



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUNA

**Gaixotasun degeneratiboe-
tarako terapia geniko ez-birala,
eman bide ez-inbaditzaileak
erabiliz,**

*I. Villate, J. Zarate, G. Puras, M.
Agirre, E. Ojeda eta J. L. Pedraz*

779-783 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.108>

ANTOLATZAILEA:



udako
euskal unibertsitatea

BABESLEAK:



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



BFA
DFB
Bizkaiko Foru Aldundia
Diputación Foral de Bizkaia

eman ta zabal zazu



UPV EHU

LAGUNTZAILEAK:



Deusto
Universidad de Deusto
Deustuko Unibertsitatea



MONDRAGON
UNIBERTSITATEA



UDALBILTZA



upna
Universidad
Pública de Navarra
Nafarroako
Unibertsitate Publikoa

Gaixotasun neurodegeneratiboetarako terapia geniko ez-birala, eman bide ez-inbaditzaileak erabiliz

Villate I, Zarate J, Puras G, Agirre M, Ojeda E, Pedraz JL.
NanoBioCel taldea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Vitoria-Gasteiz.
joseluis.pedraz@ehu.eus

Laburpena

Alzheimer gaitza da neuroendekapenezko gaixotasun ugariena adineko pertsonen artean, eta gaur egun ez dago horri aurre egiteko tratamendu eraginkorrik. Hala ere, zientzia komunitatea estrategia itxaropentsuak ari da garatzen, eta horietako bat da faktore neurotrofiko eta angiogenikoen erabilera. Faktore horiek terapia genikoaren bidez garuneko zeluletan txerta daitezke tokiko ekoizpen iraunkorra lortzeko. Bektore ez-biralak aukera egokia izan daitezke interesatzen zaizkigun faktoreak kodifikatzen dituzten plasmidoak garunera bideratu eta bertako zelulak transfektatzeko. Gainera, berriki argitaratutako datuek iradokitzen dute bektore ez-biralak sudur barneko bidetik (eman bide ez-inbaditzailetik) helarazi daitezkeela garunera. Beraz, eskuartean dugun proiektuak bide berritzaile eta itxaropentsua eskaintzen du Alzheimerren aurkako tratamenduen ikerketan aurrera egiteko.

Hitz gakoak: terapia geniko, bektore ez-biral, eman bide ez-inbaditzaile, Alzheimer, neuroendekapen.

Abstract

Alzheimer disease (AD) is the most extended neurodegenerative disorder among old-aged people, and no effective treatments exist so far. However, the scientific community is currently developing some promising approaches to target AD, and one major strategy involves the use of neurotrophic and angiogenic factors that can be internalized in neurons for a local and sustained expression. Non-viral vectors have the potential to carry plasmids codifying the factors of interest into the brain and to transfect cerebral cells. Moreover, recent evidence suggests that non-viral vectors can be administered intranasally to target the central nervous system, which constitutes a non-invasive route of administration. Therefore, the present project provides an innovative and promising approach to address AD, as well as other neurodegenerative disorders.

Keywords: gene therapy, non-viral vector, non-invasive route, Alzheimer disease, neurodegenerative.

1. Sarrera eta motibazioa

Zahartzaroari lotutako gaixotasunak arazo larria dira herrialde garatuetako osasun sistementzat. Bizi-itxaropenaren luzapenaren ondorioz, nerbio sistema zentralari (NSZri) eragiten dioten gaixotasunek gora egin dute nabarmen azken urteetan. Horien artean, gaixotasun neurodegeneratiboentzat -adibidez, Alzheimerra, Parkinsona edo Huntingtona bezalako gaitzentzat- tratamendua bilatzea aparteko erronka bilakatu da. Neuroendekapenezko gaitzek funtzio neurologikoak gutxitzen dituzte eta, askotan, nerbio-zelulen heriotza ere eragiten dute. Oraindik ez dira zehatz ezagutzen gaitz horiek eragiten dituzten mekanismo molekularrak, eta oraingoz ez da behin betiko tratamendu terapeutiko eraginkorrik lortu [1]. Gaixotasun neurodegeneratiboen %60 Alzheimerri dagokio, osasungintzan eta gizartean, orokorrean, horrek dakarren kostuarekin. Gainera, Alzheimerren intzidentziak gora egiten jarraitzekotan, arazoa larriagotu egingo da datozen urteetan.

