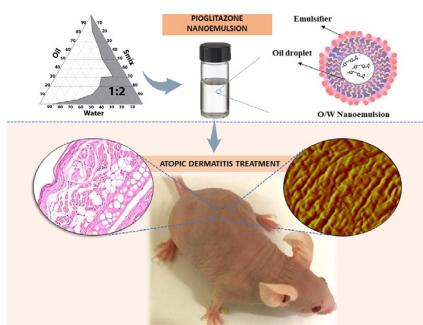
⁵ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

⁶ Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain.

⁷ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18002 Granada, Spain.

<i>Revista:</i>	Pharmaceutics
<i>Año de publicación:</i>	2020
<i>ISSN:</i>	1999-4923
<i>Factor de impacto:</i>	4.773
<i>DOI:</i>	10.3390/pharmaceutics12030255

Graphical abstract





Article

Topical Pioglitazone Nanoformulation for the Treatment of Atopic Dermatitis: Design, Characterization and Efficacy in Hairless Mouse Model

Lupe Carolina Espinoza ^{1,2,*} , Rodrigo Vera-García ^{3,4} , Marcelle Silva-Abreu ^{1,5} ,
 Óscar Domènech ^{1,5} , Josefa Badia ^{3,4}, María J. Rodríguez-Lagunas ^{3,6} , Beatriz Clares ^{5,7}
 and Ana Cristina Calpena ^{1,5}

- ¹ Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; marcellesabreu@gmail.com (M.S.-A.); odomenech@ub.edu (Ö.D.); anacalpena@ub.edu (C.C.)
 - ² Departamento de Química y Ciencias Exactas, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja 1101608, Ecuador
 - ³ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; rodrigo.vera.garcia@ub.edu (R.V.-G.); josefabadia@ub.edu (J.B.); mjrodriguez@ub.edu (M.J.R.-L.)
 - ⁴ Institute of Biomedicine, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
 - ⁵ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; beatrizclares@ugr.es
 - ⁶ Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
 - ⁷ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18002 Granada, Spain
- * Correspondence: lcespinoza@utpl.edu.ec

Received: 19 February 2020; Accepted: 9 March 2020; Published: 12 March 2020



Abstract: Pioglitazone (PGZ) is a drug used to treat type 2 diabetes mellitus that has been reported to show additional therapeutic activities on diverse inflammatory parameters. The aim of this study was to optimize a topical PGZ-loaded nanoemulsion (PGZ-NE) in order to evaluate its effectiveness for treating atopic dermatitis (AD). The composition of the nanoformulation was established by pseudo-ternary diagram. Parameters such as physical properties, stability, in vitro release profile, and ex vivo permeation were determined. The efficacy study was carried out using oxazolone-induced AD model in hairless mice. PGZ-NE released the drug following a hyperbolic kinetic. Additionally, its properties provided high retention potential of drug inside the skin. Therapeutic benefits of PGZ-NE were confirmed on diverse events of the inflammatory process, such as reduction of lesions, enhancement of skin barrier function, diminished infiltration of inflammatory cells, and expression of pro-inflammatory cytokines. These results were reinforced by atomic force microscope (AFM), which demonstrated the ability of the formulation to revert the rigidification caused by oxazolone and consequently improve the elasticity of the skin. These results suggest that PGZ-NE may be a promising treatment for inflammatory dermatological conditions such as AD.

Keywords: atopic dermatitis; pioglitazone; nanoemulsion; Pluronic F127

1. Introduction

Atopic dermatitis (AD) is commonly referred to as atopic eczema and is a chronically relapsing, inflammatory, and intensely pruritic skin disease that affects up to 20% of children and 1–3% of adults [1]. It is caused by a complex interaction among genetic predispositions, environmental factors,

and dysregulation of the immune system. Symptoms of AD include: a fluctuating course, hyperactive immune response to environmental factors, skin barrier dysfunction, drying, itching, and highly inflamed skin lesions [2,3]. These symptoms can provoke psychological distress and functional disturbances that significantly impact the quality of life of patients [4]. The molecular mechanisms underlying the visible signs of the disease are highly diverse, including the immunological activation of a variety of T helper (Th) cells such as Th1, Th2, Th17, and Th22 accompanied by defective epidermal barrier functionality. The clinical features depend on the age and the phase of the disease (acute or chronic). An overexpression of inflammation markers associated with Th17 have been observed in pediatric, Asian, intrinsic, and elderly patients with AD [5,6]. Th17 activation stimulates the production of Th2-associated cytokines and induces skin barrier impairment, therefore Th17 targeting could be used as an effective strategy to treat AD among these patient groups [3].

Diagnostic criteria of AD are based on clinical observation, allergy tests, and systematically ruling out other skin disorders [5]. AD treatment is focused on reducing itching, restoring skin, and attenuating the inflammation. To that end, patients with AD require topical treatment with emollients to provide soothing and moisturizing effects in addition to anti-inflammatory therapies with topical calcineurin inhibitors or glucocorticosteroids. In severe cases, systemic treatment using glucocorticoids, cyclosporine A, azathioprine, and mycophenolate mofetil may be required [7]. However, systemic therapy shows serious adverse effects and has limited efficacy in many patients in whom the symptoms often reappear after discontinuing treatment [8]. Conventional topical treatment (creams, ointments, and lotions) shows limited accessibility into the skin. Thus, there are unsatisfied needs for novel topical formulations that penetrate deep into the epidermis to provide more effective treatment of AD [9,10].

The incorporation of drugs into a nanoemulsion (NE) could be used as a strategy to facilitate its topical application and improve the permeation of drug into the skin due to its content of oil and surfactants, nanometric droplet size, and high solubilizing potential for lipophilic and hydrophilic drugs [11,12]. Moreover, an additional advantage could be provided by the addition of a polymer in the aqueous phase of NE in order to overcome its low viscosity and consequently improve its appearance, facilitate its application, increase its residence time at the site of action, and improve dermal bioavailability of the drug [13,14]. Amphiphilic block co-polymers are used as pharmaceutical excipients in several dosage forms because the chemical flexibility of their structure allows the development of versatile drug carriers [15,16].

Pioglitazone-HCl (PGZ) is a member of the thiazolidinediones and is used to treat type 2 diabetes mellitus (T2DM) due to its efficacy in glycemic control by acting as an insulin sensitizer. PGZ is categorized as a class II drug according to the Biopharmaceutical Classification System, and has a molecular weight of 392.9 g/mol, pK_a of 5.8 and 6.8, and $\log P$ of 2.3 [17]. PGZ is a selective agonist of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), which is a nuclear transcription factor that modulates the expression of multiple genes, regulates metabolic processes (lipid and glucose metabolism), and reduces inflammatory responses [18]. PGZ therapy in animal models, patients with T2DM, and obese subjects has shown beneficial effects on diverse inflammatory parameters such as reduced infiltration of macrophages, neutrophils, and dendritic cells as well as suppressed expression of Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), and Interleukin-17 (IL-17) [19,20]. Based on these findings, it is evident that the therapeutic activities of PGZ go far beyond its role on glycemic control and suggest that it could be a promising candidate for the treatment of inflammatory dermatological conditions [21].

The aim of this study was to develop a PGZ-loaded nanoemulsion (PGZ-NE) and investigate its effect on clinical, histological, and immunological aspects of AD using oxazolone-sensitized hairless mouse model.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

PGZ was obtained from Capot Chemical (Hangzhou, China). Capryol 90 (propylene glycol monocaprylate), Labrasol (caprylocaproyl polyoxyl-8 glycerides), and Transcutol-P (diethylene glycol monoethyl ether) were provided by Gattefossé (Saint-Priest, France). Pluronic F127 (Poloxamer 407) was obtained from Fragon (Barcelona, Spain). Oxazolone was purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Components for histological analysis were purchased from Sigma and Thermo Fisher Scientific (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained using a Millipore Milli-Q purification system (Millipore Corporation; Burlington, MA). All reagents were of analytical grade.

2.2. Pseudo-Ternary Phase Diagrams and Preparation of PGZ-NE

The components used in the construction of the pseudo-ternary phase diagram were selected based on their solubilizing capacity for PGZ. Reported results of this parameter were used and an additional determination for Capryol 90 was performed following the prescribed method [21]. Capryol 90 was selected as the oil phase, Labrasol as surfactant, Transcutol-P as cosurfactant, and water as the aqueous phase. Labrasol and Transcutol-P (Smix) were used at the ratio 1:2. To determine the boundaries of diagram, oil and Smix were mixed at the ratios from 9:1 to 1:9 (*w/w*) while water was added to each mixture by titration method until turbidity or phase separation. PGZ-NE (1 mg/mL) was prepared by incorporating PGZ in oil phase under stirring at 700 rpm for 15 min, after which Labrasol and Transcutol-P were incorporated by continuous stirring for 20 min. Finally, the solution of Pluronic F127 dissolved in water was added under the same condition of stirring for 15 min.

2.3. Characterization of PGZ-NE

Calibrated digital pH meter GLP 22 (Crison Instruments; Barcelona, Spain) was used to determine the pH of PGZ-NE.

The droplet size and polydispersity index of the formulation were evaluated without dilution after 24 h of preparation at 25 °C by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments; Worcestershire, UK). Data were expressed as mean + standard deviation (SD) from three replicates.

Morphological examination of an undiluted sample of PGZ-NE was performed by transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL JEM-1010 electron microscope (JEOL Ltd.; Tokyo, Japan). The sample preparation consisted of negative staining with uranyl acetate and 24 h of drying.

Viscosity and rheological behavior were evaluated 24 h after PGZ-NE preparation using a HAAKE RheoStress 1 rheometer (Thermo Fisher Scientific; Karlsruhe, Germany) by a program of three-step shear profile: a ramp-up period (0–50 s⁻¹) for 3 min followed by a constant shear rate period at 50 s⁻¹ for 1 min and a ramp-down period (50–0 s⁻¹) for 3 min. The viscosity value was determined from the viscosity curve. Obtained data from the flow curve were fitted to several mathematical models in order to determine which best statistically represents the experimental data based on the correlation coefficient value (*r*) and chi-squared value.

The extensibility of PGZ-NE was examined in triplicate following the previously described method [22]. A sample of 0.15 g was placed on the center of the base plate of an extensometer followed by immediate placement of a glass plate (26.86 g) on top of the sample. The extended area was measured after an equilibrium period of 1 min. Afterwards, the sample was compressed by adding known weights (36.86, 46.85, 76.85, 126.83, and 226.80 g) at 30 s intervals, after which the area of the sample was recorded.

2.4. *In vitro* Release Study

The release study of PGZ from the formulation was carried out using Franz diffusion cells of 13 mL (FDC 400; Crown Glass; Somerville, NJ) filled with receptor medium that consisted of a mixture

of DMSO (dimethyl sulfoxide):water (60:40, *v/v*) which was maintained at 32 °C and under continuous stirring in order to achieve the sink conditions. A dialysis membrane (MWCO 12 KDa) previously hydrated and degreased for 24 h with methanol:water (50:50, *v/v*) was washed with water and mounted between the donor and receptor compartment. The effective diffusion area was 2.54 cm². Then, 0.2 mL of formulation was placed in the donor compartment. Aliquots of 300 µL were extracted from the receptor compartment and replaced with the same volume of receptor medium at predetermined time intervals over a 46 h period. The collected samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in order to quantify the amount of PGZ released [23]. Results are shown as mean ± SD from three replicates. Data from the release curve were fitted to following kinetic models: first order, Higuchi, Hyperbolic, Weibull, and Korsmeyer–Peppas. The model with the best fit of the experimental data was selected based on the coefficient of determination (*r*²). Additional amodelistic parameters, including dissolution efficiency (DE) and mean dissolution time (MDT), were calculated from the experimental release curve.

DE was suggested by Khan and Rhodes (1972) as a parameter for the evaluation of *in vitro* dissolution [24]. This is estimated from the cumulative curve of dissolution rate using Equation (1):

$$DE (\%) = \frac{\int_0^t A_d dt}{A_{d100} \cdot t} \cdot 100 \quad (1)$$

where $\int_0^t A_d dt$ is the area under the dissolution curve up to a time (*t*) and $A_{d100} \cdot t$ is the area of the rectangle calculated from the maximum experimental amount of drug released and the last time interval of the experiment.

MDT is the mean residence time of drug in the formulation. It is calculated using Equation (2).

$$MDT = \frac{\sum(t_i \Delta A_{dt})}{A_{d\infty}} \quad (2)$$

t_i is the midpoint of a time interval, *A_{dt}* is the increase in the amount of dissolved drug at the corresponding interval, and *A_{d∞}* is the maximum amount of dissolved drug in the experiment.

2.5. *Ex vivo* Permeation Study

Human skin of a healthy 38-year old woman obtained during an abdominal lipectomy (Hospital of Barcelona, SCIAS, Barcelona, Spain) with previous written informed consent in accordance with the Ethical Committee of the Hospital of Barcelona (number 001, dated 20 January 2016) was used to carry out the assay. The integrity of the skin samples was evaluated by Transepidermal water loss (TEWL) using a Tewameter TM 300 (Courage & Khazaka Electronics GmbH; Cologne, Germany) and those with results below 10 g/m²h were used. Skin samples (0.4 mm thick) were mounted between the donor and receptor compartment of Franz diffusion cell (6 mL) with diffusion area of 0.64 cm². The receptor medium consisted of a mixture of Transcutol-P:water (60:40, *v/v*) which was kept at 32 °C and under stirring at 600 rpm to guarantee sink conditions. The rest of the assay was performed as described in Section 2.5.

After permeation studies, the amount of PGZ retained in the skin (*Q_{ret}*, mg/g skin/cm²) was extracted by ultrasound-assisted extraction. The skin samples were removed from Franz diffusion cells and washed with distilled water. The edges were cut in order to retain only the permeation area, which was weighed and immersed in 2 mL of methanol for 20 min using an ultrasonic bath. Afterwards, the solution was filtered and analyzed by HPLC.

2.6. Efficacy Studies: Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis

2.6.1. Animals and Study Protocol

The efficacy studies were carried out in female hairless mice SKH-1 (Charles River Laboratories; France) that were 7–9 weeks old following a previously approved protocol by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona (Generalitat de Catalunya Ref. 8756, data 28/01/2016). The mice were sensitized by topical application of 20 μL of 2.5% oxazolone dissolved in acetone on dorsal skin. Seven days later, 60 μL of 0.1% oxazolone were applied daily over a period of 16 days in order for the mice to retain the disease throughout the duration of the experiment. The sensitized mice were classified into two groups ($n = 3$): one group was treated with 30 μL of PGZ-NE (PGZ-NE group), whereas the other was treated with 30 μL of water (positive control group) for 9 days starting on Day 15 until the finalization of the experiment on Day 23. Treatment with PGZ-NE or water was applied 1 h after 0.1% oxazolone application. A negative group that was comprised of healthy mice was also used to compare the results. The mice were euthanized 8 h following the final treatment and the area of skin used in the experiment was surgically excised. Thickness of these extracted skin was measured using a Pocket Thickness Gage 7309 (Mitutoyo Corp.; Kawasaki, Japan).

2.6.2. Biomechanical Skin Properties Evaluation

TEWL and SCH (Stratum corneum hydration) of the mice's dorsal skin were evaluated at 0, 7, 15, 17, 19, 21 and 23 days prior to application of oxazolone and treatment. These parameters were measured using a Tewameter TM 300 (Courage & Khazaka Electronics GmbH; Cologne, Germany) and a Corneometer 825 (Courage & Khazaka Electronics GmbH; Cologne, Germany), respectively.

2.6.3. Skin Evaluation by Atomic Force Microscopy (AFM)

Skin samples of each group were studied using an AFM Multimode IV controlled by Nanoscope V electronics (Bruker AXS Corporation; Santa Barbara, CA). Silicon AFM tips with a nominal spring constant of 42 nN nm^{-1} were used. For force spectroscopy measurements, the spring constant of each cantilever was determined using the thermal noise method.

Hairless mouse skin was defrosted at room temperature and immediately attached onto a steel disc with an epoxy resin. The surface was rinsed gently with buffer and water, and then subsequently dried with nitrogen. Each sample was directly mounted on top of the AFM scanner and imaged. Images were acquired in both air and contact mode at 0° scan angle with a scan rate of 3 Hz. The environment was maintained at 24 $^\circ\text{C}$ and 60% humidity. All images were processed using NanoScope Analysis Software (Bruker AXS Corporation; Madison, WI).

Young's modulus evaluation of the skin samples was determined as a first approximation by using the Hertz model. Mechanical properties were measured by recording arrays of 32×32 force curves of selected regions using a maximum force of 0.5–1 nN in order to avoid sample damage with approach and retraction speeds of 1.0 $\mu\text{m/s}$ and a contact time of 100 ms.

2.6.4. Histological Analysis

For histological observation of skin architecture, hematoxylin and eosin staining was performed. The skin samples of each group were rinsed with Phosphate-buffered saline (PBS) and immediately fixed in 4% buffered formaldehyde at room temperature. After fixation, all samples were paraffin embedded onto cassettes, sectioned into 5 μm slices, mounted on microscope slides and stained with hematoxylin and eosin. Finally, the samples were viewed using Olympus BX41 microscope equipped with Olympus XC50 camera.

2.6.5. Pro-Inflammatory Cytokines Determination

The RNA was isolated from mouse skin using RNA Pro solution (MP Bio; Solon, OH). The samples were transferred to microtubes containing ceramic beads and placed in a FastPrep-24 instrument for three cycles of 30 s, 5500 rpm. The homogenate was utilized for RNA extraction using the illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare; Chicago, IL) in accordance with the manufacturer's instructions. The concentration and purity of RNA samples were evaluated by calculating the ratio of absorbance at 260 and 280 nm using the NanoDrop[®] spectrophotometer TM 2000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). RNA (1 µg) was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems; Foster City, CA) in a final volume of 20 µL following the manufacturer's recommendations. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed in a StepOnePlus PCR cycler (Applied Biosystems; Foster City, CA) by using SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Foster City, CA) and specific oligonucleotides for IL-6, IL-17, and TNF-α. The housekeeping β-actin gene was used as a normalizing gene (Table 1). The standard polymerase chain reaction (PCR) program was: 5 min at 94 °C for denaturalization, 30 cycles of amplification at 72 °C for 2 min, 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C, and a final cycle at 72 °C for 10 min for final extension. Relative gene expression was represented as fold-change compared with control and was calculated by ΔΔ Ct formula.