Beraz, Alzheimerri eta gainontzeko eritasun neurodegeneratiboei aurre egiteko estrategien ikerketak garrantzi handia du gaur egun. Gaitz horien progresioa eten edo murriztuko lukeen medikamentu baten aurkikuntzak, diagnostiko goiztiarrarekin batera, onura handiak ekarriko lituzke bai gaitzak jota dauden pertsonentzat eta baita osasun- eta gizarte- sistemarentzat ere.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

NSZri eragiten dioten gaixotasunei aurre egiteko medikamentuen garapenak hainbat zailtasun biltzen ditu. Aipagarriena hesi hematoentzefalikoa (HHE) da zalantzarik gabe, farmakoan %98ari sarrera oztopatzen baitio. Arazo horri aurre egiteko hainbat estrategia ikertu dira. Esate baterako, substantzia terapeutikoak NSZra bideratu daitezke HHEko zelulekin interakzionatzen duten nanopartikulak erabiliz. Horrela, farmako nanoenkapsulatuek HHE gaindi dezakete garunaren funtzio normala kaltetu gabe [2]. Nahiz eta arlo horretan aurrerapenak egin diren, zain barnetik emandako nanopartikulen oso portzentaje txikia iristen da garunera (%3 inguru).

Gure ikerketa taldeak urteak daramatza gaixotasun neurodegeneratiboei aurre egiteko tratamenduen ikerketan, eta garrantzi handia eman zaio kapsularatutako faktore trofikoak eta angiogenikoak garun kortexera eta garuneko parenkimara helarazteari [3.4]. Faktore neurotrofiko eta angiogenikoak modu seguruan garunera bideratzeko, nahiz eta oraindik munduan ikerketa ezagutzen diren, bektore ez-biraletan (nanopartikuletan) oinarritutako terapia genikoa aukera aproposa izan daiteke. Bestalde, eman bide ez-inbaditzaileen ikerketak interes handia piztu du, tratamendu erosoagoak lortze aldera. Dagoeneko ikertzaile batzuek argitaratu dituzte zenbait emaitza sudurretik abiatuta eta nanopartikulak erabilia farmakoak garuneraino bideratzea posible dela frogatzen dutenak. Hala ere, ez da oraindik sudur barnetik NSZrako terapia geniko eraginkorrik lortu. Beste eman bideetatik baino, errazago gainditu daiteke HHE sudur barnetik. Ondorioz, eman bide egokia izan daiteke terapia geniko ez-biralaren bitartez gaixotasun neurodegeneratiboen tratamendurako [7].

Proiektu honetan, VEGF faktore angiogenikoa hautatu dugu Alzheimerraren terapia genikoa bideratzeko. Gure helburua da garuneko zeluletan VEGF produzitzen duen genea txertatzea, faktore hori kantitate handiagotan ekoiztu dadin garunean. VEGF faktoreak odol-hodien sorrera, angiogenesisia, eragiten du eta beta-amiloide plakak (Alzheimer gaixotasunaren sintomen erantzule nagusiak direnak) gutxitzen laguntzen du. Aurretik egindako ikerketetan efektu onuragarriak lortu dira VEGF eman zaien Alzheimer animalia ereduetan. Ikerketa horietan, faktorea zuzenean txertatu da garunean. Gure estrategia, aldiz, sudur barnetik administratu ostean garuneko zeluletan VEGF kodifikatzen duen genea transfektatzea da, faktorea garunean bertan behin eta berriro produzitua izateko aukera ematen duelako eta, horrela, eman beharreko dosiak gutxituko lirakeelako.

Doktoretza-tesiaren helburu orokorra faktore neurotrofikoak eta angiogenikoak (batez ere VEGF faktore angiogenikoa) kodifikatzen dituzten plasmidoak garuneraino garraiatuko dituzten bektore ez-biralen garapena da. Bektoreak sudurretik emanda Alzheimerrarentzako tratamendua garatu nahi da.

Bestalde, proiektuaren helburu espezifikoak honakoak dira:

- 1) Niosometan oinarritutako bektore ez-biralen garapena, sudur barnetik emandako bektoreek faktore neurotrofikoak eta angiogenikoak kodifikatzen dituzten plasmidoak garunera garraiatu ditzaten.
- 2) Nioplexoen -niosomak eta plasmidoak elektrostatikoki elkartuta eratutako nanopartikulen- karakterizazio fisiko-kimikoa burutzea eta egokien aukeraketa egitea.
- 3) Nioplexoen transfekzio efizientzia eta ekoiztiko faktoreen bioaktibitatea *in vitro* aztertzea.
- 4) Esperimentazio animalien garunean biodistribuzio eta eraginkortasun entseguak egitea formulazioak sudur barnetik administratu ostean.
- 5) Alzheimer animalia ereduetan nioplexo optimizatuen eraginkortasun terapeutikoa *in vivo* aztertzea.

3. Ikerketaren muina

Proiektua hasi berria denez, atal honetan doktoretza-tesiaren proiektuan jarraituko den metodologia eta lan plangintza azaltzen da. Helburuei jarraituz, proiektu honen lan plangintza bost fasetan banatzen da.

3.1 Nioplexoen prestaketa eta karakterizazioa

Lehen fase honetan, lehenik eta behin terapia geniko ez-biralerako *niosoma* eta *nioplexoen* elaborazio metodoa definituko dugu.

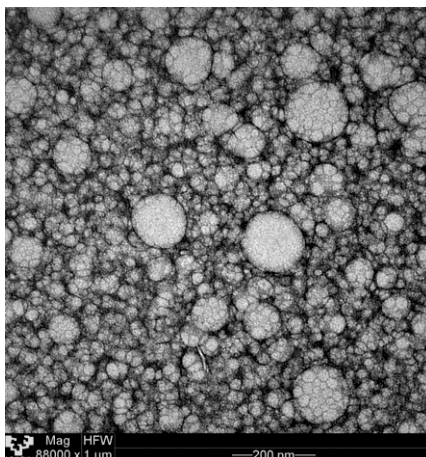
Niosomak karga positibodun besikula lipidikoak dira, eta bi mintzeko egitura dute. Niosomak farmakoak garraiatzeko erabiltzeaz gain, terapia genikoan, bektore ez-biral gisa, geneak garraiatzeko ere erabiltzen dira. Niosomen formulazioak hiru elementu nagusiz osatuta daude: surfaktante ez inoniko bat (esate baterako, polisorbatoa, sorbitano esterrak, etab.), lipido laguntzailea edo *helper* lipidoa (adibidez, kolesterola, eskualenoa, etab.) eta lipido kationikoa (formulaziorik karga positiboa ematen diona. Esate baterako, DOTMA, DOTAP. etab.)) [8]. Niosomen formulaziorik material genetikoaren eranstean (interesatzen zaigun transgenea daraman DNA molekula, hau da, gure kasuan, VEGF faktorearen genea daraman DNA molekula), nioplexoak sortzen dira. Beraz, niosoma besikula lipidikoa edo bektore hutsa da, eta, nioplexoa, berriz, DNA molekula daukan niosoma.

Niosoma eta nioplexoen elaborazio prozesua ondo definituta dago gure ikerketa taldean, eta hainbat etapa biltzen ditu. Niosomak prestatzeko, alde batetik fase organikoa eta, bestetik, fase urtsua prestatuko ditugu eta, ondoren, bi faseak batu eta sonikatu egingo ditugu, emultsioa eratzeko. Fase organikoan lipido kationikoa eta lipido laguntzailea (edo *helper* lipidoa) disolbatuko ditugu disolbatzaile organiko bat (diklorometanoa) erabiliz. Fase urtsuan, berriz, ur distilatuan aukerako substantzia surfaktantea disolbatuko dugu. Bi faseak prest ditugunean, nahastu egingo ditugu eta sonikatu minutu batez. Azkenik, formulazioak irabiagailuan utziko ditugu bi orduz, diklorometanoa guztiz lurrundu dadin eta arrastorik utz ez dezan. Pausu hori oso garrantzitsua da, diklorometanoa oso toxikoa baita gure zelulentzat.

Behin niosomen formulazioak prest edukita, DNA molekulak lotuko dizkiegu. Niosoma eta DNA proportzio ezberdinak prestatu behar izaten dira, entsegu bakoitzak proportzio jakin bat eskatzen baitu.