Table 1. Primer sequences used for real time polymerase chain reaction (PCR) in mouse.

Primer	Sequence (5' to 3')
β-actin	FW: GTGGGGCGCCCGAGGCACCA
	RV: CTCCTTAATGTCACGCACGATTC
IL-17	FW: TTTTCAGCAAGGAATGTGGA
	RV: TTCATTGTGGAGGGCAGAC
IL-6	FW: TAGTCCTTCTACCCCAATTCC
	RV: TTGGTCCTTAGCCACTCTTCC
TNF-α	FW: AACTAGTGGTGCCAGCCGAT
	RV: CTTACAGAGCAATGACTCC

IL-17 = Interleukin-17; IL-6 = Interleukin-6; TNF-α = Tumor necrosis factor-alpha; FW = forward primer; RV = reverse primer.

2.6.6. Statistical Analyses

Statistical analysis was performed using SPSS (version 20.0; Chicago, IL) software package. All assays were repeated at least three times independently in triplicate. The values are presented as the mean ± SD. Differences among more than two groups were assessed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. The p-values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Pseudo-Ternary Phase Diagram and Formulation

Pseudo-ternary phase diagram was constructed using the excipients that exhibit the greatest solubilizing potential for PGZ. Capryol 90 (oil phase), Labrasol (surfactant), and Transcutol-P (cosurfactant) show a solubilizing capacity of 1.02, 1.5, and 1.89 mg/g, respectively [21]. The obtained diagram using a mixture of Labrasol and Transcutol-P at the ratio 1:2 exhibited a great area of emulsification for the incorporation of the drug (Figure 1).

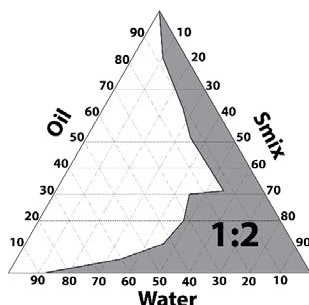


Figure 1. Pseudo-ternary phase diagrams: Capryol 90 (oil phase), Labrasol (surfactant), Transcutol-P (cosurfactant), and water (aqueous phase). Labrasol and Transcutol-P were mixed at the ratio 1:2 (w/w).

Final formulation of PGZ-NE (Table 2) was obtained by incorporating PGZ in Capryol 90 (8%), Labrasol (19%), Transcutol-P (38%), water (17%), and Pluronic F127 (18%). The addition of the triblock copolymer Pluronic F127 into NE was an uncomplicated process thanks to its amphiphilic nature, which allowed it to form a homogeneous mixture with oil, surfactant and cosurfactant of the NE.

Table 2. Final formulation of pioglitazone-nanoemulsion (PGZ-NE).

Components	(%)
Pioglitazone (1 mg/mL)	
Capryol 90 (propylene glycol monocaprylate),	8
Labrasol (caprylocaproyl polyoxyl-8 glycerides)	19
Transcutol-P (diethylene glycol monoethyl ether)	38
Water	17
Pluronic F127 (Poloxamer 407)	18

3.2. Characterization of PGZ-NE

PGZ-NE had a pH value of 5.23 as well as a transparent, homogeneous, and fluid appearance with no thermoreversible gelation properties.

The mean droplet size was 158.30 ± 4.67 nm with a PI value of 0.28 ± 0.06 . These results were consistent with the images observed by TEM (Figure 2A), which showed the presence of nano-droplets of spherical shape and uniform distribution.

Figure 2B shows the rheological profile of PGZ-NE obtained at 25 °C. The flow curve exhibits a linear relationship between shear stress and shear rate, whereas the viscosity curve shows a constant value of 90.75 ± 0.003 mPa·s as the shear rate increased, which is characteristic of Newtonian fluids. The mathematical equation that best described experimental data ($r^2=1$) was the Newton model, which consequently confirmed the Newtonian behavior of the system.

Figure 2C shows the extensibility profile of the formulation, whose values increased proportionally with loading weight until reaching a maximum extensibility of 22.2 cm². According to the mathematical modeling, this formulation showed one phase association profile at 25 °C.

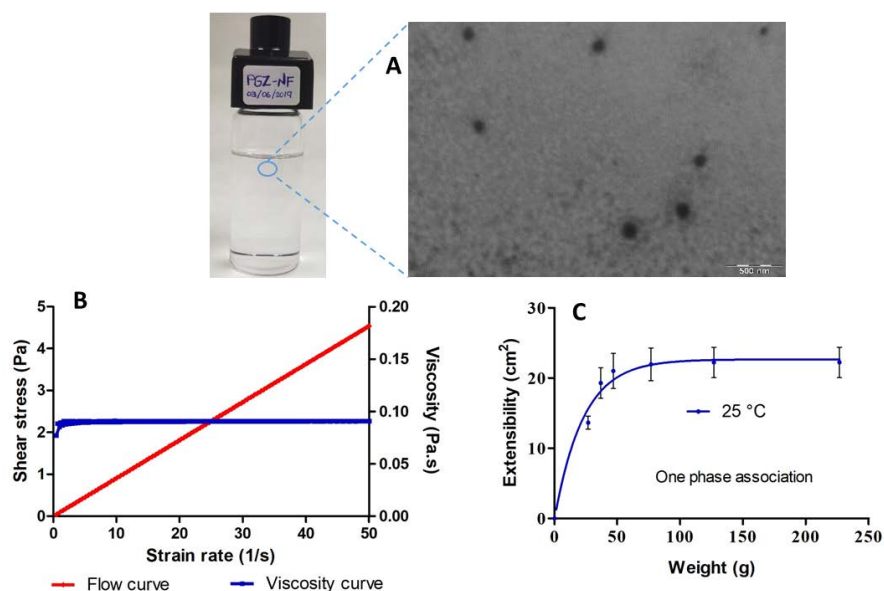


Figure 2. Characterization of pioglitazone-nanoemulsion (PGZ-NE): (A) transmission electron microscopy (TEM) image of PGZ-NE. Magnification 40,000 \times ; (B) rheogram of PGZ-NE at 25 $^{\circ}$ C showing both flow and viscosity curves; and (C) extensibility profile of PGZ-NE at 25 $^{\circ}$ C.

3.3. In Vitro Release Study

The graphical representation of the cumulative amount of drug released from the formulation versus time is shown in Figure 3. After 46 h of assay, an amount of 187 μ g of PGZ was released from the NE, representing 93.5% of the drug placed in the donor compartment. The best fit of the experimental data was obtained with the hyperbolic model with a $r^2 = 0.9997$ and whose mathematical equation is $Y = B_{\max}X / K_d + X$, where the amount of drug released (Y) at a certain time (X) is equal to the quotient between the maximum amount of drug released (B_{\max}) multiplied by X and the release constant (K_d) multiplied by X. In this work, B_{\max} was found to be 309.3 μ g and K_d was 29.86 h. Additionally, amodelistic parameters evaluation showed values of 64.59% for the DE and 16.29 h for the MDT. These amodelistic pharmacokinetic parameters were calculated from the experimental data independent of the mathematical modeling.

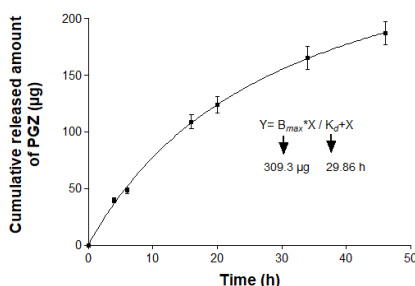


Figure 3. In vitro release profile of pioglitazone (PGZ) from nanoemulsion (NE). Data represented by mean \pm standard deviation (SD) ($n = 3$).

3.4. Ex Vivo Permeation Study

The evaluation by HPLC of the aliquots extracted from the receptor compartment showed that PGZ did not permeate through human skin and thus the permeation and prediction parameters could not be calculated. However, PGZ was found inside the skin showing a high retention value of 478.08 $\mu\text{g/g skin/cm}^2$.

3.5. Efficacy Studies: Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis

Topical application of oxazolone on the hairless mice skin induced hallmarks of AD such as erythema, scaling, and edema, all of which were macroscopically evident on Day 15 of the experiment. The positive control group showed a worsening of these symptoms as oxazolone application on skin proceeded. In contrast, PGZ-NE progressively improved skin appearance from the second day of treatment. The skin lesions of this group visibly disappeared, showing healthy skin that was comparable to the negative control at the end of the experiment.

3.5.1. Biomechanical Skin Properties Evaluation

Topical application of oxazolone on the skin significantly increased TEWL and decreased SCH due to damage of the skin barrier, which is consistent with the lesions observed macroscopically. Despite this, the mice that received PGZ-NE by topical administration significantly reduced TEWL from the second day of treatment and increased SCH from the fourth day of treatment to the point of not displaying significant differences with respect to the basal state in both parameters (Figure 4A,B). The thickness evaluation of the skin extracted after the experiment also corroborated these findings, as a markedly greater thickness was observed in the positive control compared to the PGZ-NE group (Figure 4C). These results indicate that PGZ-NE reduces inflammation and alleviates oxazolone-induced skin lesions.

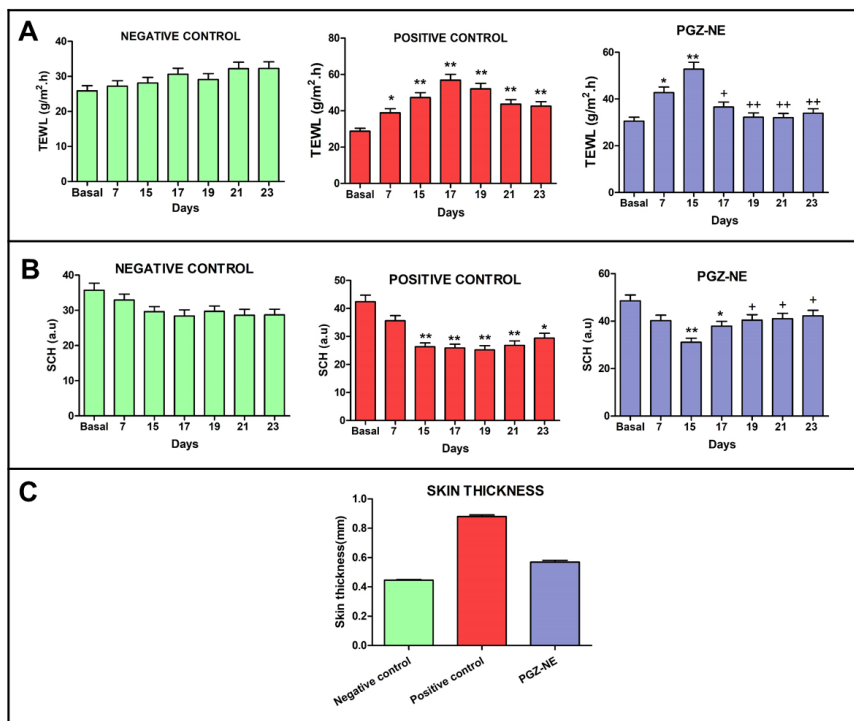


Figure 4. Evaluation of skin barrier function in each experimental group using oxazolone-induced atopic dermatitis model: **(A)** Transepidermal water loss (TEWL); **(B)** Stratum corneum hydration (SCH); and **(C)** skin thickness. Results are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Significant statistical differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparison with the basal state. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ comparison with Day 15 (first administration of PGZ-NE).

3.5.2. Skin Evaluation by AFM

To perform an in-depth investigation of the impact of oxazolone on hairless mice skin and the reversion of the effects due to the application of PGZ-NE, the nanostructure of both healthy and damaged skin was analyzed with atomic force microscope (AFM). Figure 5 shows AFM ‘Deflection Error’ images of untreated skin (negative control; Figure 5A,B), positive control (Figure 5D,E), and skin treated with PGZ-NE (Figure 5G,H). Negative control (healthy skin) showed a wavy surface with a mean roughness value of 33 ± 6 nm while the treatment with oxazolone (positive control) prompted the presence of amorphous structures (represented by black arrows in Figure 5E) that were 0.5–1 μ m in size, with hundreds of nanometers protruding from structureless regions (represented by the encircled dashed line structure in Figure 5E). After the treatment with the PGZ-NE, the skin once again displayed a wavy surface but with additional round-shaped structures on it. These round structures were 200–300 nm in size and 10–20 nm in height and, in this case, the skin was smoother with a mean roughness value of 11.0 ± 1.8 nm.

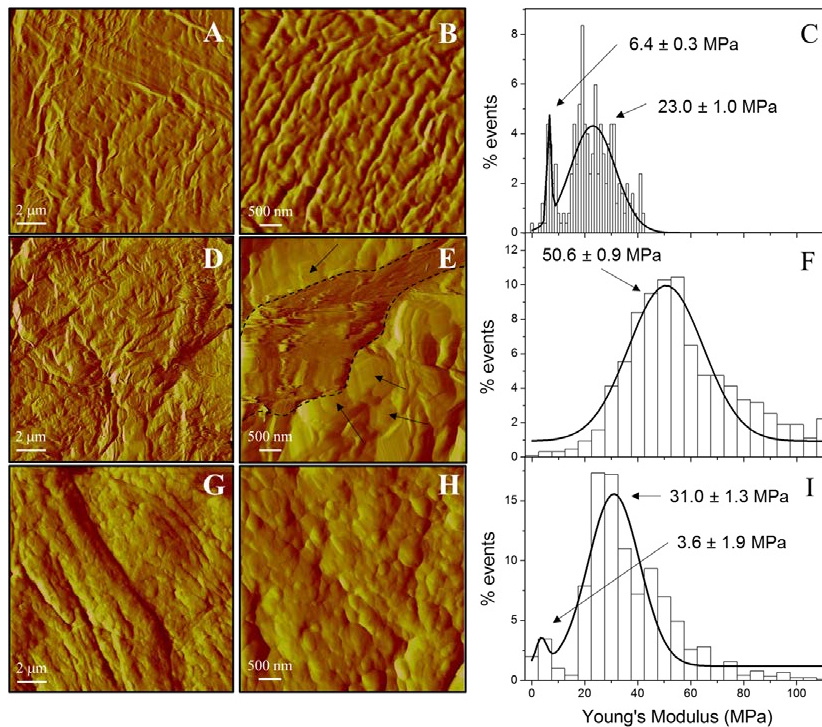


Figure 5. Atomic Force Microscopy (AFM) deflection error images and Young's modulus distribution for: control skin (A–C); skin treated with oxazolone (D–F); and skin treated with PGZ-NE (G–I). The continuous lines in Young's modulus distribution represent the fitting of the experimental data to normal distributions.

The elasticity of the skin was evaluated via Young's modulus determination. Figure 5 depicts the distribution of Young's modulus for the negative control (Figure 5C), positive control (Figure 5F), and post-application of PGZ-NE (Figure 5I). The mean of Young's modulus for the negative control is 23 MPa, which is consistent with other reports on mouse skin determinations [25]. However, a second peak is observed at lower values, which may be attributed to lower adhesion of corneocytes that were eliminated as the skin surface was being rinsed. The treatment with oxazolone (positive control) provoked a rigidification of the skin because the mean of Young's modulus is 50.6 MPa, which was more than twice the value of the negative control. Interestingly, the application of PGZ-NE reversed the rigidification because of the oxazolone, as evidenced by the reduction of the Young's modulus value to 31 MPa.

3.5.3. Histological Analysis

As shown in Figure 6A, healthy skin (negative control) consisted of an epidermis with a contiguous stratum corneum and a normal appearance followed by unaltered dermis with dermal appendages, including sebaceous glands and hair follicles. Positive control (Figure 6B) showed signs of dermatitis including inflammatory cell infiltrate and loss of stratum corneum accompanied by an initial loss of dermal appendages. PGZ-NE topically applied on skin (Figure 6C) prevented the loss of stratum corneum, decreased the infiltration of inflammatory cells, and reduced the alteration of the dermal appendages.

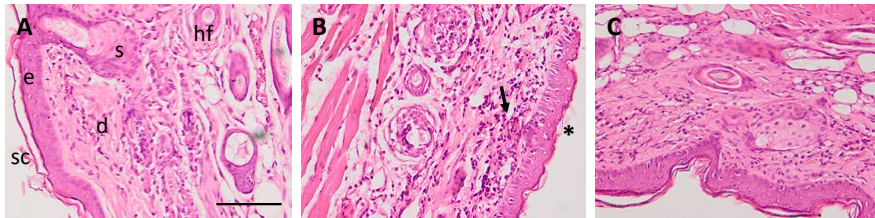


Figure 6. Representations of histological sections (original magnification, $\times 200$) of mouse skin: (A) control conditions/negative control; (B) oxazolone-induced atopic dermatitis/positive control; and (C) PGZ-NE treatment in mice with oxazolone-induced atopic dermatitis. Skin structures: epidermis (e) dermis (d), sebaceous gland (s), hair follicle (hf), stratum corneum (sc), loss of stratum corneum (asterisk), and inflammatory cell infiltrate (black arrow). Scale bar = 100 μm .

3.5.4. Pro-Inflammatory Cytokines Determination

The RT-qPCR analysis revealed a significant increase in the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-17 in the positive control when compared to the negative group. The treatment with PGZ-NE in mice with induced dermatitis significantly reduced the expression of these cytokines to levels similar to those of the negative control. These results confirm the role of PGZ in the regulation of inflammatory processes (Figure 7).