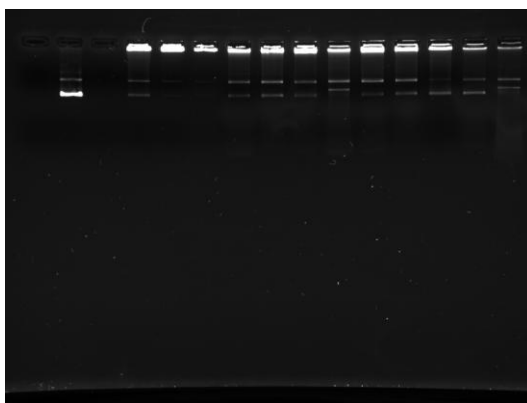
Jarraian, niosomak eta nioplexoak fisiko-kimikoki karakterizatuko ditugu. Tamaina eta karga neurtzeko, *Dynamic Light Scattering (DLS)* teknikan oinarritzen den *ZetaSizer* izeneko aparatu bat erabiliko dugu. *In vitro* entseguak egin nahi diren zeluletan ahalik eta nanopartikula gehien sartzeko tamaina egokiko niosomak lortzea da helburua. Horrez gain, niosomek karga positiboa izatea garrantzitsua da; batetik, niosomen formulazio zenbat eta positiboagoa izan egonkorragoa delako, eta bestetik, karga negatiboa duen DNAr lotu ahal izateko. Indar elektrostatikoz bidez lotzen dira niosomak eta DNA molekulak nioplexoak eratzeko. Bukaerako nioplexoen tamainak eta kargak ere garrantzi handia daukate zelulan barneratu daitezen. Normalean, nahiz eta zelula motaren arabera izan, 100 nm inguruko partikula positiboak lortzen saiatzen gara zelulan barneratze gaitasuna altua izan dadin. Niosoma eta nioplexoen morfologia ikertzeko, transmisio bidezko mikroskopia elektronikoa (TEM) erabiliko dugu (1. Irudiak niosoma emultsio baten TEM bidezko argazkia erakusten du).

1. Irudia. TEM bidezko nanopartikula emultsioaren argazkia.



Gainera, elektroforesi tekniken bitartez, garatutako nanopartikulek DNA molekulak degradazio entzimatikotik babesteko, lotuta mantentzeko eta behar den unean askatzeko duten gaitasuna aztertuko ditugu (2. Irudiak elektroforesiaren bidez gelean lortutako emaitzak erakusten ditu).

2. Irudia. Elektroforesi bidez ateratako gelaren argazkia.



Bestalde, niosomen formulazioa oso ezegonkorra denean edo 100 nm baino txikiagoak diren niosomak egin nahi ditugunean, presio altuko *Microfluidics* homogenizatzailea erabiliko dugu. Partikulen tamaina txikitzea interesgarria da sudur barneko eman biderako, mukosatik xurgatzen diren partikulak zenbat eta txikiagoak izan, orduan eta hobeto barneratuko baitira.

Azkenik, gure taldean liofilizazio teknikan esperientzia handia dugunez, nanopartikulak hauts bihurtu eta denbora luzez modu egonkorrean mantentzeko niosomen formulazioak liofilizatzen saiatuko gara.

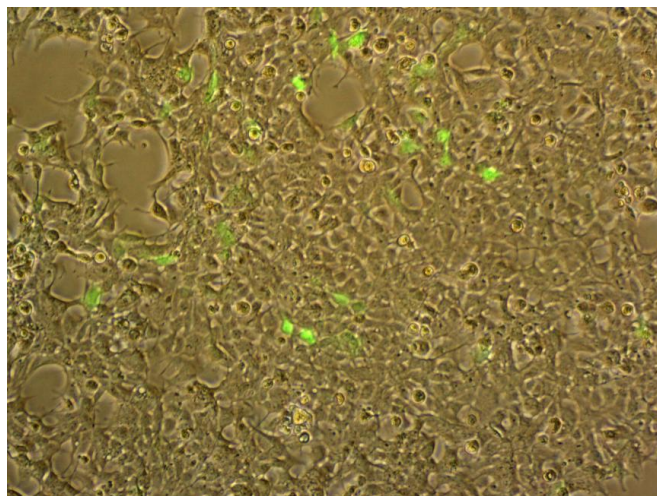
3.2 Eraginkortasun eta bioaktibitate entseguak