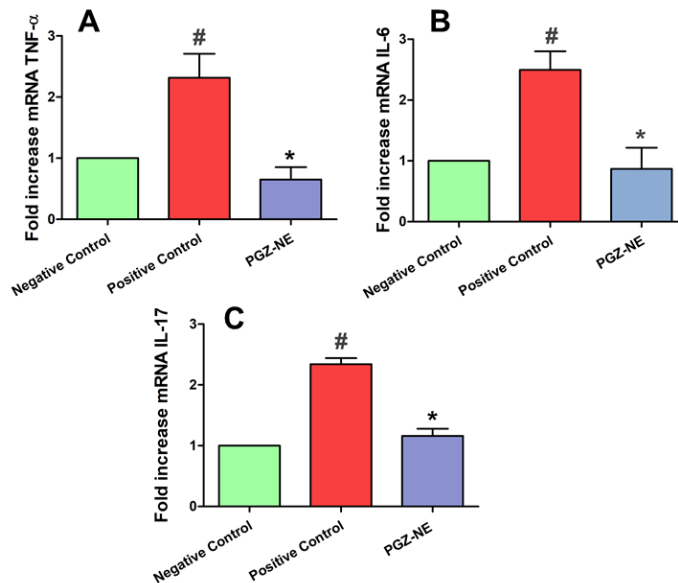


Figure 7. Relative expression of pro-inflammatory cytokines measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR): (A) Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α); (B) Interleukin-6 (IL-6); and (C) Interleukin-17 (IL-17). Negative control (healthy mice), positive control (mice with oxazolone-induced atopic dermatitis) and PGZ-NE group (mice with oxazolone-induced atopic dermatitis treated with PGZ-NE). # $p < 0.05$ negative control vs. positive control. * $p < 0.05$ positive control vs. PGZ-NE treatment.

4. Discussion

In this study, the incorporation of PGZ in a NE was used as a strategy to treat AD via topical application on skin. The final formulation was prepared using pharmaceutical excipients with high solubilizing potency for the drug. The oil phase was composed of Capryol 90, which is a lipophilic solubilizer consisting of a mixture of propylene glycol mono- and diesters of caprylic acid. Labrasol was used as nonionic oil/water (O/W) surfactant because it has a hydrophilic lipophilic balance (HLB) of 14. Transcutol-P was used as cosurfactant, which is an effective hydrophilic solvent that increases the solubility of both lipophilic and hydrophilic drugs [26]. Considering the high safety and biocompatibility of Transcutol-P, a ratio of 1:2 was chosen for the mixture of Labrasol and Transcutol-P in the construction of the pseudo-ternary diagram (Figure 1). Moreover, the non-ionic triblock copolymer Pluronic F127 was incorporated in the aqueous phase to increase the viscosity of the final formulation and consequently facilitate its application while increasing its residence time in the skin. This polymer exhibits amphiphilic nature, non-toxic properties, and can interact with biological membranes [27]. The final formulation of PGZ-NE (1 mg/mL) had a slightly acidic pH value, which is biocompatible with the natural acidity of the skin and thus assures non-irritating effects. The physical characterization by DLS and TEM confirmed a structure consisting of droplets of nanometric size and spherical shape (Figure 2A). This feature provides optical transparency, a large surface area, and uniform distribution on the skin. A topical formulation should have optimal organoleptic characteristics with appropriate consistency and spreadability in order to provide an aesthetically appealing vehicle for the patient that is pleasant and easy to use as well as being able to remain in the treated area for the required time. Rheology determines sensorial properties, filling/dosing behavior, spreadability, and can modulate biopharmaceutical parameters, including release rates [28]. The rheological behavior of the studied formulation was determined from the flow curve, where the relationship between shear stress and shear rate was linear whereas the viscosity remained constant. In this sense, the PGZ-NE was defined as a Newtonian fluid based on its best fit to the Newton model (Figure 2B). The study of the extensibility area provides a measure of the deformation threshold of the vehicle. A topical formulation should exhibit optimal spreadability, since a product with very high extensibility (too fluid) or with very low extensibility (too viscous) could be unpleasant or uncomfortable for patients [28,29]. The extensibility areas obtained from PGZ-NE evidence a formulation that is easy to apply and pleasant to the touch (Figure 2C).

Interactions between vehicle and drug determine the release profile, which in turn affects the subsequent percutaneous permeation. After 46 h of assay, 93.5% of the drug was released from NE (Figure 3). This result suggests that the vehicle is capable of releasing the drug and thus the formulation does not limit permeation of the drug through the skin [28]. The release kinetic of PGZ from NE followed a hyperbolic model, where a rapid release of 50% of PGZ occurred within an initial phase of 16 h and the remaining drug was slowly released during a longer second period of 30 h. In an equal manner, the amodelistic parameters evaluation that were carried out as part of the quality control confirmed an acceptable value of DE (64.59%) and MDT (16.29 h). These values are consistent with the graphic representation of the release study, in which it can be observed that the drug release curve is placed slightly above half of the rectangle represented by last time interval of the experiment (46 h) and the maximum experimental amount of drug released (187 µg).

Ex vivo permeation studies showed that the drug is retained in the tissue without reaching the receptor compartment, thereby demonstrating that PGZ-NE could be successfully used to achieve a local effect in the skin without adverse systemic effects. The high amount of PGZ retained inside the skin (478.08 µg/g skin/cm²) indicates that the drug can cross the SC, which is the limiting step in the permeation process from topical formulations. Consequently, it is possible to reach an effective drug concentration in the target area. This can be attributed to the properties of Transcutol-P (polar solvent) and Capryol 90 (non-polar solvents), whose combination in the formulation could result in synergetic skin penetration enhancement due to the fact that Transcutol-P increases drug solubility in the stratum corneum (SC), whereas Capryol 90 favors the diffusion of drug in the SC [30]. Additionally, Pluronic

F127 enhances the diffusion ability of drug thanks to its amphiphilic structure which allows it to act as a surfactant and interact with biological membranes [31,32].

Regarding the therapeutic efficacy, the potential of PGZ-NE was evaluated using a model of oxazolone-induced AD in hairless mice that effectively reproduces the disease in clinical, histological, and immunological aspects. Oxazolone is a hapten that covalently alters skin proteins and triggers allergic responses [33]. Repeated application of oxazolone on mouse skin causes a chronic hypersensitivity reaction with multiple features of human AD including erythema, edema, erosion, and dryness [34]. In this study, these skin lesions were detected macroscopically after nine oxazolone-challenges and became increasingly pronounced in the positive control as oxazolone application advanced. Oxazolone was also applied daily in the group that received PGZ-NE in order to maintain the induced AD during the nine days of treatment with the formulation. This group notably reduced AD-like skin lesions from the second day of treatment, thereby confirming the therapeutic benefits of PGZ-NE.

In healthy skin, the external SC layer comprises a lipid-rich intercellular matrix that contains balanced amounts of ceramides, cholesterol, and free fatty acids in order to reduce TEWL and maintain the skin hydrated [35]. TEWL represents the quantity of water that diffuses through a fixed area of SC to the skin surface per unit time, and SCH is an indicator of skin dryness because it measures the water content of SC [36]. AD is characterized by having a defective or weakened epidermal barrier and lipid abnormalities that promote an increase in TEWL and a decline in SCH. Therefore, the noninvasive assessment of these biophysical parameters is successfully utilized to analyze the skin barrier function in patients with AD [37,38]. In this study, repeated application of oxazolone significantly increased TEWL and reduced SCH, indicating disruption of the epidermal permeability barrier. In the PGZ-NE group, TEWL levels increased 73.11% and SCH decreased 36.01% from the basal state after AD induction (Day 15). However, topical treatment with PGZ-NE halted the progression of the disease which then resulted in substantial improvement of these parameters with both reduced TEWL and increased SCH after two and four topical administrations of PGZ-NE, respectively. In contrast, the positive control exhibited progressive deterioration of these parameters, showing the most critical values of TEWL with an increase of 97.57% compared to the basal state while SCH decreased 40.57% (Figure 4A,B). These results are consistent with previous studies which have reported a 2- to 4-fold increase in TEWL of AD patients compared to the skin of normal controls [39]. These alterations in skin biophysical parameters during AD can be explained by the impairment of the barrier function associated with disturbed lipid composition of the SC, such as reduction in total lipids, phospholipids, ceramides, and sterol esters [40]. Skin inflammation is also characterized by infiltration of inflammatory cells as well as increased skin thickening, which is indicative of edema, increased vascular permeability and epidermal hyperplasia [41]. In this study, the positive control showed markedly greater skin thickness while its histological analysis revealed tissue lesions and presence of inflammatory markers. Conversely, topical administration of PGZ-NE aided in the improvement of these symptoms (Figures 4C and 6).

AFM studies (Figure 5) have demonstrated that oxazolone modifies the skin surface structure by altering the wavy shape it displays in the negative control (healthy skin). The presence of structures that are hundreds of nanometers thick is indicative of alteration of the normal structure of the skin surface. The treatment with PGZ-NE revealed a surface resembling the negative control skin sample with some round structures found on it. Droplets are smaller than these structures, thereby suggesting that they promote a slight increase of the volume of some regions in corneocytes following its absorption into the skin. Moreover, the Young's modulus analysis demonstrates the efficacy of PGZ-NE to revert oxazolone effects on skin, as observed in the decreased rigidity of the sample following treatment.

From the immunological point of view, AD development is characterized by the production of cytokines that greatly affect the pathophysiology of the disease. The critical role of the cytokines TNF- α , IL-6, and IL-17 in the pathophysiology of AD has been previously reported in several studies. Patients with AD show elevated TNF- α levels in the sera and skin, which is released by infiltrating mast cells, Th lymphocytes, and keratinocytes [42]. Other studies have shown TNF- α that is either

alone or in combination with Th2 cytokines influences the alterations of barrier lipid properties observed in AD lesions, including the reduction of free fatty acids [43]. IL-6 is induced by immediate early inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1. It is expressed in the cutaneous response to allergen challenge in atopic patients and has been alternately associated with both allergic and irritant dermatitis [44]. IL-6 participates in the acute-phase response, stimulates the growth and differentiation of T and B lymphocytes, and promotes the production of IL-4, which is involved in the development of allergic immune responses [45]. IL-17 is overexpressed in chronic autoimmune disorders, AD, and asthma. Some studies suggest that IL-17 production is a common signature between AD and psoriasis. This cytokine promotes the differentiation of B cell, modulates the Th2 cellular immune response, favors the development of chronic AD form, and aggravates skin deterioration in AD by inhibiting the production of filaggrin. In our study, mice with oxazolone-induced AD showed greater than a twofold increase in the expression of TNF- α , IL-6, and IL-17 when compared with the negative control. PGZ-NE was able to reduce the production of these pro-inflammatory cytokines to levels similar to those of the negative control (Figure 7). The therapeutic benefits of PGZ-NE in the clinical, histological, and immunological levels of the AD may be due to several aspects of the NE composition, including: (i) the anti-inflammatory activity of PGZ; (ii) the protective effect of the NE droplets which adhere to the skin surface and form a film that avoids water evaporation; and (iii) the skin-repairing property of Pluronic F127, which has been reported to stimulate the proliferation of collagen fibers and the scarring in burned and scarified skin [46–48].

5. Conclusions

This study provides supporting evidence of the therapeutic benefits of PGZ-NE in the treatment of AD. This nanoformulation exhibited improved consistency by the incorporation of Pluronic F127, resulting in a fluid that is aesthetically acceptable, pleasant to the touch, physically stable, and has Newtonian behavior, which allows for easy administration by spray or roll-on. The nanoformulation was able to release the incorporated drug following a hyperbolic kinetic model as well as facilitate the passage of the drug through the stratum corneum while favoring drug retention in the skin without reaching the receptor compartment, thus guaranteeing a local effect without systemic effects as well as providing a prolonged action of the drug in clinical practice. Finally, therapeutic benefits of PGZ-NE on clinical, histological, and immunological aspects of AD were strongly demonstrated in this study with reduction of skin lesions, improvement of the skin barrier function, and decreased infiltration of inflammatory cells as well as in the expression of pro-inflammatory cytokines including TNF- α , IL-6, and IL-17. Together, these results support the notion that PGZ-NE could be used as a promising therapeutic option for the treatment of AD via topical application on affected areas.

Author Contributions: L.C.E. carried out all the experiments, analyzed the data/results, and wrote the paper; R.V.-G. and J.B. realized biochemical studies; M.S.-A. carried out the analytical method and analyzed the data/results; Ò.D. performed the skin evaluation by atomic force microscopy; M.J.R.-L. realized the histological studies; B.C. analyzed the data/results; and A.C.C. conceived and designed all the experiments. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT—Ecuador) (grant number 073-CIBAE-2015).