Bigarren fase honetan, lehenik eta behin nioplexoek garuneko zeluletan (neuronetan eta glia zeluletan) transfektatzeko duten gaitasuna ikertuko da. Horretarako, gene terapeutikoarekin (gure kasuan VEGF) batera proteina berde fluoreszentea (GFP) sortzen duten plasmidoak erabiliko dira. GFPak zelulen barnean fluoreszentzia berdea eragiten du eta fluxu zitometria bidez neurtu daiteke. Geneak transfektatzea lortzen bada bi proteinak (GFP eta VEGF) batera sortzen direnez, fluoreszentzia berdearen presentziak zeluletan bi faktoreak produzitu direla adierazten du. Hala ere, gene terapeutikoaren produkzioa zuzenean egiaztatzea beharra dago. Horretarako, hainbat teknika erabiliko dira: PCR (VEGFren RNA mezularia detektatzeko),

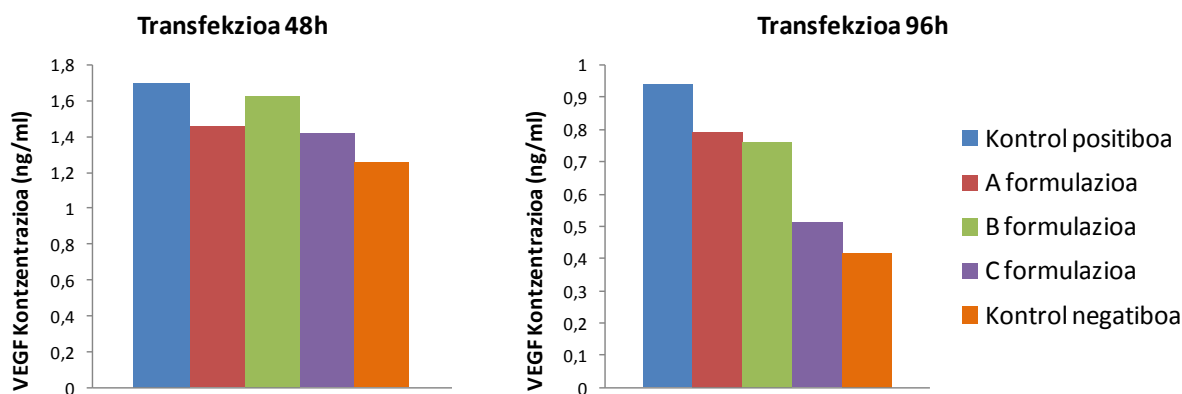
Western Blot (antigorputz espezifikoek bidez VEGF detektatzeko) eta ELISA (antigorputzen espezifikoek bidez, VEGF detektatzeko).

Orain arte, gure laborategiko neuroendekapenezko gaixotasunen ikerketa lerroan soilik GFP ekoizten duten plasmidoak erabili izan dira, eta pausu handia da guretzat GFPaz gain faktore terapeutikoa kodifikatzen duten plasmidoekin lanean hasia. GFP plasmidoak begiko gaitzetarako terapia genikoan erabili ditugu aurretik, eta transfekzio maila altuak lortu ditugu *in vitro* eta *in vivo* entseguetan (3. Irudiak HEK zeluletan –transfektzioetan zelula-eredu gisa erabiltzen diren giltzurrunetik eratorritako zeluletan- egindako entseguaren emaitza erakusten du. Fluoreszentzia berdea antzeman daiteke zeluletan, transfekzioa era egokian egin den seinale). Plasmido berriarekin egin ditugu atariko zenbait entsegu *in vitro*, erretinako ARPE zelulak erabilita. Emaitza positiboak lortu ditugu entsegu horietan, bi proteinak (GFP eta VEGF) espresatzea lortu baitugu (4. Irudian VEGF faktorearen presentzia detektatzeko egindako ELISA entseguaren emaitzak erakusten dira grafikoki).