Acknowledgments: M.S.A. acknowledges the support received from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil, L.C.E. also acknowledges the support of Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador. The authors also acknowledge Jonathan Proctor (M.Ed) for his review of the use of the English language.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Misery, L.; Huet, F.; Gouin, O.; Stander, S.; Deleuran, M. Current pharmaceutical developments in atopic dermatitis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2019**, *46*, 7–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Archer, C.B. Atopic dermatitis. *Medicine* **2017**, *45*, 379–382. [[CrossRef](#)]
3. Brunner, P.M. Early immunologic changes during the onset of atopic dermatitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2019**, *123*, 152–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Silverberg, J.I. Comorbidities and the impact of atopic dermatitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2019**, *123*, 144–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Serra-Baldrich, E.; De Frutos, J.O.; Jauregui, I.; Armario-Hita, J.C.; Silvestre, J.F.; Herraes, L.; Martin-Santiago, A.; Valero, A.; Sastre, J. Changing perspectives in atopic dermatitis. *Allergol. Immunopathol.* **2018**, *46*, 397–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Czarnowicki, T.; He, H.; Krueger, J.G.; Guttman-Yassky, E. Atopic dermatitis endotypes and implications for targeted therapeutics. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *143*, 1–11. [[CrossRef](#)]
7. Schakel, K.; Dobel, T.; Bosselmann, I. Future treatment options for atopic dermatitis—small molecules and beyond. *J. Dermatol. Sci.* **2014**, *73*, 91–100. [[CrossRef](#)]
8. Boguniewicz, M.; Alexis, A.F.; Beck, L.A.; Block, J.; Eichenfield, L.F.; Fonacier, L.; Guttman-Yassky, E.; Paller, A.S.; Pariser, D.; Silverberg, J.I.; et al. Expert perspectives on management of moderate-to-severe atopic dermatitis: A multidisciplinary consensus addressing current and emerging therapies. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2017**, *5*, 1519–1531. [[CrossRef](#)]
9. Akhtar, N.; Verma, A.; Pathak, K. Exploring preclinical and clinical effectiveness of nanoformulations in the treatment of atopic dermatitis: Safety aspects and patent reviews. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* **2017**, *55*, 1–10. [[CrossRef](#)]
10. Try, C.; Moulari, B.; Beduneau, A.; Fantini, O.; Pin, D.; Pellequer, Y.; Lamprecht, A. Size dependent skin penetration of nanoparticles in murine and porcine dermatitis models. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *100*, 101–108. [[CrossRef](#)]
11. Luesakul, U.; Puthong, S.; Sansanaphongpricha, K.; Muangsin, N. Quaternized chitosan-coated nanoemulsions: A novel platform for improving the stability, anti-inflammatory, anti-cancer and transdermal properties of plai extract. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *230*, 115625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Matougui, N.; Boge, L.; Groo, A.C.; Umerska, A.; Ringstad, L.; Bysell, H.; Saulnier, P. Lipid-based nanoformulations for peptide delivery. *Int. J. Pharm.* **2016**, *502*, 80–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kaur, A.; Katiyar, S.S.; Kushwah, V.; Jain, S. Nanoemulsion loaded gel for topical co-delivery of clobetasol propionate and calcipotriol in psoriasis. *Nanomedicine* **2017**, *13*, 1473–1482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mou, D.; Chen, H.; Du, D.; Mao, C.; Wan, J.; Xu, H.; Yang, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* **2008**, *353*, 270–276. [[CrossRef](#)]
15. Soliman, K.A.; Ullah, K.; Shah, A.; Jones, D.S.; Singh, T.R.R. Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 1575–1586. [[CrossRef](#)]
16. Martin-Villena, M.J.; Fernandez-Campos, F.; Calpena-Campmany, A.C.; Bozal-De Febrer, N.; Ruiz-Martinez, M.A.; Clares-Naveros, B. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94*, 1–11. [[CrossRef](#)]
17. Furue, K.; Mitoma, C.; Tsuji, G.; Furue, M. Protective role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists in skin barrier and inflammation. *Immunobiology* **2018**, *223*, 327–330. [[CrossRef](#)]
18. Derosa, G.; Sahebkar, A.; Maffioli, P. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 153–161. [[CrossRef](#)]
19. Kothari, V.; Galdo, J.A.; Mathews, S.T. Hypoglycemic agents and potential anti-inflammatory activity. *J. Inflamm. Res.* **2016**, *9*, 27–38.
20. Klotz, L.; Burgdorf, S.; Dani, I.; Saijo, K.; Flossdorf, J.; Hucke, S.; Alferink, J.; Nowak, N.; Beyer, M.; Mayer, G.; et al. The nuclear receptor ppar gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a t cell-intrinsic fashion and suppresses cns autoimmunity. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 2079–2089. [[CrossRef](#)]
21. Espinoza, L.C.; Silva-Abreu, M.; Calpena, A.C.; Rodriguez-Lagunas, M.J.; Fabrega, M.J.; Garduno-Ramirez, M.L.; Clares, B. Nanoemulsion strategy of pioglitazone for the treatment of skin inflammatory diseases. *Nanomedicine* **2019**, *19*, 115–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Campana-Seoane, M.; Peleteiro, A.; Laguna, R.; Otero-Espinar, F.J. Bioadhesive emulsions for control release of progesterone resistant to vaginal fluids clearance. *Int. J. Pharm.* **2014**, *477*, 495–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Rodriguez-Lagunas, M.J.; Fabrega, M.J.; Espina, M.; Garcia, M.L.; Calpena, A.C. Human skin permeation studies with ppargamma agonist to improve its permeability and efficacy in inflammatory processes. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Khan, K.; Rhodes, C. Effect compaction pressure on the dissolution efficiency of some direct compression systems. *Pharm. Acta Helv.* **1972**, *47*, 594–607. [[PubMed](#)]
25. Chen, S.; Bhushan, B. Nanomechanical and nanotribological characterization of two synthetic skins with and without skin cream treatment using atomic force microscopy. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *398*, 247–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sullivan, D.W., Jr.; Gad, S.C.; Julien, M. A review of the nonclinical safety of transcutol (R), a highly purified form of diethylene glycol monoethyl ether (degee) used as a pharmaceutical excipient. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *72*, 40–50. [[CrossRef](#)]
27. Al Khateb, K.; Ozhmukhametova, E.K.; Mussin, M.N.; Seilkhanov, S.K.; Rakhypbekov, T.K.; Lau, W.M.; Khutoryanskiy, V.V. In situ gelling systems based on pluronic F127/pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2016**, *502*, 70–79. [[CrossRef](#)]
28. Welin-Berger, K.; Neelissen, J.; Bergenstahl, B. In vitro permeation profile of a local anaesthetic compound from topical formulations with different rheological behaviour—verified by in vivo efficacy data. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *14*, 229–236. [[CrossRef](#)]
29. Sengupta, P.; Chatterjee, B. Potential and future scope of nanoemulgel formulation for topical delivery of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* **2017**, *526*, 353–365. [[CrossRef](#)]
30. Osborne, D.W.; Musakhanian, J. Skin penetration and permeation properties of transcutol (R)-neat or diluted mixtures. *Aaps Pharmscitech* **2018**, *19*, 3512–3533. [[CrossRef](#)]
31. Giuliano, E.; Paolino, D.; Fresta, M.; Cosco, D. Mucosal applications of poloxamer 407-based hydrogels: An overview. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Espinoza, L.C.; Silva-Abreu, M.; Clares, B.; Rodriguez-Lagunas, M.J.; Halbaut, L.; Canas, M.A.; Calpena, A.C. Formulation strategies to improve nose-to-brain delivery of donepezil. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Moner, V.; Fernandez, E.; Calpena, A.C.; Garcia-Herrera, A.; Cocera, M.; Lopez, O. A lamellar body mimetic system for the treatment of oxazolone-induced atopic dermatitis in hairless mice. *J. Dermatol. Sci.* **2018**, *90*, 172–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yeom, M.; Kim, S.H.; Lee, B.; Han, J.J.; Chung, G.H.; Choi, H.D.; Lee, H.; Hahm, D.H. Oral administration of glucosylceramide ameliorates inflammatory dry-skin condition in chronic oxazolone-induced irritant contact dermatitis in the mouse ear. *J. Dermatol. Sci.* **2012**, *67*, 101–110. [[CrossRef](#)]
35. Milam, E.C.; Jacob, S.E.; Cohen, D.E. Contact dermatitis in the patient with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2019**, *7*, 18–26. [[CrossRef](#)]
36. Lee, J.H.; Choi, C.S.; Bae, I.H.; Choi, J.K.; Park, Y.H.; Park, M. A novel, topical, nonsteroidal, trpv1 antagonist, pac-14028 cream improves skin barrier function and exerts anti-inflammatory action through modulating epidermal differentiation markers and suppressing th2 cytokines in atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* **2018**, *91*, 184–194. [[CrossRef](#)]
37. Bhattacharya, N.; Sato, W.J.; Kelly, A.; Ganguli-Indra, G.; Indra, A.K. Epidermal lipids: Key mediators of atopic dermatitis pathogenesis. *Trends Mol. Med.* **2019**, *25*, 551–562. [[CrossRef](#)]
38. Kelleher, M.; Dunn-Galvin, A.; Hourihane, J.O.; Murray, D.; Campbell, L.E.; Mclean, W.H.; Irvine, A.D. Skin barrier dysfunction measured by transepidermal water loss at 2 days and 2 months predates and predicts atopic dermatitis At 1 year. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *135*, 930–935. [[CrossRef](#)]
39. Jensen, J.M.; Folster-Holst, R.; Baranowsky, A.; Schunck, M.; Winoto-Morbach, S.; Neumann, C.; Schutze, S.; Proksch, E. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *122*, 1423–1431. [[CrossRef](#)]
40. Proksch, E.; Folster-Holst, R.; Jensen, J.M. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J. Dermatol. Sci.* **2006**, *43*, 159–169. [[CrossRef](#)]
41. De Vry, C.G.; Valdez, M.; Lazarov, M.; Muhr, E.; Buelow, R.; Fong, T.; Iyer, S. Topical application of a novel immunomodulatory peptide, Rdp58, reduces skin inflammation in the phorbol ester-induced dermatitis model. *J. Invest. Dermatol.* **2005**, *125*, 473–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Mizuno, K.; Morizane, S.; Takiguchi, T.; Iwatsuki, K. Dexamethasone but not tacrolimus suppresses tnf-alpha-induced thymic stromal lymphopoietin expression in lesional keratinocytes of atopic dermatitis model. *J. Dermatol. Sci.* **2015**, *80*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Danso, M.O.; Van Drongelen, V.; Mulder, A.; Van Esch, J.; Scott, H.; Van Smeden, J.; El Ghalbzouri, A.; Bouwstra, J.A. Tnf-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134*, 1941–1950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lee, E.G.; Mickle-Kawar, B.M.; Gallucci, R.M. Il-6 deficiency exacerbates skin inflammation in a murine model of irritant dermatitis. *J. Immunotoxicol.* **2013**, *10*, 192–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Navarini, A.A.; French, L.E.; Hofbauer, G.F. Interrupting Il-6-receptor signaling improves atopic dermatitis but associates with bacterial superinfection. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *128*, 1128–1130. [[CrossRef](#)]
46. Bernardi, D.S.; Pereira, T.A.; Maciel, N.R.; Bortoloto, J.; Viera, G.S.; Oliveira, G.C.; Rocha-Filho, P.A. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: In vitro and in vivo assessments. *J. Nanobiotechnol.* **2011**, *9*, 44. [[CrossRef](#)]
47. Kant, V.; Gopal, A.; Kumar, D.; Gopalkrishnan, A.; Pathak, N.N.; Kurade, N.P.; Tandan, S.K.; Kumar, D. Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta Histochem.* **2014**, *116*, 5–13. [[CrossRef](#)]
48. Sosa, L.; Calpena, A.C.; Silva-Abreu, M.; Espinoza, L.C.; Rincon, M.; Bozal, N.; Domenech, O.; Rodriguez-Lagunas, M.J.; Clares, B. Thermoreversible gel-loaded amphotericin B for the treatment of dermal and vaginal candidiasis. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 312. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1. MEs y NEs para el tratamiento del Alzheimer

Actualmente, no existe una cura capaz de reducir la progresión de la EA, en consecuencia, los tratamientos disponibles comercialmente se centran en controlar los síntomas a través de diferentes mecanismos que ayudan a mejorar la función cognitiva. Uno de los medicamentos más recetados es el DPZ, gracias a su eficacia significativa en la reducción de la gravedad de los síntomas neuropsiquiátricos [34]. Su mecanismo de acción consiste en reducir la deficiencia colinérgica en el sistema nervioso central, basándose en la hipótesis colinérgica de la etiología de la enfermedad [194]. La forma farmacéutica actualmente comercializada de este fármaco (comprimidos orales) genera notables inconvenientes, especialmente entre pacientes geriátricos o en estados avanzados de la enfermedad, quienes a menudo tienen dificultad para tragar formas farmacéuticas sólidas [32, 195]. A esto, se suma el metabolismo de primer paso, los efectos adversos en el sistema gastrointestinal y la baja biodisponibilidad en el cerebro debido a la poca capacidad de los medicamentos para penetrar la BHE [45]. La conexión entre la cavidad nasal y el cerebro brinda la posibilidad de evitar la BHE y llegar directamente al SNC [68]. Sin embargo, para lograr el éxito del tratamiento utilizando la ruta nasal, es necesario incorporar estrategias de formulación para mejorar la solubilidad y la permeabilidad de los fármacos, así como, la extensión del tiempo de residencia de la formulación en el sitio de aplicación [45, 196, 197]. Se ha propuesto el uso de MEs y NEs como sistemas prometedores para el suministro intranasal debido a su tamaño de gota reducido, alta permeabilidad y potencial de solubilización de fármacos [14]. Adicionalmente, a estos sistemas podrían incorporarse diferentes polímeros, agentes mucoadhesivos y mucopenetrantes para aumentar la viscosidad, el tiempo de residencia en el sitio de absorción y mejorar la penetración del fármaco a través de la mucosa nasal, con el objetivo de aumentar la biodisponibilidad del fármaco [55, 75]. Teniendo en cuenta estos hallazgos, en el presente trabajo doctoral se desarrollaron tres formulaciones de DPZ: DPZ-ME, DPZ-NE y DPZ-PNE como alternativas para mejorar el suministro del fármaco en el cerebro utilizando la vía nasal.

4.2. NEs para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.

En los últimos años, los estudios sobre el potencial terapéutico de PGZ han ido mucho más allá de su uso principal como fármaco antidiabético. El efecto antiinflamatorio de este medicamento lo ha convertido en un candidato prometedor para el tratamiento de trastornos dermatológicos mediante aplicación tópica [159]. Sin embargo, su baja solubilidad acuosa y la limitada permeabilidad del estrato córneo a sustancias externas podrían dificultar su penetración a través de la piel. La incorporación de PGZ en nanotransportadores coloidales podría mejorar la biodisponibilidad dérmica del medicamento para lograr una mayor eficacia terapéutica [198]. Las NEs se caracterizan por su alto potencial de solubilización para fármacos lipofílicos e hidrofílicos, así como por su efecto promotor de la permeación de fármacos a través del estrato córneo debido a su composición de aceite y tensioactivos [199]. Por lo tanto, el desarrollo de estos sistemas puede usarse como estrategia para la administración de fármacos, especialmente en dermatología [200]. En base a estos antecedentes, se desarrollaron dos formulaciones PGZ-NE y PGZ-NE₂ como estrategias para tratar enfermedades inflamatorias de la piel mediante su aplicación tópica sobre el área afectada.

4.3. Diseño y caracterización fisicoquímica de las MEs y NEs

Las MEs y NEs desarrolladas en este trabajo se prepararon utilizando los excipientes farmacéuticos que exhibieron el mayor potencial de solubilización del fármaco en cada uno de los estudios (Artículo 1 – Tabla 1, Artículo 2 – Fig. 1, Artículo 3 – material suplementario 2), a partir de los cuales se construyeron los diagramas de fase pseudoternarios, registrando las combinaciones monofásicas y transparentes dentro del área de emulsificación y las combinaciones turbias y no monofásicas en la otra región del diagrama [201]. Durante el desarrollo de MEs y NEs, la evaluación de la solubilidad del fármaco en diversos aceites, tensioactivos y co-tensioactivos es un paso crítico para obtener un vehículo eficaz capaz de permitir una alta carga de fármacos, así como proporcionar estabilidad química y física a la formulación [200]. La capacidad para solubilizar el fármaco por parte de la fase oleosa es crítica para

disminuir la proporción de aceite utilizado y, en consecuencia, reducir la cantidad de tensioactivo. Además, en cuanto a los sistemas de administración intranasal de medicamentos, éstos requieren un volumen de administración mínimo, por lo tanto, los componentes de la formulación deben exhibir un alto potencial de solubilización para el fármaco [77].

Para la formulación de DPZ-ME y PGZ-NE, se construyeron los diagramas de fase pseudoternarios utilizando aceite de ricino como fase oleosa, Labrasol como tensioactivo, una mezcla de Transcutol-P y propilenglicol como co-tensioactivos y agua purificada como fase acuosa. Para DPZ-ME se analizaron las proporciones 1:1, 2:1 y 3:1 entre Labrasol y Transcutol-P, a la vez que la proporción entre Transcutol-P y propilenglicol se mantuvo en 1:0.6 en cada caso, mientras que para PGZ-NE se evaluaron las proporciones 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1 entre Labrasol y Transcutol-P, manteniendo en cada caso una proporción de 1:0.5 entre el Transcutol-P y propilenglicol. La máxima área de emulsificación fue obtenida con el S_{mix} Labrasol/Transcutol-P 3:1 para DPZ-ME y 6:1 para PGZ-NE y, en consecuencia, fueron seleccionados como S_{mix} óptimo para la incorporación del fármaco (Artículo 1 – Fig. 3 y Artículo 3 – Fig. 1). Para obtener DPZ-NE y PGZ-NE₂ se construyeron los diagramas de fase pseudoternarios utilizando Capryol 90 como fase oleosa, Labrasol como tensioactivo, Transcutol-P como co-tensioactivo y agua purificada como fase acuosa. De las proporciones de Labrasol/Transcutol-P (1:1, 2:1, 3:1, 1:2) ensayadas, se seleccionó el S_{mix} 1:1 para la incorporación de DPZ y 1:2 para la incorporación de PGZ (Artículo 2 – Fig. 2 y Artículo 4 – Fig. 1).

DPZ-ME (12.5 mg/mL) fue obtenida espontáneamente mezclando 5% de aceite de ricino 52.2% de Labrasol, 17.4% de Transcutol-P, 10.4% de propilenglicol y 15% de agua. Por otro lado, todas las nanoemulsiones se prepararon a través del método de titulación de fase bajo agitación, que corresponde a un proceso de baja energía mediante inversión de fases por variaciones de composición [202]. DPZ-NE (6.25 mg/mL) se preparó utilizando 6% de Capryol 90, 20% de Labrasol, 20% de Transcutol-P y 54% de agua. A partir de esta formulación y con el objetivo de superar el rápido aclaramiento mucociliar del fármaco, así como aumentar su

capacidad de penetración a través de la mucosa, se desarrolló DPZ-PNE (6.25 mg/mL) incorporando 24% de Pluronic F-127 en la fase acuosa de la nanoemulsión. PGZ-NE (1 mg/mL) fue formulada utilizando 6% de aceite de ricino, 59.2% de Labrasol, 9.87% de Transcutol-P, 4.93% de propilenglicol y 20% de agua. Finalmente, PGZ-NE₂ fue preparada usando 8% de Capryol 90, 19% de Labrasol, 38% de Transcutol-P, 18% de Pluronic-F127 y 17% de agua. Los excipientes presentes en las formulaciones desarrolladas corresponden a componentes farmacéuticamente aceptables para su utilización en sistemas de administración intranasal y dérmico. El Labrasol es un tensioactivo no iónico con un valor de HLB de 14 que promueve la formación de sistemas o/w, actúa como vehículo para fármacos poco solubles en agua y se utiliza con frecuencia en sistemas de administración dérmica por su alta compatibilidad con la piel [203]. El uso de co-tensioactivos permitió lograr la reducción de la tensión interfacial necesaria para obtener formulaciones en un rango extendido de composición [204]. Transcutol-P es un co-tensioactivo caracterizado por sus propiedades no tóxicas y su alta biocompatibilidad, el cual aumenta la solubilidad tanto de fármacos lipofílicos como hidrofílicos y promueve la formación de MEs y NEs transparentes y estables [205-207]. Tanto Labrasol, Transcutol-P y el propilenglicol se han sugerido como excipientes que mejoran la permeación del fármaco en los sistemas de administración intranasal y dérmica [32, 208-210]. Pluronic-F127 fue usado como viscosante con el objetivo de facilitar la administración de la formulación y aumentar su tiempo de residencia en el sitio de la aplicación. Este excipiente corresponde a un copolímero tribloque no iónico que consiste en un centro hidrofóbico de bloques de polipropilenglicol rodeado por dos bloques hidrófilos de polietilenglicol. Se caracteriza por su naturaleza anfifílica, alta capacidad de solubilización, propiedades no tóxicas y su capacidad de interactuar con superficies hidrofóbicas y membranas biológicas [211, 212].

Las cinco formulaciones mostraron un aspecto transparente, homogéneo y monofásico. DPZ-ME, DPZ-NE y DPZ-PNE exhibieron un pH de 6.38, 5.82 y 6.14, respectivamente. Estos valores son adecuados para la administración nasal que requiere un pH en el rango de 5.0 – 6.5, sugiriéndose que las formulaciones obtenidas no causarían irritación a nivel de la cavidad nasal [75]. De igual manera, PGZ-NE y

PGZ-NE₂ mostraron valores de pH de 5.42 y 5.23, respectivamente. Estos valores de pH ligeramente ácidos, son biocompatibles con la acidez natural de la piel y, por lo tanto, asegura efectos no irritantes [213].

El tamaño medio de gota fue de 58.9±3.2 nm con un valor de IP de 0.19±0.04 para DPZ-ME, 128.50±1.03 nm con un IP de 0.12±0.01 para DPZ-NE, 182±11.36 nm con un IP de 0.352±0.04 para PGZ-NE y 158.30±4.67 nm con un IP de 0.28±0.06 para PGZ-NE₂. El valor de IP obtenido en todas las formulaciones fue inferior a 0.5, lo que indica homogeneidad en el tamaño de las gotas. Estos resultados fueron contrastados con las microfotografías TEM, las cuales confirmaron el tamaño nanométrico, la forma esférica y la distribución uniforme de las gotas de la fase interna en las formulaciones desarrolladas (Artículo 1- Fig. 5, Artículo 2 – Fig. 3, Artículo 3 – Fig. 2 y Artículo 4 – Fig. 2A). Estas características proporcionan transparencia óptica, una gran área de superficie y una distribución uniforme en el sitio de aplicación.

Tanto las formulaciones de administración nasal como dérmicas deben tener características organolépticas óptimas con una consistencia adecuada para proporcionar un vehículo estéticamente atractivo para el paciente que sea agradable y fácil de usar [213]. La viscosidad desempeña un papel vital en las formulaciones de administración nasal porque influye en el tiempo de residencia del fármaco en el lugar de aplicación [214]. Una viscosidad alta de la fórmula evita la pérdida del producto en el vestíbulo nasal o la nasofaringe, pero si ésta es demasiado alta estimulará el aclaramiento mucociliar, mientras que una viscosidad baja ayudará a una mayor liberación y difusión del fármaco, haciéndose notoria la necesidad de obtener viscosidades óptimas del vehículo [179, 215]. DPZ-ME, DPZ-NE y PGZ-NE mostraron viscosidades relativamente bajas con valores de 44.69±0.063 mPa·s, 10.69±0.04 mPa·s y 51.08±0.01 mPa·s, respectivamente. La presencia de Pluronic-F127 en DPZ-PNE y PGZ-NE₂ ayudó a aumentar significativamente la viscosidad del sistema, mostrando valores de 315.40±0.22 mPa·s y 90.75±0.003 mPa·s, respectivamente. Este hecho favorece la retención de la formulación tanto en la cavidad nasal como en el área de piel tratada [216]. La reología determina las

propiedades sensoriales, el comportamiento de llenado/dosificación, la capacidad de difusión y modula parámetros biofarmacéuticos, incluidas las tasas de liberación del fármaco [213]. El análisis reológico apoyado por el modelamiento matemático confirmó el comportamiento de flujo de tipo newtoniano de DPZ-ME, DPZ-NE, PGZ-NE y PGZ-NE₂. En los fluidos newtonianos el esfuerzo de cizalla es directamente proporcional a la velocidad de deformación, mientras que la viscosidad permanece constante al aumentar la velocidad de deformación (Artículo 1 – Fig. 4, Artículo 2 – Fig. 4A, Artículo 3 – Fig. 3 y Artículo 4 – Fig. 2B). El comportamiento newtoniano de estas formulaciones las hace ideales para su aplicación en forma de aerosol o roll-on [217]. Para DPZ-PNE, se observó que el modelo de Ostwald-de Waele proporcionó la mejor coincidencia estadística de los datos experimentales, lo que indica un comportamiento de adelgazamiento por corte (pseudoplástico) ya que la viscosidad tiende a disminuir a medida que aumenta la velocidad de deformación, comportamiento atribuido a la incorporación del polímero en la formulación (Artículo 2 – Fig. 4B).

Del estudio de mucoadhesión *ex vivo* realizado usando mucosa nasal, se observó que DPZ-PNE exhibió el valor de mucoadhesión más alto ($82.43 \pm 1.72\%$) en comparación con DPZ-NE ($71.31 \pm 1.53\%$), debido a la presencia del Pluronic F-127. Este polímero se caracteriza por su naturaleza anfifílica, propiedad que le permitiría interactuar con la superficie de la mucosa nasal e interpenetrarse en las cadenas de mucina y, en consecuencia, aumentar tanto el tiempo de residencia del fármaco en la cavidad nasal como la penetración del fármaco a través de la mucosa. Aunque el efecto bioadhesivo del Pluronic F-127 se discute debido a su rápida disolución en medios acuosos, la interacción de este polímero con los solventes de la formulación podría favorecer los rasgos adhesivos del sistema, mientras sus propiedades tensioactivas facilitan la difusión a través de la mucosa para alcanzar los epitelios simultáneamente [212, 218, 219].

Los estudios de estabilidad física de las cinco formulaciones no detectaron signos de desestabilización, como cremado, sedimentación, floculación o coalescencia (Artículo 1 – Fig. 6, Artículo 2 – Fig. 5 y Artículo 3 – Fig. 4). La alta

estabilidad que ofrecen estos nanosistemas es atribuida a la contribución estérica de los tensioactivos no iónicos que evitan el crecimiento de las gotas y la coalescencia. El pequeño tamaño de gota también aporta a la estabilidad del sistema, ya que el tamaño reducido genera solo fuerzas gravitacionales mínimas y, en consecuencia, el movimiento browniano del nanosistema es mayor que la velocidad de sedimentación producida por las fuerzas gravitacionales [220].

4.4. Caracterización biofarmacéutica

La capacidad de las formulaciones para liberar el fármaco incorporado en el sistema se evaluó mediante un estudio de liberación *in vitro* utilizando una membrana artificial como paso limitante. El perfil cinético de liberación del fármaco estimado por modelos matemáticos proporciona información crucial para evaluar el comportamiento de la formulación y el efecto de los excipientes sobre la liberación del fármaco [210, 217]. En consecuencia, constituye una herramienta útil que acelera el desarrollo del producto y se utiliza en estudios de control de calidad [221]. El perfil de liberación de las cinco formulaciones fue descrito por el modelo cinético de hipérbola, que corresponde a uno de los modelos cinéticos típicos para este tipo de sistemas nanoestructurados. De acuerdo con este perfil, existe una fase inicial de liberación rápida seguido de una liberación sostenida del fármaco durante un segundo período más largo (Artículo 1 – Figura 7, Artículo 2 – Fig. 6, Artículo 3 – Fig. 5A y Artículo 4 – Fig. 3). Estos resultados demostraron que los vehículos son capaces de liberar el fármaco incorporado y, por lo tanto, la formulación no limitaría su permeación [213].

Con el objetivo de estudiar la capacidad intrínseca de DPZ para cruzar la mucosa nasal, se realizó un estudio de permeación *ex vivo* durante 6 horas utilizando mucosa nasal porcina para simular la barrera real y predecir el comportamiento *in vivo* de las formulaciones. Al final del ensayo se realizó adicionalmente la extracción del fármaco retenido en el tejido (Q_{ret}). El perfil de permeación *ex vivo* para DPZ-ME mostró que la cantidad máxima de fármaco permeado a través de la mucosa nasal fue de aproximadamente 2000 μg y la cantidad retenida en la mucosa fue de 812.9 μg por

gramo de tejido (Artículo 1 – Fig. 8). El estudio comparativo entre DPZ-NE y DPZ-PNE muestra que la cantidad de fármaco permeado a través de la mucosa nasal fue significativamente mayor para DPZ-PNE (532.30 μg) en comparación con DPZ-NE (199.56 μg) (Artículo 2 – Fig. 7). Del mismo modo, DPZ-PNE presentó una tasa de flujo (J_{ss}) y un coeficiente de permeación (K_p) más del doble que los obtenidos para DPZ-NE. Dado que el aclaramiento plasmático es un parámetro constante, cuando se comparan dos formulaciones en la misma superficie de contacto, la que facilita la permeación al tener valores más altos de K_p y flujo de entrada presentará valores altos de C_{ss} , en consecuencia, DPZ-PNE mostró un valor de C_{ss} 2.11 veces mayor que DPZ-NE, confirmando que el K_p y el flujo son parámetros proporcionales a C_{ss} (Artículo 2 – Tabla 3). Este parámetro estima la concentración de fármaco que podría alcanzarse en la sangre en estado de equilibrio estacionario. Estudios anteriores en pacientes sanos reportaron una concentración plasmática máxima de 33.26 ± 6.58 ng/mL para la administración oral de 10 mg de DPZ, mientras que en este trabajo DPZ-NE y DPZ-PNE mostraron valores de 2.7 y 5.7 veces mayores, respectivamente [222]. Con respecto a Q_{ret} , se observó una gran cantidad de fármaco retenido en la mucosa nasal usando DPZ-PNE (295.50 μg fármaco/g tejido/ cm^2) frente al encontrado para DPZ-NE (192.65 μg de fármaco/g tejido/ cm^2). Estos resultados sugieren que la mucosa podría actuar como un reservorio, lo que permite la liberación sostenida del fármaco al cerebro. El alto potencial de permeabilidad de DPZ a partir de las tres formulaciones se puede atribuir a la presencia de Labrasol y Transcutol-P, debido a su capacidad de solubilización y sus propiedades como promotores de la penetración [206, 223]. La presencia de Pluronic F-127 en DPZ-PNE podría proporcionar ventajas adicionales, posiblemente debido a su estructura química y naturaleza anfifílica que lo convierte en un tensioactivo útil que mejora la capacidad de difusión del fármaco a través de la mucosa [224-226]. Por lo tanto, la incorporación de Pluronic F-127 podría usarse como estrategia de formulación, gracias a la combinación de propiedades que mejoran la bioadhesión y penetración del fármaco, de tal modo que, aumenta la permanencia y retención del fármaco en la mucosa nasal al tiempo que facilita su difusión para lograr un suministro de concentraciones sostenidas de fármaco en el cerebro [227]. Es importante mencionar que estudios *in vivo* son requeridos para corroborar estos hallazgos con el objetivo de evaluar la conveniencia de estas

formulaciones como estrategias terapéuticas para aumentar la eficacia o reducir la dosis o los intervalos de administración, disminuyendo así los efectos adversos de los tratamientos convencionales [50].

Por otro lado, se realizó el estudio de permeación *ex vivo* con PGZ-NE y PGZ-NE₂, usando piel humana obtenida de una mujer sana durante una lipectomía abdominal previo consentimiento informado en conformidad con el Comité de Ética del Hospital de Barcelona. Uno de los principales retos de los fármacos administrados tópicamente sobre la piel consiste en lograr atravesar el estrato córneo para llegar a las capas más internas de la epidermis y la dermis [199]. El perfil de permeación *ex vivo* de PGZ-NE mostró que la cantidad de fármaco permeado a través de la piel después de 12.5 horas de ensayo fue de 250 μg (Artículo 3 – Fig. 5B). Adicionalmente, la evaluación biofarmacéutica de los parámetros de permeación y predicción revelaron un J_{ss} de $39.7\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, K_p de $0.039\text{ cm}/\text{h}$, así como un predominio del coeficiente de partición vehículo/tejido ($P_1=0.63\text{ cm}$) debido a la alta solubilidad de PGZ en la formulación. El lag time (T_L) de 2.6 h obtenido significa que, durante ese período de tiempo, el fármaco se distribuye en la piel para luego transportarse al torrente sanguíneo en forma de equilibrio. Este alto valor de T_L favorece el logro del efecto local y minimiza las reacciones adversas. El resultado de C_{ss} ($0.089\mu\text{g}/\text{mL}$) sugiere que se podría evitar el efecto antidiabético de PGZ, ya que este efecto se alcanza a una concentración de $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ asegurando únicamente la actividad antiinflamatoria del fármaco [228]. Por su parte, la formulación PGZ-NE₂ exhibió un comportamiento diferente a PGZ-NE, ya que se observó que el fármaco se retiene en el tejido sin alcanzar el compartimento del receptor, sugiriéndose que podría ser utilizada exitosamente para lograr un efecto local en la piel sin efectos sistémicos adversos. El análisis de Q_{ret} para PGZ-NE ($4.07\text{ mg}/\text{g piel}/\text{cm}^2$) y PGZ-NE₂ ($478.08\mu\text{g}/\text{g piel}/\text{cm}^2$) indicó que PGZ es capaz de atravesar el estrato córneo que constituye el paso limitante en el proceso de permeación en las formulaciones tópicas para lograr alcanzar una concentración efectiva del fármaco en el sitio de acción. En este sentido, el alto valor de Q_{ret} sugiere que las formulaciones desarrolladas favorecen la retención del fármaco en la piel, lo que podría extender la duración de la acción del fármaco y, en efecto, podría reducir la frecuencia de dosificación en la práctica

clínica. Los resultados obtenidos en el estudio de permeación *ex vivo* puede atribuirse a la presencia de excipientes como el Labrasol y Transcutol-P, cuyas propiedades como solubilizantes y promotores de la permeación han sido previamente reportadas [223]. La combinación entre Transcutol-P, solvente polar que aumenta la solubilidad del fármaco y Capryol 90, solvente no polar que favorece su difusión en el estrato córneo produce un efecto sinérgico en la penetración del fármaco a través de la piel [229]. Adicionalmente, Pluronic F127 mejora la capacidad de difusión del fármaco gracias a su estructura anfifílica que le permite actuar como tensioactivo e interactuar con las membranas biológicas [68, 230].

4.5. Estudios de tolerancia

La tolerabilidad de DPZ-NE y DPZ-PNE se evaluó mediante modelos *in vitro* e *in vivo*. La línea de células nasales humanas RPMI 2650 ha sido utilizado como modelo para representar la mucosa nasal real con el objetivo de evaluar la citotoxicidad de las fórmulas nasales desarrolladas [231, 232]. Este ensayo demostró que DPZ-NE y DPZ-PNE no presentan citotoxicidad aparente en cuatro y tres de las diluciones ensayadas, respectivamente (Artículo 2 – Fig. 8). Estos resultados fueron confirmados a través de un ensayo *in vivo* usando cerdos para la administración intranasal de la formulación y contrastando el resultado con los respectivos controles positivo y negativo. El análisis histopatológico de la mucosa nasal porcina mostró que el tratamiento intranasal con DPZ-NE y DPZ-PNE no produce alteración significativa en la estructura de la mucosa ni infiltración de células inflamatorias, ya que se pudo observar un patrón similar al control negativo (Artículo 2 – Fig. 9).

Para confirmar la tolerancia de PGZ-NE, se analizó el efecto que produce la aplicación tópica de la formulación en las propiedades biomecánicas de la piel de 12 voluntarios. La evaluación del TEWL es un método no invasivo que determina la pérdida de agua a través del estrato córneo y se utiliza como una herramienta útil en dermatología para evaluar la integridad de la barrera cutánea o detectar irritación de la piel o alteraciones de su funcionalidad en etapas tempranas antes de que sean visibles [233, 234]. La hidratación del estrato córneo (SCH) determina la apariencia

y el correcto funcionamiento de la piel, gracias al rol del agua como plastificante clave que confiere flexibilidad al estrato córneo [235]. Cuando la piel se daña por la exposición a agentes físicos o químicos, el TEWL aumenta y el SCH disminuye y estas variaciones hacen que el estrato córneo se vuelva duro y quebradizo [236]. La aplicación tópica de PGZ-NE causó una reducción significativa de TEWL y un aumento de SCH con respecto al estado basal, sugiriendo un mejoramiento en el nivel de hidratación de estrato córneo por parte de la formulación, así como una alta biocompatibilidad e idoneidad para el uso humano ya que no se detectaron señales de desestabilización ni daño en la superficie de la piel de los voluntarios [237] (Artículo 3 – Fig. 9).

4.6. Estudios de eficacia

Con respecto a la eficacia farmacológica, se evaluó el potencial antiinflamatorio de PGZ-NE y PGZ-NE₂ usando diferentes modelos de ratón. PGZ-NE fue probado en dos ensayos de inflamación aguda utilizando en el primero 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) y en el segundo ácido araquidónico (AA) como inductores de edema en oreja de ratón. La hinchazón y el engrosamiento de la piel indica una variedad de eventos que ocurren durante el proceso inflamatorio, incluido el edema, el aumento de la permeabilidad vascular y la proliferación de queratinocitos epidérmicos [238]. La aplicación tópica de TPA en las orejas de los ratones desencadenó un evidente proceso inflamatorio provocando eritema, vasodilatación, así como aumento del grosor y del peso de las orejas. El tratamiento con PGZ-NE redujo el enrojecimiento e inhibió notablemente el efecto inflamatorio causado por el TPA en aproximadamente 44% (Artículo 3 – Fig. 8). De forma similar al TPA, la aplicación tópica de AA en las orejas de los ratones causó inmediatamente vasodilatación, eritema y edema. El proceso inflamatorio inducido por AA fue contrarrestado por el tratamiento con PGZ-NE tanto a nivel histopatológico como bioquímico. A nivel histopatológico, la aplicación tópica de AA produjo engrosamiento de epidermis y dermis con pérdida del estrato córneo e infiltración de leucocitos como resultado del proceso inflamatorio. Sin embargo, el tratamiento con PGZ-NE mejoró notablemente las características estructurales del tejido notándose un menor

grosor de la dermis y una disminución del infiltrado de células inflamatorias en el área afectada (Artículo 3 – Fig. 7). A nivel bioquímico se analizó la expresión génica de diferentes citocinas mediante RT-qPCR y la concentración de TNF- α mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés).

El efecto inflamatorio causado por AA desencadenó un incremento significativo en la expresión de ARNm de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 β y TNF- α , así como una tendencia en reducir la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10. El tratamiento con PGZ-NE aplicado tópicamente en el área inflamada restableció los valores de ARNm antiinflamatorio y disminuyó significativamente la expresión de las citocinas proinflamatorias estudiadas (Artículo 3 – Fig. 6). En todos los casos, hubo una mejor respuesta antiinflamatoria cuando se administró PGZ-NE antes de la inducción del daño (grupo de prevención), en comparación con la respuesta observada al aplicar PGZ-NE después de la inflamación. Estos hallazgos corroboran con los reportados en estudios previos realizados en sujetos obesos en los que el tratamiento con PGZ disminuyó la expresión de parámetros inflamatorios adiposos como IL-6, IL-1 β y TNF- α [239]. Entre estas citocinas, TNF- α se considera un “regulador maestro” en los procesos inflamatorios porque puede desencadenar la expresión local de otras citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 e induce la acumulación de células inmunitarias en las lesiones de la piel [240]. El TNF- α se libera en la piel después de un traumatismo, lesión o infección y es uno de los marcadores tempranos más abundantes en el tejido inflamado. En base a este enfoque, el potencial antiinflamatorio de PGZ-NE fue corroborado mediante ELISA, cuyo resultado mostró una disminución en la producción de TNF- α en el tejido tratado.