3. Irudia. Transfektzioa HEK zeluletan GFP plasmidoa erabilita.



4. Irudia. VEGF detektatzeko ELISA entseguaren emaitzak.



4. Irudia. ELISA entsegu honetan GFP eta VEGF faktoreak kodifikatzen dituen plasmidoa erabili zen ARPE zelulak (erretinako zelulak) transfektatzeko. Plasmidoak zeluletara garraiatzeko, gure taldean garatutako 3 formulazio ezberdin erabili genituen (A-C formulazioak). Hirurak nioplexoak dira, baina lipido kationiko eta *helper* lipido ezberdinez osatuta daude. Kontrol positiboa *Lipofectaminari* dagokio, transfekzio maila altua lortzen duen lipido kationiko komertziala. Kontrol negatiboa, berriz, transfektatu gabeko zelulek osatzen dute. VEGFren produkzioa zeluletan transfekzioa egin ondoren 48 eta 96 orduetara neurtu genuen. Grafikotik ikusten denez, transfektatu gabeko zeluletan ere antzematen da VEGF faktorea, gure zelulek berez ere ekoizten baitute. 96 orduetara A eta B formulazioek lortu dute transfekzio mailarik altuena, horiek garraiatu dute, beraz, plasmido gehien zeluletara. Zelulak gai izan dira, formulazio guztietan, plasmidoak kodifikatutako VEGF faktorea ekoizteko.

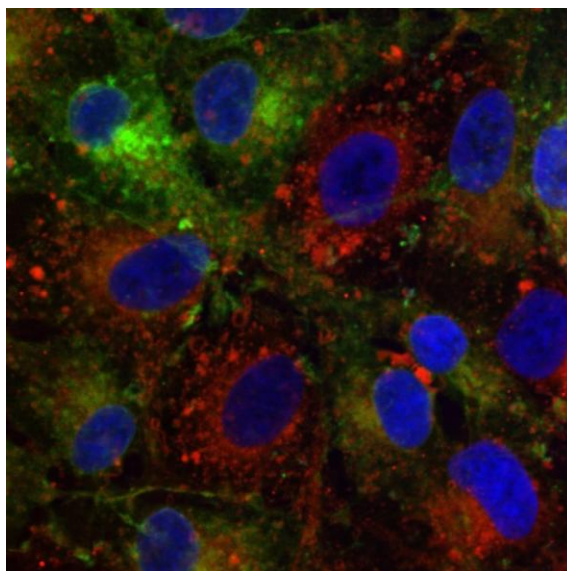
Jarraian, plasmido terapeutikoen faktoreen bioaktibitate entseguak egingo ditugu. Sortutako faktoreak zeluletan aktibitate biologikoa daukan edo ez frogatuko da. Izan ere, gerta daiteke nioplexoen elaborazio prozesuan zehar plasmidoaren egitura kaltetzea eta, ondorioz, horrek sortutako faktoreek aktibitatea galtzea.

Azkenik, zitotoxizitate entseguak egingo ditugu, gure formulazioek zelulen bideragarritasunean duten eragina aztertzeko. Horretarako, CCK8 entsegua egingo dugu.

3.3 Plasmidoaren barneratze entseguak

Hirugarren fasean fluoreszeina isoizianatoz (FITC) markatutako plasmidoak erabiliko ditugu. FITCekin markatutako plasmidoa barneratu duten zelulen portzentajea eta igorritako fluoreszentiaren intentsitatearen batzbestekoa neurtuko ditugu zitometria bidez. Gainera, zelulen endozitosi (barneratze) bideak markatzaile fluoreszenteekin markatuko ditugu eta, plasmidoaren eta sarrera bideen arteko kolokalizazioa kuantifikatuz, gure partikulak gehien erabiltzen duen sarbidea zehaztuko dugu (5. Irudiak gure laborategian formulazio polimeriko batekin NT2 zeluletan –neuronen prekursorak diren zeluletan- lortutako kolokalizazioa erakusten du; urdinez, zelulen nukleoak ageri dira, gorriz, plasmidoa garraiatzen duten nanopartikulak eta, berdez, zelularen klatrina bidezko sarbidea). Kolokalizazioa kuantifikatzeko Mandersen koefizientea kalkulatzeko programa informatikoa (*ImageJ version 2.0.0*) erabiltzen dugu laborategian (kolokalizazio portzentajea adierazten du).

5. Irudia. Kolokalizazio entsegua NT2 zeluletan.



3.4 Faktore trofikoek garunean duten distribuzioaren analisisia

Atal honetan, gure formulazioak garunera iristeko sudur barnetik eman ostean, horiek ekoizten dituzten faktoreak garuneko zein eremutan antzematen diren ikertuko dugu. Formulazioak sudur barnetik emateko, saguak Isoflorano izeneko anestesia arin batekin lokartzen dira, eta 10 mikrolitroko pipeta baten bidez ematen dira formulazioak pixkanaka. Normalean, 4 mikrolitro ematen dira aldi bakoitzean, sudurzuloak txandakatuz eta administrazioen artean denbora tarte laburra utziz (minutu bat). Dosi egokira iristeko, hainbat egunetan zehar errepikatu behar izaten dira administrazioak, egun bakoitzean sagu bakoitzari gehienez 25 mikrolitroko bolumena eman ahal zaiolako.

Formulazioak garunera iritsi direla jakiteko eta garuneko zeluletan nanopartikulek garraiatutako geneak espresatu direla ziurtatzeko, saguen garunak aztertu beharra dago. Horretarako, animaliak perfusio bidez sakrifikatu behar dira, teknika horren bidez gorputzeko

ehunak garbitu edota fixatu egin daitezkelako, beharraren arabera. Perfusioa egin ostean, garunen estrakzioa egin behar da analizatu ahal izateko. Garunak teknika ezberdinen bidez aztertuko ditugu: fluxu zitometria (fluoreszentzia berdea duten zelulen portzentajea aztertzeko), immunohistokimika, PCR, Western Blot eta ELISA. Proba horiek guztiak baliagarriak dira sudur baretik administratutako nioplexoei NSZean duten transfekzio gaitasuna ebaluatzeko.

3.5 Sudurretik barneratutako nioplexoei Alzheimer animalia ereduan duten eragin terapeutikoaren azterketa

Formulazioak optimizatu, NSZera iristeko duten ahalmena aztertu eta bertan faktore aktiboak sortzeko gaitasuna ikertu ostean, azken atal honetan formulazio horien eraginkortasun terapeutikoa ikertuko da Alzheimer animalia eredu batean (APP/Ps1). Horretarako, animalien portaera testak egingo dira, esate baterako, T-maze esplorazio joera neurtzeko, eta objektuen ezagutze testa epe laburreko memoria neurtzeko. Bestalde, atal honetan immunohistokimika entseguak ere egingo dira garunean transfekzio maila aztertzeko, eta baita odol-hodi berrien sorrera, plaka amiloideen presentzia, tau proteina hiperfosforilatuen maila eta kaspasen (zelulen heriotzaren markatzaileen) presentzia neurtzeko ere. Alzheimer eredu animalien portaera ikerketak Madrilgo Instituto de investigación Hospital 12 de Octubre zentroko neurozientzia taldearekin dugun kolaborazioari esker bideratuko ditugu.

4. Ondorioak

Proiektu honetan estrategia berritzaile gisa sudur barneko eman bidea aurkezten da, neuroendekapenezko gaixotasunentzat nioplexoz osatutako bektore ez-biraletan oinarritutako terapia genikoa garatzeko. Terapia genikoan sudurreko eman bidearen ikerketak hastapenetan daude oraindik, baina badira bide horren egokitasuna eta baliagarritasuna iradokitzen duten hainbat ikerketa. Garuneko gaitzak tratatzeko, aukera aproposa izan liteke eman bide hori, HHE gaintzea ahalbidetzen duelako eta, beste eman bide batzuekin alderatuz, ez-inbaditzailea delako. Bestalde, terapia genikoan bektore ez-biralak erabiltzea erronka handia da, birusek baino transfekzio efizientzia txikiagoa erakusten dutelako. Hala ere, bektore ez-biralak seguruagoak dira eta, gainera, azido nukleiko molekula handiagoak garraiatzeko ahalmena dute, errazagoak dira produzitzeko eta kostua baxuagoa da. Beraz, transfekzio efizientzia hobetzea lortuta, bektore ez-biraletan oinarritutako terapia genikoa oso baliagarri gerta daiteke era askotako gaixotasunen plataforma terapeutikoa eraikitzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Aurreko atalean aipatu bezala, bektore ez-biraletan eta eman bide ez-inbaditzaileetan oinarritutako terapia genikoko estrategiak pil-pilean daude ikerketa munduan, eta espero izatekoa da teknika horiek etorkizun oparoa izatea. Proiektu honetan proposatutako helburuak lortzekotan, oso interesgarria litzateke arlo honetan ikerketan jarraitzea, eta Alzheimererako erabilitako plataforma terapeutikoa beste gaixotasun neurodegeneratibo batzuk (Parkinsona, Huntingtonen gaitza, besteak beste) tratatzeko moldatu eta hedatzea.

Bestalde, gorputzeko beste ehun batzuetan eragiten duten gaixotasunentzat ere eman bide ez-inbaditzaileek garrantzi handia hartu dute ikerketa munduan. Esate baterako, begian, erretinako gaixotasunei aurre egiteko, edota biriketako zenbait gaixotasun tratatzeko. Eman bide ez-inbaditzaileek abantaila ugari dituzte eta aipagarrienak gaixoentzako erosotasuna eta zeharkako efektuen gutxitzea dira.

Azkenik, bide luzea dago oraindik bektore ez-biral eraginkorrak eskuragarri izateko. Erronkarik handiena horien transfekzio gaitasuna areagotzea da, eta ikertalde ugari dago gaur egun horretan lanean. Gainera, bektore ez-biral idealaren edo formulazio unibertsalaren kontzeptua bazterrean geratu da, tratamendua eman beharreko gaixotasunaren eta ehunaren arabera ezaugarri ezberdinak izan beharko baitituzte. Beraz, erronka da etorkizunean ehun eta gaixotasun bakoitzera egokitutako formulazio eraginkorrak sortzea, eta eman bide ez-inbaditzaileetarako bideragarriak direnak.

6. Erreferentziak

- 1- Thomas MB, Mansoor MA. (2009): Challenges and opportunities in CNS delivery of therapeutics for neurodegenerative diseases. *Expert Opin Drug Deliv*, 6(3):211–25.
- 2- Denora N, Trapani A, Laquintana V, Lopodota A, Trapani G. (2009): Recent advances in medicinal chemistry and pharmaceutical technology-strategies for drug delivery to the brain. *Curr Topics Med Chem*, 9:182–196.
- 3- Herrán E, Requejo C, Ruiz-Ortega JA, Aristieta A, Igartua M, Bengoetxea H, Ugedo L, Pedraz JL, Lafuente JV, Hernández RM (2014): Increased antiparkinson efficacy of the combined administration of VEGF- and GDNF-loaded nanospheres in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Int J Nanomedicine*, 27;9:2677-87.
- 4- Herrán E, Pérez-González R, Igartua M, Pedraz JL, Carro E, Hernández RM (2013). VEGF-releasing biodegradable nanospheres administered by craniotomy: a novel therapeutic approach in the APP/Ps1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Control Release*, 28;170(1):111-9.
- 5- Harmon BT, Aly AE, Padegimas L, Sesenoglu-Laird O, Cooper MJ, Waszczak BL (2014): Intranasal administration of plasmid DNA nanoparticles yields successful transfection and expression of a reporter protein in rat brain. *Gene Ther*, 21(5):514-21. doi: 10.1038/gt.2014.28. Epub 2014 Mar 27. PubMed PMID:24670994.
- 6- Kim ID, Shin JH, Kim SW, Choi S, Ahn J, Han PL, Park JS, Lee JK. (2012): Intranasal delivery of HMGB1 siRNA confers target gene knockdown and robust neuroprotection in the postischemic brain. *Mol Ther*, 20(4):829-39. doi:10.1038/mt.2011.291. Epub 2012 Jan 17. PubMed PMID: 22252450; PubMed Central PMCID: PMC3321593.
- 7- Jeffrey J. Lochhead, Robert G. Thorne. (2012): Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 614–628.
- 8- Ojeda E1, Puras G, Agirre M, Zárate J, Grijalvo S, Pons R, Eritja R, Martinez-Navarrete G, Soto-Sanchez C, Fernández E, Pedraz JL.(2015) Niosomes based on synthetic cationic lipids for gene delivery: the influence of polar head-groups on the transfection efficiency in HEK-293, ARPE-19 and MSC-D1 cells. *Org Biomol Chem*,13(4):1068-81. doi: 10.1039/c4ob02087a. Epub 2014 Nov 21. PubMed PMID:25412820.

7. Eskerrak eta oharrak

Proiektu honen babesleak dira Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV-EHU, Ikerketa eta Formakuntza Unitatea UFI 11/32), Eusko Jaurlaritza (Doktoreak ez diren ikertzaileak prestatzeko Doktoratu Aurreko Programako laguntza), Espainiako Gobernua (Ministerio de Economía y Competitividad, Programa estatal de investigación, desarrollo e innovación orientada a los retos de la sociedad. Mineco 2013 código SAF2013-42347-R) eta Mexikoko Gobernua (Grant of the National Council of Science and Technology, CONACYT).