Por otro lado, la eficacia terapéutica de PGZ-NE₂ fue evaluada en ratones hairless utilizando un modelo de dermatitis atópica inducida por oxazolona, que reproduce eficazmente la enfermedad en aspectos clínicos, histológicos e inmunológicos. La oxazolona es un hapteno que altera covalentemente las proteínas de la piel y desencadena respuestas alérgicas [241]. La aplicación repetida de oxazolona en la piel del ratón provoca una reacción de hipersensibilidad crónica con múltiples características de la dermatitis atópica humana, incluyendo eritema, edema, erosión

y sequedad [242]. En el presente estudio, la aplicación tópica de oxazolona en la piel de los ratones indujo la aparición de lesiones cutáneas, eritema, descamación y edema que se detectaron macroscópicamente después del día 15 del experimento y se hicieron cada vez más pronunciados en el control positivo a medida que avanzaba la aplicación de oxazolona. La oxazolona también se aplicó diariamente en el grupo de animales que recibió el tratamiento con PGZ-NE₂ con el objetivo de mantener inducida la dermatitis atópica. Este grupo redujo notablemente las lesiones cutáneas desde el segundo día de tratamiento, observándose una mejoría progresiva y mostrando una apariencia de piel sana que era comparable al control negativo al final del experimento.

En una piel sana, la capa del estrato córneo comprende una matriz intercelular rica en lípidos que contiene cantidades equilibradas de ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres, dicha estructura reduce la pérdida de agua y mantiene la piel hidratada [243]. TEWL representa la cantidad de agua que se difunde a través de un área fija del estrato córneo a la superficie de la piel por unidad de tiempo, y SCH es un indicador de sequedad de la piel porque mide el contenido de agua del estrato córneo [244]. La dermatitis atópica se caracteriza por tener una barrera epidérmica defectuosa o debilitada y anomalías lipídicas que promueven un aumento de TEWL y una disminución de SCH. Por lo tanto, la evaluación no invasiva de estos parámetros biofísicos se utiliza con éxito para analizar la función de barrera cutánea en pacientes con dermatitis atópica [233, 245]. El análisis de estos parámetros permitió observar que la aplicación tópica de oxazolona en la piel del ratón aumentó significativamente TEWL y disminuyó SCH debido al daño en la barrera cutánea, lo cual fue consistente con las lesiones observadas macroscópicamente. Se evidenció un aumento de 73.11% en los niveles de TEWL y una disminución de 36.01% en los niveles de SCH con respecto al estado basal, sin embargo, el tratamiento con PGZ-NE₂ detuvo la progresión de la enfermedad y ayudó a restablecer estos niveles, reduciendo TEWL y aumentando SCH desde el segundo y cuarto día de tratamiento, respectivamente, hasta el punto de no mostrar diferencias significativas con respecto al estado basal. Por el contrario, el control positivo exhibió un deterioro progresivo de estos parámetros, mostrando los valores más críticos de TEWL con un aumento

del 97.57% y una disminución de SCH del 40.57%, en comparación con el estado basal (Artículo 4 – Fig. 4). Estos resultados son consistentes con estudios previos que informaron un aumento de 2 a 4 veces en los niveles de TEWL de pacientes con dermatitis atópica en comparación con la piel de los controles normales [246]. Estas alteraciones en los parámetros biomecánicos de la piel en la dermatitis atópica pueden explicarse por el deterioro en la función de la barrera cutánea asociado con alteración de la composición lipídica del estrato córneo, incluyendo la reducción de lípidos totales, fosfolípidos, ceramidas y ésteres de esteroides [247]. La inflamación dérmica también se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias, así como por engrosamiento de la piel indicativo de edema, mayor permeabilidad vascular e hiperplasia epidérmica [248]. Estas características fueron evaluadas en el presente estudio, observándose mayor grosor de la piel en el grupo positivo, así como alteraciones histológicas propias de la enfermedad, incluyendo infiltrado celular inflamatorio y lesiones tisulares como pérdida del estrato córneo acompañado de una pérdida inicial de apéndices dérmicos. Por el contrario, la administración tópica de PGZ-NE₂ ayudó a prevenir estos síntomas, observándose reducción del proceso inflamatorio y alivio de las lesiones cutáneas inducidas por oxazolona (Artículo 4 – Fig. 4 y Fig. 6). Para realizar un estudio a profundidad sobre el impacto de la oxazolona en la piel de los ratones y comprobar la reversión de estos efectos mediante la aplicación de PGZ-NE₂, se analizó la nanoestructura de la piel sana y dañada mediante AFM. El control negativo (piel sana) mostró una superficie ondulada con un valor medio de rugosidad de 33±6 nm, mientras que la aplicación de oxazolona (control positivo) provocó la formación de estructuras amorfas de tamaño de 0.5–1 µm. La piel del grupo tratado con PGZ-NE₂ volvió a mostrar una superficie ondulada, pero con estructuras redondas adicionales de 200–300 nm de tamaño y 10-20 nm de altura, lo que sugiere que la formulación promueve un ligero aumento del volumen de algunas regiones en los corneocitos después de su absorción en la piel y, en este caso, la piel era más lisa con un valor medio de rugosidad de 11.0±1.8 nm. La elasticidad de la piel se evaluó mediante la determinación del módulo de Young, encontrándose un valor medio de 23 MPa en la piel de los ratones sanos, consistente con otros informes reportados previamente [249]. El tratamiento con oxazolona indujo rigidez de la piel con un módulo de Young de 50.6 MPa, más

del doble del valor del control negativo. Curiosamente, la aplicación de PGZ-NE₂ revirtió la rigidez debido a la oxazolona, como lo demuestra la reducción del valor del módulo de Young a 31 MPa (Artículo 4 – Fig. 5).

Desde el punto de vista inmunológico, la dermatitis atópica se caracteriza por la producción de citocinas que afectan en gran medida la fisiopatología de la enfermedad. El papel crítico de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-17 en la fisiopatología de la enfermedad se ha informado previamente en varios estudios, en los que se ha observado niveles elevados de TNF- α en suero y piel, que se libera mediante la infiltración de mastocitos, linfocitos Th y queratinocitos [250]. Otros estudios han demostrado que el TNF- α solo o en combinación con las citocinas Th2 influye en las alteraciones de las propiedades lipídicas de la barrera cutánea observadas en las lesiones de dermatitis atópica, incluida la reducción de los ácidos grasos libres [251]. IL-6 es inducida por citocinas inflamatorias tempranas inmediatas como TNF- α e IL-1, y se expresa en respuesta a la exposición a alérgenos en pacientes atópicos [252]. IL-6 se ha asociado alternativamente con dermatitis alérgica e irritante, participa en la respuesta de fase aguda, estimula el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos T y B, y promueve la producción de IL-4, que participa en el desarrollo de respuestas inmunes alérgicas [253]. IL-17 se sobreexpresa en trastornos autoinmunes crónicos, dermatitis atópica y asma. Algunos estudios sugieren que la producción de IL-17 es un sello común entre dermatitis atópica y psoriasis. Esta citocina promueve la diferenciación de las células B, modula la respuesta inmune celular Th2, favorece el desarrollo de la forma crónica de dermatitis atópica y agrava el deterioro de la piel enferma al inhibir la producción de filagrina. El análisis de estas citocinas en la presente investigación mostró que, los ratones con dermatitis atópica inducida por oxazolona presentaron un aumento de más del doble en la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-17 en comparación con el control negativo. El tratamiento con PGZ-NE₂ fue capaz de reducir la producción de estas citocinas proinflamatorias a niveles similares a los del control negativo (Artículo 4 – Fig. 7). En conjunto, los resultados obtenidos en el estudio de eficacia utilizando el modelo de dermatitis atópica inducida por oxazolona demostraron la eficacia de la formulación en los aspectos clínicos, histológicos e inmunológicos de la enfermedad, efecto que puede atribuirse

a diferentes propiedades de la formulación, incluyendo: la actividad antiinflamatoria de PGZ; el efecto protector de las gotitas de la fase interna de la nanoemulsión, las cuales se adhieren a la superficie de la piel y forman una especie de película que evita la evaporación del agua; y la propiedad reparadora de la piel del Pluronic F127, reportado previamente como inductor de la proliferación de fibras de colágeno y la cicatrización en la piel quemada y escarificada [254-256].

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo doctoral se diseñaron cinco formulaciones mediante la construcción de diagramas pseudoternarios utilizando excipientes farmacéuticamente aceptables para su utilización en sistemas de administración intranasal y dérmica.

- Se logró la incorporación de PGZ en dos nanoemulsiones (PGZ-NE y PGZ-NE₂) como estrategias para proporcionar una mayor solubilización del fármaco, promover su permeación a través del estrato córneo y generar un efecto antiinflamatorio a nivel local.
- Se desarrollaron tres formulaciones de DPZ de administración intranasal (DPZ-ME, DPZ-NE y DPZ-PNE) como alternativas para mejorar la biodisponibilidad del fármaco en el cerebro en el tratamiento del Alzheimer.
- Las cinco formulaciones mostraron un aspecto transparente, homogéneo y monofásico, con un pH aceptable que garantiza efectos no irritantes a nivel de la cavidad nasal o la piel.
- Todas las formulaciones desarrolladas exhibieron un tamaño de gota en escala nanométrica, forma esférica y distribución uniforme, lo que proporciona transparencia óptica, una gran área de superficie y una distribución uniforme en el sitio de aplicación.
- El análisis reológico apoyado por el modelamiento matemático confirmó el comportamiento de flujo de tipo newtoniano de DPZ-ME, DPZ-NE, PGZ-NE y PGZ-NE₂, haciéndolas ideales para su aplicación en forma de aerosol o roll-on, mientras que DPZ-PNE, se ajustó mejor al modelo de Ostwald-de Waele, lo que indica un comportamiento de adelgazamiento por corte (pseudoplástico).
- La incorporación de Pluronic F127 en las nanoemulsiones aumentó la viscosidad del sistema, proporcionando un producto con consistencia mejorada,

fácil de usar y capaz de bioadherirse para permanecer retenido en el área tratada durante un tiempo más prolongado.

- La liberación *in vitro* tanto de PGZ como DPZ a partir de las formulaciones correspondientes siguió un modelo cinético de hipérbola, lo que demostró que los vehículos son capaces de liberar el fármaco incorporado y, por lo tanto, la formulación no limitaría su permeación a través del tejido.
- Los estudios de permeación *ex vivo* en mucosa nasal porcina mostraron una mayor permeación del DPZ a partir de la formulación DPZ-ME en comparación con DPZ-NE y DPZ-PNE, posiblemente debido a su mayor contenido de tensioactivos y co-tensioactivos, los cuales actúan como promotores de la permeación.
- Se observó una alta cantidad de DPZ retenido en el tejido a partir de las tres formulaciones, lo que sugiere que la mucosa podría actuar como un reservorio que permite la liberación sostenida del fármaco al cerebro.
- PGZ fue capaz de atravesar las capas internas de la piel a partir de PGZ-NE; en contraste a partir de PGZ-NE₂ quedó retenido en la piel sin alcanzar el compartimento receptor, sugiriéndose su conveniencia para un efecto local en la piel sin efectos sistémicos adversos.
- Ambas formulaciones de PGZ favorecieron el transporte del fármaco a través del estrato córneo y promovieron su retención en la piel, lo que podría extender la duración de la acción del fármaco y, en consecuencia, podría reducir la frecuencia de dosificación en la práctica clínica.
- Los resultados de la tolerancia *in vitro* con células nasales humanas e *in vivo* en un modelo de administración intranasal en cerdo, confirmaron que DPZ-NE y DPZ-PNE no producen citotoxicidad a las concentraciones ensayadas ni causan signos de irritación, inflamación o daño a nivel de la cavidad nasal.

- La aplicación tópica de PGZ-NE en voluntarios sanos demostró una alta biocompatibilidad e idoneidad de la formulación para el uso humano ya que no se detectaron señales de alteración en la integridad de la barrera de la piel.
- El tratamiento con PGZ-NE efectivamente redujo el proceso inflamatorio en un 44% en el modelo de edema auricular de ratón inducido por TPA.
- El tratamiento con PGZ-NE disminuyó significativamente la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 β y TNF- α , y contrarrestó las alteraciones histopatológicas y el infiltrado de células inflamatorias en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por ácido araquidónico.
- PGZ-NE₂ exhibió una notable eficacia terapéutica en el modelo de dermatitis atópica inducida por oxazolona en ratones hairless, mostrando efectos significativos en diferentes aspectos clínicos, histológicos e inmunológicos de la enfermedad, tales como, reducción de las lesiones cutáneas, restablecimiento de la elasticidad y de las propiedades biomecánicas de la piel, disminución del infiltrado celular inflamatorio, así como reducción en la expresión de citocinas proinflamatorias asociadas con la fisiopatología de la enfermedad incluyendo TNF- α , IL-6 e IL-17.

REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

1. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2019;15(3):321-387.
2. Zverova M. Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clin Biochem*. 2019;72:3-6.
3. Maccioni RB, Farias G, Morales I, Navarrete L. The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch Med Res*. 2010;41(3):226-231.
4. Houmani N, Vialatte F, Gallego-Jutgla E, Dreyfus G, Nguyen-Michel VH, Mariani J, Kinugawa K. Diagnosis of Alzheimer's disease with Electroencephalography in a differential framework. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193607.
5. Matej R, Tesar A, Rusina R. Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias in comorbidity: A clinical and neuropathological overview. *Clin Biochem*. 2019;73:26-31.
6. Derry PJ, Hegde ML, Jackson GR, Kaye R, Tour JM, Tsai AL, Kent TA. Revisiting the intersection of amyloid, pathologically modified tau and iron in Alzheimer's disease from a ferroptosis perspective. *Prog Neurobiol*. 2020;184:101716.
7. Dominguez D, De Strooper B. Novel therapeutic strategies provide the real test for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2002;23(7).
8. Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. 2008;283(44):29615-29619.

9. Madav Y, Wairkar S, Prabhakar B. Recent therapeutic strategies targeting beta amyloid and tauopathies in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 2019;146:171-184.
10. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides.* 2015;52:1-18.
11. Edwards FA. A Unifying Hypothesis for Alzheimer's Disease: From Plaques to Neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2019;42(5):310-322.
12. Roy S, Zhang B, Lee VM, Trojanowski JQ. Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 2005;109(1):5-13.
13. Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35(6):1397-1409.
14. Wen MM, El-Salamouni NS, El-Refaie WM, Hazzah HA, Ali MM, Tosi G, Farid RM, Blanco-Prieto MJ, Billa N, Hanafy AS. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges. *J Control Release.* 2017;245:95-107.
15. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(8):1219-1231.
16. Yves C. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(suppl):621S-629S.
17. Butterfield A, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β -peptide. *TRENDS in Molecular Medicine.* 2001;7(12):548-554.

18. Md S, Bhattmisra SK, Zeeshan F, Shahzad N, Mujtaba MA, Srikanth Meka V, Radhakrishnan A, Kesharwani P, Baboota S, Ali J. Nano-carrier enabled drug delivery systems for nose to brain targeting for the treatment of neurodegenerative disorders. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018;43:295-310.
19. Szabo ST, Harry GJ, Hayden KM, Szabo DT, Birnbaum L. Comparison of Metal Levels between Postmortem Brain and Ventricular Fluid in Alzheimer's Disease and Nondemented Elderly Controls. *Toxicol Sci*. 2016;150(2):292-300.
20. Crane PK, Walker R, Hubbard RA, Li G, Nathan DM, Zheng H, Haneuse S, Craft S, Montine TJ, Kahn SE, McCormick W, McCurry SM, Bowen JD, Larson EB. Glucose levels and risk of dementia. *N Engl J Med*. 2013;369(6):540-548.
21. Edland S. Insulin-Degrading Enzyme, Apolipoprotein E, and Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2004;23:213-217.
22. Schioth HB, Craft S, Brooks SJ, Frey WH, 2nd, Benedict C. Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Mol Neurobiol*. 2012;46(1):4-10.
23. Ulep MG, Saraon SK, McLea S. Alzheimer Disease. *The Journal for Nurse Practitioners*. 2018;14(3):129-135.
24. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):263-269.

25. Fish PV, Steadman D, Bayle ED, Whiting P. New approaches for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett*. 2019;29(2):125-133.
26. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, Khachaturian ZS. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018;141(7):1917-1933.
27. Seltzer B. Donepezil: an update. *Expert Opin Pharmacother*. 2007;8(7):1011-1023.
28. Onor M, Trevisiol M, Aguglia E. Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clinical Interventions in Aging*. 2007;2(1):17-32.
29. Noetzli M, Eap CB. Pharmacodynamic, pharmacokinetic and pharmacogenetic aspects of drugs used in the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Pharmacokinet*. 2013;52(4):225-241.
30. Dominguez E, Chin TY, Chen CP, Wu TY. Management of moderate to severe Alzheimer's disease: focus on memantine. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2011;50(4):415-423.
31. Takeda M, Tanaka T, Okochi M. New drugs for Alzheimer's disease in Japan. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2011;65(5):399-404.
32. Sozio P, Cerasa LS, Marinelli L, Di Stefano A. Transdermal donepezil on the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2012;8:361-368.
33. Ferris SH, Farlow M. Language impairment in Alzheimer's disease and benefits of acetylcholinesterase inhibitors. *Clin Interv Aging*. 2013;8:1007-1014.

34. Li Q, He S, Chen Y, Feng F, Qu W, Sun H. Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2018;158:463-477.
35. Jann M, Shirley K, Small G. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cholinesterase Inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(10):719-739.
36. Cacabelos R. Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* 2007;3(3):303-333.
37. Jacobson SA, Sabbagh MN. Donepezil: potential neuroprotective and disease-modifying effects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(10):1363-1369.
38. Kume T, Sugimoto M, Takada Y, Yamaguchi T, Yonezawa A, Katsuki H, Sugimoto H, Akaike A. Up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors by central-type acetylcholinesterase inhibitors in rat cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* 2005;527(1-3):77-85.
39. Takada-Takatori Y, Kume T, Sugimoto M, Katsuki H, Sugimoto H, Akaike A. Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Neuropharmacology.* 2006;51(3):474-486.
40. Saxena G, Singh SP, Agrawal R, Nath C. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. *Eur J Pharmacol.* 2008;581(3):283-289.
41. Karami Z, Saghatchi Zanjani MR, Hamidi M. Nanoemulsions in CNS drug delivery: recent developments, impacts and challenges. *Drug Discov Today.* 2019;24(5):1104-1115.

42. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol.* 2009;31(4):497-511.
43. Gao H. Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. *Acta Pharm Sin B.* 2016;6(4):268-286.
44. de Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:323-355.
45. Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Antimisiaris SG, Chougule MB, Shoyele SA, Alexander A. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J Control Release.* 2018;281:139-177.
46. Alam MI, Beg S, Samad A, Baboota S, Kohli K, Ali J, Ahuja A, Akbar M. Strategy for effective brain drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2010;40(5):385-403.
47. Md S, Mustafa G, Baboota S, Ali J. Nanoneurotherapeutics approach intended for direct nose to brain delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 2015;41(12):1922-1934.
48. Bitter C, Suter- Zimmermann K, Surber C. Nasal Drug Delivery in Humans. *Curr Probl Dermatol.* 2011;40:20-35.
49. Akel H, Ismail R, Csoka I. Progress and perspectives of brain-targeting lipid-based nanosystems via the nasal route in Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020;148:38-53.
50. Erdo F, Bors LA, Farkas D, Bajza A, Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Res Bull.* 2018;143:155-170.

51. Chatterjee B, Gorain B, Mohananaidu K, Sengupta P, Mandal UK, Choudhury H. Targeted drug delivery to the brain via intranasal nanoemulsion: Available proof of concept and existing challenges. *Int J Pharm.* 2019;565:258-268.
52. Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int J Pharm.* 2009;379(1):146-157.
53. Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci.* 2018;195:44-52.
54. Arora P, Sharma S, Garg S. Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discov Today.* 2002;7(18):967-975.
55. Bourganis V, Kammona O, Alexopoulos A, Kiparissides C. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;128:337-362.
56. Martins PP, Smyth HDC, Cui Z. Strategies to facilitate or block nose-to-brain drug delivery. *Int J Pharm.* 2019;570:118635.
57. Grassin-Delyle S, Buenestado A, Naline E, Faisy C, Blouquit-Laye S, Couderc LJ, Le Guen M, Fischler M, Devillier P. Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. *Pharmacol Ther.* 2012;134(3):366-379.
58. Illum L. Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. *Journal of Controlled Release.* 2003;87(1-3):187-198.
59. Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2000;11:1-18.

60. Ganger S, Schindowski K. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics*. 2018;10(3).
61. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(7):614-628.
62. Rohrer J, Lupo N, Bernkop-Schnurch A. Advanced formulations for intranasal delivery of biologics. *Int J Pharm*. 2018;553(1-2):8-20.
63. Hanson LR, Frey WH, 2nd. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci*. 2008;9 Suppl 3:S5.
64. Pardeshi CV, Belgamwar VS. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10(7):957-972.
65. Jones DS, Craig DQM. The Journal of Pharmacy and Pharmacology- four years on. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2004;56(1):1-2.
66. Selvaraj K, Gowthamarajan K, Karri V. Nose to brain transport pathways an overview: potential of nanostructured lipid carriers in nose to brain targeting. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(8):2088-2095.
67. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH, 2nd. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci*. 2010;99(4):1654-1673.
68. Kozlovskaya L, Abou-Kaoud M, Stepensky D. Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. *J Control Release*. 2014;189:133-140.

69. Johnson N, Hanson L, Frey II W. Trigeminal Pathways Deliver a Low Molecular Weight Drug from the Nose to the Brain and Orofacial Structures. *Molecular Pharmaceutics*. 2010;7(3):884–893.
70. Chen TC, da Fonseca CO, Schonthal AH. Intranasal Perillyl Alcohol for Glioma Therapy: Molecular Mechanisms and Clinical Development. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
71. Sood S, Jain K, Gowthamarajan K. Intranasal therapeutic strategies for management of Alzheimer’s disease. *J Drug Target*. 2014;22(4):279-294.
72. Donovan M, Huang Y. Large molecule and particulate uptake in the nasal cavity: the effect of size on nasal absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998;29((1-2)):147-155.
73. Wu H, Hu K, Jiang X. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008;5(10):1159-1168.
74. Patel RS, McGarry GW. Most patients overdose on topical nasal corticosteroid drops: an accurate delivery device is required. *J Laryngol Otol*. 2001;115(8):633-635.
75. Pires PC, Santos AO. Nanosystems in nose-to-brain drug delivery: A review of non-clinical brain targeting studies. *J Control Release*. 2018;270:89-100.
76. Marttin E, Schipper N, Verhoef J, Merkus F. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;29((1-2)):13-38.
77. Mandal S, Mandal SD, Chuttani K, Sawant KK, Subudhi BB. Design and evaluation of mucoadhesive microemulsion for neuroprotective effect of ibuprofen following intranasal route in the MPTP mice model. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016;42(8):1340-1350.

78. Benítez JM, Montáns FJ. The mechanical behavior of skin: Structures and models for the finite element analysis. *Computers & Structures*. 2017;190:75-107.
79. Abdo JM, Sopko NA, Milner SM. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine*. 2020;28.
80. Boer M, Duchnik E, Maleszka R, Marchlewicz M. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postepy Dermatol Alergol*. 2016;33(1):1-5.
81. Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin, Giri TK, Saraf S, Saraf S, Tripathi DK. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release*. 2012;164(1):26-40.
82. Tsakovska I, Pajeva I, Al Sharif M, Alov P, Fioravanzo E, Kovarich S, Worth AP, Richarz AN, Yang C, Mostrag-Szlichtyng A, Cronin MTD. Quantitative structure-skin permeability relationships. *Toxicology*. 2017;387:27-42.
83. Bouwstraa J, Honeywell-Nguyena P, Goorisa G, Ponecb M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*. 2003;42:1-36.
84. van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(3):295-313.
85. Maricich S, Wellnitz S, Nelson A, Lesniak D, Gerling G, Lumpkin E, Zoghbi H. Merkel Cells Are Essential for Light-Touch Responses. *Science*. 2009;324(5934).

86. Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2017;25(3):283-289.
87. Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control.* 2006;34(10):S98-S110.
88. Degim IT. New tools and approaches for predicting skin permeability. *Drug Discov Today.* 2006;11(11-12):517-523.
89. Yang G, Seok JK, Kang HC, Cho YY, Lee HS, Lee JY. Skin Barrier Abnormalities and Immune Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8).
90. Mathur V, Satrawala Y, Rajput M. Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutics.* 2010;4(3).
91. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm.* 2012;435(1):3-9.
92. Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine.* 2013;41(6):317-320.
93. Mathes SH, Ruffner H, Graf-Hausner U. The use of skin models in drug development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;69-70:81-102.
94. Liu X, Kruger P, Maibach H, Colditz PB, Roberts MS. Using skin for drug delivery and diagnosis in the critically ill. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;77:40-49.
95. Sala M, Diab R, Elaissari A, Fessi H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. *Int J Pharm.* 2018;535(1-2):1-17.

96. Brown MB, Martin GP, Jones SA, Akomeah FK. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Deliv.* 2006;13(3):175-187.
97. Zsikó, Csányi, Kovács, Budai S, Gácsi, Berkó. Methods to Evaluate Skin Penetration In Vitro. *Scientia Pharmaceutica.* 2019;87(3).
98. Soni M, Kumar S, Gupta G. Transdermal Drug Delivery: A Novel Approach to Skin Permeation. *Journal of Pharmacy Research.* 2009;2(8):1184-1190.
99. Liuzzi R, Carciati A, Guido S, Caserta S. Transport efficiency in transdermal drug delivery: What is the role of fluid microstructure? *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;139:294-305.
100. Karadzovska D, Brooks JD, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Predicting skin permeability from complex vehicles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(2):265-277.
101. Bolzinger M-A, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 2012;17(3):156-165.
102. Naik A, Kalia Y, Guy R. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical Science & Technology Today.* 2000;3(9):318-326.
103. Hadgraft J. Skin deep. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(2):291-299.
104. Neupane R, Boddu SHS, Renukuntla J, Babu RJ, Tiwari AK. Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. *Pharmaceutics.* 2020;12(2).

105. Knorr F, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Follicular transport route--research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(2):173-180.
106. Shaker DS, Ishak RAH, Ghoneim A, Elhuoni MA. Nanoemulsion: A Review on Mechanisms for the Transdermal Delivery of Hydrophobic and Hydrophilic Drugs. *Scientia Pharmaceutica.* 2019;87(3).
107. Foldvari M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharm Sci Technolo Today.* 2000;3(12):417-425.
108. Sharma N, Agarwal G, Rana AC, Ali Z, Kumar D. A Review: Transdermal Drug Delivery System: A Tool For Novel Drug Delivery System. *International Journal of Drug Development & Research.* 2011;3(3):70-84.
109. Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: the years of enlightenment. *Int J Pharm.* 2005;305(1-2):2-12.
110. Marwah H, Garg T, Goyal AK, Rath G. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv.* 2016;23(2):564-578.
111. Zeng WJ, Tan Z, Lai XF, Xu YN, Mai CL, Zhang J, Lin ZJ, Liu XG, Sun SL, Zhou LJ. Topical delivery of l-theanine ameliorates TPA-induced acute skin inflammation via downregulating endothelial PECAM-1 and neutrophil infiltration and activation. *Chem Biol Interact.* 2018;284:69-79.
112. Kendall AC, Nicolaou A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. *Prog Lipid Res.* 2013;52(1):141-164.
113. Kotnik V. Complement in skin diseases. *Acta Dermatoven APA.* 2011;20(1):1-11.

114. Pireddu R, Caddeo C, Valenti D, Marongiu F, Scano A, Ennas G, Lai F, Fadda AM, Sinico C. Diclofenac acid nanocrystals as an effective strategy to reduce in vivo skin inflammation by improving dermal drug bioavailability. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;143:64-70.
115. Dainichi T, Hanakawa S, Kabashima K. Classification of inflammatory skin diseases: a proposal based on the disorders of the three-layered defense systems, barrier, innate immunity and acquired immunity. *J Dermatol Sci*. 2014;76(2):81-89.
116. Wittmann M, McGonagle D, Werfel T. Cytokines as therapeutic targets in skin inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(4):443-451.
117. Chung J, Simpson EL. The socioeconomics of atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2019;122(4):360-366.
118. Maurya AK, Mohanty S, Pal A, Chanotiya CS, Bawankule DU. The essential oil from *Citrus limetta* Risso peels alleviates skin inflammation: In-vitro and in-vivo study. *J Ethnopharmacol*. 2018;212:86-94.
119. Brunner PM. Early immunologic changes during the onset of atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2019;123(2):152-157.
120. Misery L, Huet F, Gouin O, Stander S, Deleuran M. Current pharmaceutical developments in atopic dermatitis. *Curr Opin Pharmacol*. 2019;46:7-13.
121. Archer CB. Atopic dermatitis. *Medicine*. 2017;45(6):379-382.
122. Furue M, Ulzii D, Nakahara T, Tsuji G, Furue K, Hashimoto-Hachiya A, Kido-Nakahara M. Implications of IL-13R α 2 in atopic skin inflammation. *Allergol Int*. 2020.

123. Silverberg JI, Kantor R. The Role of Interleukins 4 and/or 13 in the Pathophysiology and Treatment of Atopic Dermatitis. *Dermatol Clin.* 2017;35(3):327-334.
124. Silverberg JI. Atopic Dermatitis in Adults. *Med Clin North Am.* 2020;104(1):157-176.
125. Brown SJ, McLean WH. One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol.* 2012;132(3 Pt 2):751-762.
126. Mobus L, Weidinger S, Emmert H. Epigenetic factors involved in the pathophysiology of inflammatory skin diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(4):1049-1060.
127. Malik K, Heitmiller KD, Czarnowicki T. An Update on the Pathophysiology of Atopic Dermatitis. *Dermatol Clin.* 2017;35(3):317-326.
128. Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, Mitsui H, Cardinale I, de Guzman Strong C, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(6):1344-1354.
129. Ahn K, Kim BE, Kim J, Leung DY. Recent advances in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol.* 2020;66:14-21.
130. Brunner PM, Israel A, Zhang N, Leonard A, Wen HC, Huynh T, Tran G, Lyon S, Rodriguez G, Immaneni S, Wagner A, Zheng X, Estrada YD, Xu H, Krueger JG, Paller AS, Guttman-Yassky E. Early-onset pediatric atopic dermatitis is characterized by TH2/TH17/TH22-centered inflammation and lipid alterations. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(6):2094-2106.

131. Guttman-Yassky E, Dhingra N, Leung DY. New era of biologic therapeutics in atopic dermatitis. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(4):549-561.
132. Werfel T, Schwerk N, Hansen G, Kapp A. The Diagnosis and Graded Therapy of Atopic Dermatitis. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111(29-30):509-520.
133. Serra-Baldrich E, de Frutos JO, Jauregui I, Armario-Hita JC, Silvestre JF, Herraiz L, Martin-Santiago A, Valero A, Sastre J. Changing perspectives in atopic dermatitis. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2018;46(4):397-412.
134. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, Berger TG, Bergman JN, Cohen DE, Cooper KD, Cordoro KM, Davis DM, Krol A, Margolis DJ, Paller AS, Schwarzenberger K, Silverman RA, Williams HC, Elmets CA, Block J, Harrod CG, Smith Begolka W, Sidbury R. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(2):338-351.
135. Bieber T. How to Define Atopic Dermatitis? *Dermatol Clin.* 2017;35(3):275-281.
136. Saini S, Pansare M. New Insights and Treatments in Atopic Dermatitis. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66(5):1021-1033.
137. Boguniewicz M, Alexis AF, Beck LA, Block J, Eichenfield LF, Fonacier L, Guttman-Yassky E, Paller AS, Pariser D, Silverberg JI, Lebwohl M. Expert Perspectives on Management of Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: A Multidisciplinary Consensus Addressing Current and Emerging Therapies. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(6):1519-1531.
138. Munera-Campos M, Carrascosa JM. Innovation in Atopic Dermatitis: From Pathogenesis to Treatment. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition).* 2020;111(3):205-221.

139. Abuabara K, Margolis DJ, Langan SM. The Long-Term Course of Atopic Dermatitis. *Dermatol Clin.* 2017;35(3):291-297.
140. Kusari A, Han AM, Schairer D, Eichenfield LF. Atopic Dermatitis: New Developments. *Dermatol Clin.* 2019;37(1):11-20.
141. Mizushige K, Tsuji T, Noma T. Pioglitazone: Cardiovascular Effects in Prediabetic Patients. *Cardiovasc Drug Rev.* 2002;20(4):329-340.
142. Murakami-Nishida S, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Yamada S, Morita Y, Nishida S, Motoshima H, Kondo T, Komohara Y, Araki E. Pioglitazone suppresses macrophage proliferation in apolipoprotein-E deficient mice by activating PPARgamma. *Atherosclerosis.* 2019;286:30-39.
143. Satheeshkumar N, Shantikumar S, Srinivas R. Pioglitazone: A review of analytical methods. *J Pharm Anal.* 2014;4(5):295-302.
144. Sugita M, Kataoka M, Sugihara M, Takeuchi S, Yamashita S. Effect of excipients on the particle size of precipitated pioglitazone in the gastrointestinal tract: impact on bioequivalence. *AAPS J.* 2014;16(5):1119-1127.
145. Gillies P, J. Dunn C. Pioglitazone. *Drugs.* 2000;60(2):333-343.
146. Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(5):205-215.
147. Belvisi MG, Hele DJ, Birrell MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):101-109.

148. Suke SG, Negi H, Mediratta PK, Banerjee BD, Sharma KK. Anti-arthritic and anti-inflammatory activity of combined pioglitazone and prednisolone on adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol.* 2013;718(1-3):57-62.
149. Scheen AJ, Esser N, Paquot N. Antidiabetic agents: Potential anti-inflammatory activity beyond glucose control. *Diabetes Metab.* 2015;41(3):183-194.
150. Kothari V, Galdo JA, Mathews ST. Hypoglycemic agents and potential anti-inflammatory activity. *J Inflamm Res.* 2016;9:27-38.
151. Koppaka S, Kehlenbrink S, Carey M, Li W, Sanchez E, Lee DE, Lee H, Chen J, Carrasco E, Kishore P, Zhang K, Hawkins M. Reduced adipose tissue macrophage content is associated with improved insulin sensitivity in thiazolidinedione-treated diabetic humans. *Diabetes.* 2013;62(6):1843-1854.
152. Carboni E, Carta AR, Carboni E. Can pioglitazone be potentially useful therapeutically in treating patients with COVID-19? *Med Hypotheses.* 2020;140:109776.
153. Xie X, Sinha S, Yi Z, Langlais PR, Madan M, Bowen BP, Willis W, Meyer C. Role of adipocyte mitochondria in inflammation, lipemia and insulin sensitivity in humans: effects of pioglitazone treatment. *Int J Obes (Lond).* 2017.
154. Zhang WY, Schwartz EA, Permana PA, Reaven PD. Pioglitazone inhibits the expression of inflammatory cytokines from both monocytes and lymphocytes in patients with impaired glucose tolerance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(12):2312-2318.
155. Qiu D, Li XN. Pioglitazone inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and chemokines in astrocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2015;53(9):746-752.

156. Klotz L, Burgdorf S, Dani I, Saijo K, Flossdorf J, Hucke S, Alferink J, Nowak N, Beyer M, Mayer G, Langhans B, Klockgether T, Waisman A, Eberl G, Schultze J, Famulok M, Kolanus W, Glass C, Kurts C, Knolle PA. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med.* 2009;206(10):2079-2089.
157. Liu Y, Qu Y, Liu L, Zhao H, Ma H, Si M, Cheng L, Nie L. PPAR-gamma agonist pioglitazone protects against IL-17 induced intervertebral disc inflammation and degeneration via suppression of NF-kappaB signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2019;72:138-147.
158. Aoki Y, Maeno T, Aoyagi K, Ueno M, Aoki F, Aoki N, Nakagawa J, Sando Y, Shimizu Y, Suga T, Arai M, Kurabayashi M. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, suppresses bleomycin-induced acute lung injury and fibrosis. *Respiration.* 2009;77(3):311-319.
159. Silva-Abreu M, Espinoza LC, Rodriguez-Lagunas MJ, Fabrega MJ, Espina M, Garcia ML, Calpena AC. Human Skin Permeation Studies with PPARgamma Agonist to Improve Its Permeability and Efficacy in Inflammatory Processes. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12).
160. Callender SP, Mathews JA, Kobernyk K, Wettig SD. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *Int J Pharm.* 2017;526(1-2):425-442.
161. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter.* 2012;8(6):1719-1729.
162. Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter.* 2016;12(11):2826-2841.

163. Nastiti C, Ponto T, Abd E, Grice JE, Benson HAE, Roberts MS. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharmaceutics*. 2017;9(4).
164. Solans C, Garcia-Celma MJ. Surfactants for microemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 1997;2(5):464-471.
165. Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garciacelma M. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2005;10(3-4):102-110.
166. Pavoni L, Perinelli DR, Bonacucina G, Cespi M, Palmieri GF. An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(1).
167. Fanun M. Microemulsions as delivery systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2012;17(5):306-313.
168. Bera A, Mandal A. Microemulsions: a novel approach to enhanced oil recovery: a review. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*. 2014;5(3):255-268.
169. Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav NP. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J Control Release*. 2018;270:203-225.
170. Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharm Res*. 2011;28(5):978-985.
171. McClements DJ, Rao J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011;51(4):285-330.

172. Qadir A, Faiyazuddin MD, Talib Hussain MD, Alshammari TM, Shakeel F. Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. *Journal of Molecular Liquids*. 2016;214:7-18.
173. McClements DJ, Jafari SM. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Adv Colloid Interface Sci*. 2018;251:55-79.
174. Muzaffar F, Singh U, Chauhan L. Review on microemulsion as futuristic drug delivery. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013;5(3):39-53.
175. Grigoriev DO, Miller R. Mono- and multilayer covered drops as carriers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2009;14(1):48-59.
176. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, Chourasia MK. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*. 2017;252:28-49.
177. Warisnoicharoen W, Lansley A, Lawrence M. Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. *Int J Pharm*. 2000;198(1):7-27.
178. Dantas TNC, Santanna VC, Souza TTC, Lucas CRS, Dantas Neto AA, Aum PTP. Microemulsions and Nanoemulsions Applied to Well Stimulation and Enhanced Oil Recovery (Eor). *Brazilian Journal of Petroleum and Gas*. 2019;12(4):251-265.
179. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:175-193.

180. de Oca-Ávalos JMM, Candal RJ, Herrera ML. Nanoemulsions: stability and physical properties. *Current Opinion in Food Science*. 2017;16:1-6.
181. Modarres-Gheisari SMM, Gavagsaz-Ghoachani R, Malaki M, Safarpour P, Zandi M. Ultrasonic nano-emulsification - A review. *Ultrason Sonochem*. 2019;52:88-105.
182. Harwansh RK, Deshmukh R, Rahman MA. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;51:224-233.
183. Sadurni N, Solans C, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci*. 2005;26(5):438-445.
184. Ujhelyi Z, Vecsernyes M, Feher P, Kosa D, Arany P, Nemes D, Sinka D, Vasvari G, Fenyvesi F, Varadi J, Bacskay I. Physico-chemical characterization of self-emulsifying drug delivery systems. *Drug Discov Today Technol*. 2018;27:81-86.
185. McClements DJ. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007;47(7):611-649.
186. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(2).
187. Che Marzuki NH, Wahab RA, Abdul Hamid M. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2019;33(1):779-797.

188. Acharya DP, Hartley PG. Progress in microemulsion characterization. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2012;17(5):274-280.
189. Grapentin C, Barnert S, Schubert R. Monitoring the Stability of Perfluorocarbon Nanoemulsions by Cryo-TEM Image Analysis and Dynamic Light Scattering. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130674.
190. Aswathanarayan JB, Vittal RR. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2019;3.
191. Preetz C, Hauser A, Hause G, Kramer A, Mader K. Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: distinction of nanoemulsions from nanocapsules. *Eur J Pharm Sci*. 2010;39(1-3):141-151.
192. Kreilgaard M, Pedersen E, Jaroszewski J. NMR Characterisation and Transdermal Drug Delivery Potential of Microemulsion Systems. *J Control Release*. 2000;69(3):421-433.
193. Gradzielski M. Recent developments in the characterisation of microemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2008;13(4):263-269.
194. Leung KC, Li V, Ng YZ, Chan TT, Chang RS, Wong RY. Systematic Review of Cholinesterase Inhibitors on Cognition and Behavioral Symptoms in Patients of Chinese Descent with Alzheimer's Disease, Vascular Dementia, or Mixed Dementia. *Geriatrics (Basel)*. 2017;2(3).
195. Silva-Abreu M, Gonzalez-Pizarro R, Espinoza LC, Rodriguez-Lagunas MJ, Espina M, Garcia ML, Calpena AC. Thiazolidinedione as an alternative to facilitate oral administration in geriatric patients with Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Sci*. 2019;129:173-180.

196. Katare YK, Piazza JE, Bhandari J, Daya RP, Akilan K, Simpson MJ, Hoare T, Mishra RK. Intranasal delivery of antipsychotic drugs. *Schizophr Res.* 2017;184:2-13.
197. Aderibigbe BA. In Situ-Based Gels for Nose to Brain Delivery for the Treatment of Neurological Diseases. *Pharmaceutics.* 2018;10(2).
198. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm.* 2012;2012:195727.
199. Alvarado HL, Abrego G, Souto EB, Garduno-Ramirez ML, Clares B, Garcia ML, Calpena AC. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: In vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015;130:40-47.
200. Spornath A, Aserin A. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. *Adv Colloid Interface Sci.* 2006;128-130:47-64.
201. Ustundag Okur N, Caglar ES, Arpa MD, Karasulu HY. Preparation and evaluation of novel microemulsion-based hydrogels for dermal delivery of benzocaine. *Pharm Dev Technol.* 2017;22(4):500-510.
202. Gue E, Since M, Ropars S, Herbinet R, Le Pluart L, Malzert-Freon A. Evaluation of the versatile character of a nanoemulsion formulation. *Int J Pharm.* 2016;498(1-2):49-65.
203. Solanki SS, Sarkar B, Dhanwani RK. Microemulsion drug delivery system: for bioavailability enhancement of ampelopsin. *ISRN Pharm.* 2012;2012:108164.
204. Xavier-Junior FH, Vauthier C, Morais AR, Alencar EN, Egito ES. Microemulsion systems containing bioactive natural oils: an overview on the state of the art. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017;43(5):700-714.

205. Sullivan DW, Jr., Gad SC, Julien M. A review of the nonclinical safety of Transcutol(R), a highly purified form of diethylene glycol monoethyl ether (DEGEE) used as a pharmaceutical excipient. *Food Chem Toxicol.* 2014;72:40-50.
206. Shah BM, Misra M, Shishoo CJ, Padh H. Nose to brain microemulsion-based drug delivery system of rivastigmine: formulation and ex-vivo characterization. *Drug Deliv.* 2015;22(7):918-930.
207. Szumala P. Structure of Microemulsion Formulated with Monoacylglycerols in the Presence of Polyols and Ethanol. *J Surfactants Deterg.* 2015;18:97-106.
208. Wang S, Chen P, Zhang L, Yang C, Zhai G. Formulation and evaluation of microemulsion-based in situ ion-sensitive gelling systems for intranasal administration of curcumin. *J Drug Target.* 2012;20(10):831-840.
209. Cho HJ, Ku WS, Termsarasab U, Yoon I, Chung CW, Moon HT, Kim DD. Development of udenafil-loaded microemulsions for intranasal delivery: in vitro and in vivo evaluations. *Int J Pharm.* 2012;423(2):153-160.
210. Acharya SP, Pundarikakshudu K, Panchal A, Lalwani A. Development of carbamazepine transnasal microemulsion for treatment of epilepsy. *Drug Deliv Transl Res.* 2013;3(3):252-259.
211. Pisal SS, Paradkar AR, Mahadik KR, Kadam SS. Pluronic gels for nasal delivery of Vitamin B12. Part I: preformulation study. *Int J Pharm.* 2004;270(1-2):37-45.
212. Al Khateb K, Ozhmukhametova EK, Mussin MN, Seilkhanov SK, Rakhypbekov TK, Lau WM, Khutoryanskiy VV. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int J Pharm.* 2016;502(1-2):70-79.

213. Welin-Bergera K, Neelissena J, Bergensta B. In vitro permeation profile of a local anaesthetic compound from topical formulations with different rheological behaviour — verified by in vivo efficacy data. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;14(3):229-236.
214. Patel N, Baldaniya M, Raval M, Sheth N. Formulation and Development of In Situ Nasal Gelling Systems for Quetiapine Fumarate-Loaded Mucoadhesive Microemulsion. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2015;10(4):357-373.
215. Thorat S. Formulation and Product Development of Nasal Spray: An Overview. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*. 2016;4(8D):2976-2985.
216. Warnken ZN, Smyth HDC, Watts AB, Weitman S, Kuhn JG, Williams RO. Formulation and device design to increase nose to brain drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016;35:213-222.
217. Fernandez-Campos F, Clares Naveros B, Lopez Serrano O, Alonso Merino C, Calpena Campmany AC. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. *Mycoses*. 2013;56(1):70-81.
218. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res*. 2006;23(12):2709-2728.
219. Chatterjee B, Amalina N, Sengupta P, Kumar U. Mucoadhesive Polymers and Their Mode of Action: A Recent Update. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017;7(5):195-203.
220. Sengupta P, Chatterjee B. Potential and future scope of nanoemulgel formulation for topical delivery of lipophilic drugs. *Int J Pharm*. 2017;526(1-2):353-365.

221. Balzus B, Colombo M, Sahle FF, Zoubari G, Staufenbiel S, Bodmeier R. Comparison of different in vitro release methods used to investigate nanocarriers intended for dermal application. *Int J Pharm.* 2016;513(1-2):247-254.
222. Kim KA, Lim JL, Kim C, Park JY. Pharmacokinetic comparison of orally disintegrating and conventional donepezil formulations in healthy Korean male subjects: a single-dose, randomized, open-label, 2-sequence, 2-period crossover study. *Clin Ther.* 2011;33(7):965-972.
223. Moghadam SH, Saliyaj E, Wettig SD, Dong C, Ivanova MV, Huzil JT, Foldvari M. Effect of chemical permeation enhancers on stratum corneum barrier lipid organizational structure and interferon alpha permeability. *Mol Pharm.* 2013;10(6):2248-2260.
224. Chen D, Xia D, Li X, Zhu Q, Yu H, Zhu C, Gan Y. Comparative study of Pluronic((R)) F127-modified liposomes and chitosan-modified liposomes for mucus penetration and oral absorption of cyclosporine A in rats. *Int J Pharm.* 2013;449(1-2):1-9.
225. Sonvico F, Clementino A, Buttini F, Colombo G, Pescina S, Staniscuaski Guterres S, Raffin Pohlmann A, Nicoli S. Surface-Modified Nanocarriers for Nose-to-Brain Delivery: From Bioadhesion to Targeting. *Pharmaceutics.* 2018;10(1).
226. Giuliano E, Paolino D, Fresta M, Cosco D. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. *Pharmaceutics.* 2018;10(3).
227. Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(2):158-171.
228. Eckland D, Danhof M. Clinical pharmacokinetics of pioglitazone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2000;108(Suppl 2):S234-S242.

229. Osborne DW, Musakhanian J. Skin Penetration and Permeation Properties of Transcutol(R)-Neat or Diluted Mixtures. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(8):3512-3533.
230. Feng Y, He H, Li F, Lu Y, Qi J, Wu W. An update on the role of nanovehicles in nose-to-brain drug delivery. *Drug Discov Today*. 2018;23(5):1079-1088.
231. Wengst A, Reichl S. RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;74(2):290-297.
232. Clementino A, Batger M, Garrastazu G, Pozzoli M, Del Favero E, Rondelli V, Gutfilen B, Barboza T, Sukkar MB, Souza SA, Cantu L, Sonvico F. The nasal delivery of nanoencapsulated statins - an approach for brain delivery. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:6575-6590.
233. Kelleher M, Dunn-Galvin A, Hourihane JO, Murray D, Campbell LE, McLean WH, Irvine AD. Skin barrier dysfunction measured by transepidermal water loss at 2 days and 2 months predates and predicts atopic dermatitis at 1 year. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):930-935 e931.
234. Gardien KL, Baas DC, de Vet HC, Middelkoop E. Transepidermal water loss measured with the Tewameter TM300 in burn scars. *Burns*. 2016;42(7):1455-1462.
235. Sator PG, Schmidt JB, Honigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48(3):352-358.
236. Choi EH, Man MQ, Wang F, Zhang X, Brown BE, Feingold KR, Elias PM. Is endogenous glycerol a determinant of stratum corneum hydration in humans? *J Invest Dermatol*. 2005;125(2):288-293.

237. Godwin D, Kim N, Felton L. Influence of Transcutolw CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002;53(1):23-27.
238. Xu XT, Mou XQ, Xi QM, Liu WT, Liu WF, Sheng ZJ, Zheng X, Zhang K, Du ZY, Zhao SQ, Wang SH. Anti-inflammatory activity effect of 2-substituted-1,4,5,6-tetrahydrocyclopenta[b]pyrrole on TPA-induced skin inflammation in mice. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26(21):5334-5339.
239. Esterson Y, Zhang K, Koppaka S, Kehlenbrink S, Kishore P, Raghavan P, Roger S, Carey M, Hawkins M. Insulin sensitizing and anti-inflammatory effects of thiazolidinediones are heightened in obese patients. *J Investig Med.* 2013;61(8):1152-1160.
240. Lin ZM, Ma M, Li H, Qi Q, Liu YT, Yan YX, Shen YF, Yang XQ, Zhu FH, He SJ, Tang W, Zuo JP. Topical administration of reversible SAHH inhibitor ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in mice via suppression of TNF-alpha/IFN-gamma-induced inflammatory response in keratinocytes and T cell-derived IL-17. *Pharmacol Res.* 2018;129:443-452.
241. Moner V, Fernandez E, Calpena AC, Garcia-Herrera A, Cocera M, Lopez O. A lamellar body mimetic system for the treatment of oxazolone-induced atopic dermatitis in hairless mice. *J Dermatol Sci.* 2018;90(2):172-179.
242. Yeom M, Kim SH, Lee B, Han JJ, Chung GH, Choi HD, Lee H, Hahm DH. Oral administration of glucosylceramide ameliorates inflammatory dry-skin condition in chronic oxazolone-induced irritant contact dermatitis in the mouse ear. *J Dermatol Sci.* 2012;67(2):101-110.
243. Milam EC, Jacob SE, Cohen DE. Contact Dermatitis in the Patient with Atopic Dermatitis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7(1):18-26.

244. Lee JH, Choi CS, Bae IH, Choi JK, Park YH, Park M. A novel, topical, nonsteroidal, TRPV1 antagonist, PAC-14028 cream improves skin barrier function and exerts anti-inflammatory action through modulating epidermal differentiation markers and suppressing Th2 cytokines in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2018.
245. Bhattacharya N, Sato WJ, Kelly A, Ganguli-Indra G, Indra AK. Epidermal Lipids: Key Mediators of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *Trends Mol Med.* 2019;25(6):551-562.
246. Jensen JM, Folster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, Schutze S, Proksch E. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2004;122(6):1423-1431.
247. Proksch E, Folster-Holst R, Jensen JM. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci.* 2006;43(3):159-169.
248. De Vry CG, Valdez M, Lazarov M, Muhr E, Buelow R, Fong T, Iyer S. Topical application of a novel immunomodulatory peptide, RDP58, reduces skin inflammation in the phorbol ester-induced dermatitis model. *J Invest Dermatol.* 2005;125(3):473-481.
249. Chen S, Bhushan B. Nanomechanical and nanotribological characterization of two synthetic skins with and without skin cream treatment using atomic force microscopy. *J Colloid Interface Sci.* 2013;398:247-254.
250. Mizuno K, Morizane S, Takiguchi T, Iwatsuki K. Dexamethasone but not tacrolimus suppresses TNF-alpha-induced thymic stromal lymphopoietin expression in lesional keratinocytes of atopic dermatitis model. *J Dermatol Sci.* 2015;80(1):45-53.

251. Danso MO, van Drongelen V, Mulder A, van Esch J, Scott H, van Smeden J, El Ghalbzouri A, Bouwstra JA. TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *J Invest Dermatol.* 2014;134(7):1941-1950.
252. Lee EG, Mickle-Kawar BM, Gallucci RM. IL-6 deficiency exacerbates skin inflammation in a murine model of irritant dermatitis. *J Immunotoxicol.* 2013;10(2):192-200.
253. Navarini AA, French LE, Hofbauer GF. Interrupting IL-6-receptor signaling improves atopic dermatitis but associates with bacterial superinfection. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(5):1128-1130.
254. Bernardi DS, Pereira TA, Maciel NR, Bortoloto J, Viera GS, Oliveira GC, Rocha-Filho PA. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. *J Nanobiotechnology.* 2011;9:44.
255. Kant V, Gopal A, Kumar D, Gopalkrishnan A, Pathak NN, Kurade NP, Tandan SK, Kumar D. Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta Histochem.* 2014;116(1):5-13.
256. Sosa L, Calpena AC, Silva-Abreu M, Espinoza LC, Rincon M, Bozal N, Domenech O, Rodriguez-Lagunas MJ, Clares B. Thermoreversible Gel-Loaded Amphotericin B for the Treatment of Dermal and Vaginal Candidiasis. *Pharmaceutics.* 2019;11(7).



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA