



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

**Estudio del transporte de sustancias
a través de la barrera hematoencefálica mediante
el anticuerpo 8D3 dirigido contra
el receptor de transferrina**

Itsaso Cabezón Rodríguez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica

**Estudio del transporte de sustancias a través de
la barrera hematoencefálica mediante el
anticuerpo 8D3 dirigido contra el receptor de
transferrina**

**ITSASO CABEZÓN RODRÍGUEZ
2017**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica

Programa de doctorat:
Recerca, desenvolupament i control de medicaments

Estudio del transporte de sustancias a través de la barrera hematoencefálica mediante el anticuerpo 8D3 dirigido contra el receptor de transferrina

Memòria presentada per **Itsaso Cabezón Rodríguez** per optar al títol de doctor per
la Universitat de Barcelona

Dr. Jordi Vilaplana i Hortensi
(Director)

Dr. Antoni Camins Espuny
(Director)

Dra. Carme Pelegrí i Gabaldà
(Tutora)

Itsaso Cabezón Rodríguez
(Doctoranda)

ITSASO CABEZÓN RODRÍGUEZ
2017

*¿Me preguntas por qué compro arroz y flores? Compro arroz para vivir y flores
para tener algo por lo que vivir
(Confucio 孔子)*

A mis aitas, Alberto y Eusebi.

Después de tanto tiempo ha llegado el momento. Así pues, aquí me veo escribiendo estas líneas a todas aquellas personas a las que tanto tengo que agradecer.

Vull començar pels meus directors, el Jordi i la Nanen. Tot i que no ha pogut ser de manera oficial, Nanen, he aquí el meu reconeixement personal. En primer lloc, gràcies als dos per haver-me donat l'oportunitat i haver dipositat en mi la confiança per realitzar al vostre grup d'investigació la tesi doctoral. En segon lloc, gràcies per haver-me donat total llibertat per proposar, opinar i experimentar, per haver-me donat llibertat per conèixer el món de la ciència i de la investigació des de la curiositat i les ganes d'aprendre. I finalment, gràcies pel suport incondicional durant tots aquests anys, plens d'alts i baixos, però sobretot molt positius.

Al Toni, gràcies per haver-me donat l'oportunitat de gaudir d'una beca durant gran part de la tesi i la motivació que això suposa; per donar-me l'oportunitat de formar part de la plantilla docent de la secció de Farmacologia, i poder aprendre tant de la farmacologia i l'ensenyament.

Als meus companys de laboratori. Gemma, gràcies per ensenyar-me com funciona un laboratori, per escoltar-me i donar-me bons consells, per les rialles i els bons records dels congressos. Gràcies de tot cor! Eli, gràcies pel teu suport i companyia durant l'última fase de la meva tesi, per estar sempre disposada a ajudar-me i pels bons moments al lab. Gràcies! El Quim i el Jaume, tot i no haver coincidit gairebé en el temps, tots feu del grup BHE un grup del que estic contenta de formar part.

Profesores, becarios y estudiantes del departamento de Fisiología. Gracias por hacer del departamento un lugar de trabajo tan agradable. Gracias David y Vanesa, por vuestra cercanía y por ayudarme a resolver problemas de gestión que me han traído de cabeza. Gracias Montse por enseñarme a hacer esos geles SDS-PAGE tan bonitos. Teresa, Carol, toda la tropa de AiT, Alba, Carmen, Lluisa, Rocío,....¡¡Gracias!!!

A la sección de Farmacología, por acogerme como becaria y enseñarme el mundo de la docencia. A los becarios y predocs de Farma, Miren, David, Christian, Oriol, Miguel por anticuerpos, momentos y risas compartidas.

Al CCiT de microscopía electrónica, Carmen, Gema y Yolanda. Gracias por enseñarme el mundo de la microscopía electrónica, un mundo apasionante.

Ian, Ali, thanks a lot for your kindness and hospitality, for giving me the opportunity to use the SBF-SEM, such an amazing machinery! Jewles, Aitor, Diego, Michela, Danilo, thanks a lot for those brief but good times together in Liverpool!! You made me feel really comfortable during my stay!

Donostiko kuadrila eta lagun guztiei: txiki-txikitatik elkarrekin hazi eta heldu bihurtu garelako, hainbeste bizipen gure bizitza osoan zehar elkarbanatu izanagatik, eta beste hainbeste elkarrekin bizitzeko geratzen zaizkigulako, eskerrik asko beti hor egoteagatik, bihotz bihotzez!! Laida, Sara, Maddi, Ioana, Yune, Elisa, Lide, Karmele, Lier, Haizea, Amaia, Klara, Titi.....danoi, gora zuek!!!!

A Barcelona, mi segunda familia, amigos y personas especiales, a los que estáis y ya no estáis aquí. Saulo, Raquela, Andre, Yoli, Marta, Marizza, Arni, Tobi, Eleni, Jaimelo, Joaquín, Charlie, Beto, Pablo A., Murci, Carlos Ávila, Alba, Sarasa, Alfredo, Garbiñe, Paula....y una lista interminable de personas que han estado y están a mi lado, que han vivido de cerca esta tesis. Gracias por todos estos años, intensos, increíbles, inolvidables, insuperables. ¡Por mucho más!

A la gente del máster MDCIF, ¡Gracias por hacerme esta última etapa de la tesis más amena!

A mi familia, tíos, primos y aitonas. ¡Gracias por estar siempre ahí!

Y por último, no puedo evitar emocionarme al escribir este último párrafo, porque esta tesis se la debo a ellos, porque todo se lo debo a ellos, por estar siempre ahí, a mi lado. Esta tesis se la dedico a ellos, a mis Aitas.

Esta tesis ha sido financiada por:

Generalitat de Catalunya

Proyecto 2009 SGR 853

Proyecto 2014 SGR 525

Ministerio de Ciencia e Innovación

Proyecto BFU 2010/22149

Ministerio de Economía y Competitividad

Proyecto BFU 2013-47382-P

Proyecto BFU 2016-78398-P

La doctoranda ha disfrutado de las siguientes ayudas predoctorales durante la realización de esta tesis:

Ajuts de Personal Investigador en Formació (APIF) per alumnes de tercer cicle de la Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

ÍNDICE:

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
1. BARRERAS HOMEOSTÁTICAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	3
2. LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA.....	5
2.1. Historia: observaciones iniciales de la BHE	6
2.2. Estructura de la BHE	7
2.3. Función de barrera de la BHE	9
2.3.1. Barrera física	10
2.3.2. Barrera metabólica	10
2.3.3. Barrera de transportadores activos de eflujo.....	11
2.4. Intercambio de sustancias a través de la BHE	11
2.4.1. Difusión pasiva	12
2.4.2. Transporte de iones	13
2.4.3. Sistemas de transporte transcelular	13
3. SISTEMAS DE TRANSPORTE TRANSCELULAR EN LA BHE	13
3.1. Transporte mediado por transportadores (TMT)	13
3.2. Transporte de macromoléculas	14
3.2.1 TMA.....	15
3.2.2. TMR.....	16
3.2.3. TFF.....	16
4. LA BHE: FACTOR LIMITANTE PARA DISTRIBUIR FÁRMACOS EN EL CEREBRO	17
5. ESTRATEGIAS PARA DISTRIBUIR FÁRMACOS EN EL CEREBRO	18
5.1. Técnicas invasivas	18
5.1.1. Métodos quirúrgicos.....	18
5.1.1.1. Administración intracerebral	19
5.1.1.2. Administración intraventricular/intratecal.....	20
5.1.1.3. Implantes intracerebrales	21
5.1.2. Modificación o disrupción de la BHE	22

5.1.2.1. Disrupción osmótica	22
5.1.2.2. Disrupción bioquímica	22
5.1.2.3. Disrupción por ultrasonido	23
5.2. Técnicas no-invasivas	23
5.2.1. Modificación química del fármaco	23
5.2.2. Administración intranasal	24
5.2.3. <i>Nanocarriers</i>	25
5.2.4. Transporte mediado por vectores moleculares	26
5.2.4.1. Transporte de fármacos mediante TMA	26
5.2.4.2. Transporte de fármacos mediante TMR.....	27
6. VEHICULACIÓN DE SUSTANCIAS A TRAVÉS DEL RECEPTOR DE TRANSFERRINA	29
6.1. Tf y TfR.....	29
6.2. Anticuerpos monoclonales (mAbs)	31
II. OBJETIVOS.....	35
III. RESULTADOS	39
1. ARTÍCULO 1 Study of the transcytosis of an anti-transferrin receptor antibody with a Fab' cargo across the blood-brain barrier in mice.....	41
2. ARTÍCULO 2 Trafficking of gold nanoparticles coated with the 8D3 anti-transferrin receptor antibody at the mouse blood-brain barrier.....	55
3. ARTÍCULO 3 Serial block-face scanning electron microscopy applied to study the trafficking of 8D3-coated gold nanoparticles at the blood-brain barrier.....	69
IV. DISCUSIÓN	83
V. CONCLUSIONS	99
VI. BIBLIOGRAFÍA	103

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1.	Representación esquemática de las barreras homeostáticas presentes en el SNC.....	5
Figura 2.	Experimentos de Edwin Goldmann para demostrar la existencia de la BHE.....	7
Figura 3.	Esquema representativo de los principales componentes celulares y estructuras que forman la BHE.....	8
Figura 4.	Ultraestructura de un capilar cerebral de rata.....	9
Figura 5.	Mecanismos de transporte para el intercambio de sustancias a través de la BHE.....	12
Figura 6.	Representación esquemática de las diferentes técnicas o estrategias desarrolladas para distribuir fármacos en el cerebro.....	19
Figura 7.	Modelo de transporte de fármacos a través del TMR.....	29
Figura 8.	Hipótesis del transporte de hierro mediado por Tf-TfR en el endotelio de la BHE.....	31
Figura 9.	Modelo propuesto de internalización endocítica y procesamiento endosomal del 8D3 en la BHE.....	110

ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>	mAb	<i>monoclonal antibody,</i> anticuerpo monoclonal
ApoE	apolipoproteína E	MET	microscopía electrónica de transmisión
AuNP	<i>gold nanoparticle,</i> nanopartícula de oro	MRP	<i>Multidrug Resistance-</i> <i>associated Protein</i>
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance</i> <i>Protein</i>	OCV	órganos circunventriculares
BHE	barrera hematoencefálica	PC	plexo coroideo
CECC	células endoteliales de los capilares sanguíneos cerebrales	PEG	polietilenglicol
CPP	<i>cell-penetrating peptides</i>	Pgp	glicoproteína-P
DAB	3,3-diaminobenzidina	Qdot	Quantum Dot
DLS	<i>dynamic light scattering,</i> dispersión de luz dinámica	ROI	<i>region of interest,</i> región de interés
DMC	distribución mejorada por convección	SBF-SEM	<i>Serial Block-Face Scanning</i> <i>Electron Microscopy</i>
DMT1	<i>divalent metal transporter 1,</i> transportador de metales divalentes tipo 1	SNC	sistema nervioso central
FIB-SEM	<i>Focused Ion Beam-Scanning</i> <i>Electron Microscopy</i>	TAT	transactivador de transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1)
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate,</i> isotiocianato de fluoresceína	Tf	transferrina
FRET	<i>Fluorescence Resonance</i> <i>Energy Transfer</i>	TFF	transcitosis de fase fluída
HRP	<i>horseradish peroxidase,</i> peroxidasa de rábano	TfR	<i>transferrin receptor,</i> receptor de transferrina
IC	inmunocomplejo	TJ	<i>tight junctions,</i> uniones estrechas
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma</i> <i>Mass Spectrometry</i>	TMA	transporte mediado por adsorción
IGF	<i>insulin-like growth factor,</i> factor de crecimiento de tipo insulínico	TMR	transporte mediado por receptores
IgG	inmunoglobulina G	TMT	transporte mediado por transportadores
i.v.	intravenosa(-mente)	UA	uniones adherentes
JAM	<i>junctional adhesion molecules</i>	UNV	unidad neurovascular
LCR	líquido cefalorraquídeo	VIH-1	virus de la inmunodeficiencia humana
LDL	<i>low-density lipoprotein,</i> lipoproteína de baja densidad	ZO	<i>zonula occludens</i>

ABSTRACT

The blood-brain barrier is a well-coordinated and highly selective barrier whose main function is to regulate brain homeostasis and the transport of endogenous and exogenous compounds between the blood and the brain. It permits the selective brain uptake of nutrients and impedes the entrance of potentially harmful substances and pathogenic organisms into the brain. Due to this restrictive nature of the blood-brain barrier, the transport of neurotherapeutics from the blood to the brain results extremely difficult, and has become a major pharmaceutical challenge in recent decades. Only lipophilic molecules with a molecular weight under a 400-600 Da are able to cross the blood-brain barrier. For this reason, 98% of all small molecule drugs and almost 100% of large molecule drugs are unable to cross the BBB, and hence, most neurological and neurodegenerative diseases currently have few or no treatment options.

During the last decades, numerous strategies have been proposed to overcome the blood-brain barrier and efficiently deliver therapeutic agents to the brain. One of these strategies consists in linking the pharmacologically active substance to a molecular vector that acts as a molecular *Trojan Horse* and is capable of crossing the blood-brain barrier using a receptor-mediated transcellular transport system of the brain capillary endothelial cells. These molecular vectors can be natural ligands, peptides or monoclonal antibodies (mAbs) that bind to a particular receptor and trigger endocytosis or transcytosis processes. Several mAbs directed against the transferrin receptor (TfR), which is abundant in brain capillaries, have been extensively studied. However, there is still no consensus regarding their transcytotic capacity and their ability to transport substances across the blood-brain barrier. Moreover, the intracellular mechanisms that these antibodies or constructs undergo inside the endothelial cells remain unclear.

To gain insight on this strategy, this thesis aimed to study the potential of the 8D3 monoclonal antibody, directed against the murine TfR, to transport substances across the blood-brain barrier in mice.

On this basis, a series of experiments were performed where the 8D3 antibody was conjugated to different cargoes, the resulting constructs were administered *in vivo* to mice, and the distribution and intracellular mechanisms that these constructs undergo at the blood-brain barrier were studied.

Overall results suggest, firstly, that the 8D3 antibody is able to bind to the TfR and trigger endocytosis of the 8D3-TfR complex, but does not complete transcytosis except in rare

occasions. Secondly, the 8D3 antibody is capable of internalizing the conjugated cargo inside the brain capillary endothelial cells through a clathrin-dependent endocytosis process, and hence, of overcoming the first obstacle in the transport across these cells. However, once inside the endothelial cells, the constructs tend to progressively accumulate in mature endosomal structures of large size and great complexity. These results can be mainly explained by the high affinity of the peptidomimetic mAbs for their receptors and their consequent difficulty to dissociate from them. Only a small percentage of the endocytic vesicles fuse with the abluminal membrane and open up to the basal lamina. Thus, in these cases, the constructs complete transcytosis. Nevertheless, they remain attached to the abluminal membrane and never reach the brain parenchyma, probably, in this case as well, because of the high affinity of the 8D3 for the TfR.

Based on this premise, different aspects can be approached regarding the design of the constructs. *Nanocarrier* functionalization, development of acid-cleavable linkages between mAb and cargo, and reducing mAb's affinity for the target receptor are some of the ideas that are currently under development for the optimization of this receptor-mediated transport based strategy to overcome the blood-brain barrier. These aspects are today main focus of research and starting point towards new perspectives.

I. INTRODUCCIÓN

1. BARRERAS HOMEOSTÁTICAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las neuronas del sistema nervioso central (SNC) utilizan una combinación de señales eléctricas (potenciales sinápticos, potenciales de acción) y químicas (neurotransmisores y neuromoduladores) para comunicarse entre sí y procesar la información de manera eficiente, y para ello, es necesario una estricta regulación local del ambiente extracelular alrededor de axones y sinapsis (Abbott, 1992; Hawkins y Davis, 2005; Abbott, 2013). Las concentraciones de iones como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} deben mantenerse en un intervalo de valores muy estrecho. La demanda metabólica, sin embargo, siempre es alta, ya que el SNC consume, solamente en reposo, aproximadamente el 20% del oxígeno y el 25% de la glucosa en humanos (Rolfe y Brown, 1997; Hawkins y Davis, 2005, Zlokovic, 2011). El SNC, además, es muy delicado frente a un gran número de agentes químicos; muchos de ellos los consumimos en nuestra dieta, y aunque se excretan ya metabolizados sin causar daños por sistemas periféricos, pueden ser neurotóxicos (Hawkins y Davis, 2005).

Este microambiente estrictamente controlado, necesario para obtener una correcta señalización neuronal, se consigue gracias a diferentes mecanismos de barrera que ayudan a regular el intercambio de moléculas entre el medio interno del SNC y el resto del cuerpo, y que son resultado de la acción coordinada entre diferentes interfaces celulares que median entre el tejido nervioso, la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Abbott *et al.*, 2006; Strazielle y Gherzi-Egea, 2013). La disfunción de estos mecanismos de barrera contribuye a la patogenia de diferentes condiciones neuropatológicas, desde el traumatismo craneoencefálico hasta las enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, la naturaleza protectora y restrictiva de estos mecanismos ante compuestos tanto endógenos como exógenos, puede generar obstáculos a la hora de administrar agentes diagnósticos o agentes terapéuticos potencialmente beneficiosos en el SNC (de Boer y Gaillard 2007; Saunders *et al.*, 2008).

Existen diferentes tipos de barrera en el SNC. Por un lado están las barreras que separan la sangre y el tejido nervioso, como son la barrera sangre-médula espinal, la barrera sangre-encéfalo o barrera hematoencefálica (BHE), y barreras de zonas más específicas como la barrera hematorretiniana, la barrera sangre-laberinto auditivo y la barrera cerebronasal (Palmer, 2010; Neuwelt *et al.*, 2011; Liddelov, 2011; De Bock *et al.*, 2014).

Existen sin embargo ciertas zonas del SNC que carecen de propiedades de barrera. Los órganos circunventriculares (OCV) son estructuras especializadas que se sitúan alrededor del tercer y el cuarto ventrículo. Tienen una elevada vascularización y no presentan BHE, de modo que son accesibles a trazadores administrados vía intravenosa (i.v.) (Broadwell *et al.*, 1983). Sus capilares son fenestrados, lo que permite la libre difusión entre la sangre y los OCV de las proteínas y solutos que regulan la función cerebral, así como la secreción de hormonas originadas en el encéfalo (Leonhardt, 1980; Cottrell y Ferguson, 2004).

Por otro lado, el SNC cuenta también con barreras que separan la sangre del LCR, como la barrera situada a nivel del plexo coroideo (PC) y la barrera aracnoidea (Saunders *et al.*, 2008). Los PCs se sitúan en la parte superior de los cuatro ventrículos. Son estructuras vellosas que se extienden desde la superficie ventricular al lumen de los ventrículos, y cuya función principal es la producción de LCR (Leonhardt, 1980; Bouchaud y Bosler, 1986; Engelhardt *et al.*, 2001; De Bock *et al.*, 2014). Se componen de una amplia red de capilares fenestrados que se encuentran rodeados por una monocapa de epitelio cúbico, la cual contiene las uniones estrechas (*tight junctions*, TJ) apicales que forman la barrera entre la sangre y el LCR. Estas TJ son diferentes a las presentes en la BHE (Redzic y Segal, 2004), y ligeramente más permeables. Por otro lado, los capilares sanguíneos de la capa duramadre de las meninges son fenestrados y proporcionan poca función de barrera. Las células epiteliales de la capa aracnoidea, sin embargo, están fuertemente unidas entre sí por TJ y proporcionan la barrera física (la barrera aracnoidea) entre el espacio subaracnoideo que contiene LCR y las estructuras externas. Los vasos sanguíneos del espacio subaracnoideo sí que contienen TJ (Gherzi-Egea *et al.*, 1995; Abbott *et al.*, 2010; Neuwelt *et al.*, 2011).

Por último, cabe mencionar la presencia de una barrera fetal entre el parénquima cerebral y el LCR de los ventrículos, comúnmente denominada neuroepéndima fetal. La capa externa que recubre los ventrículos está formada por células endocelulares que constituyen la interfaz entre el LCR y el parénquima cerebral. Durante el desarrollo temprano, esta interfaz desempeña la función de barrera y adquiere el nombre de neuroepéndima. Las células del neuroepéndima están unidas por *strap junctions*, responsables de constituir la barrera física y evitar el paso de sustancias de gran tamaño como las proteínas; moléculas más pequeñas como la sacarosa, en cambio, son capaces de atravesarla (Saunders *et al.*, 2008; Saunders *et al.*, 2013). Durante el desarrollo, las propiedades moleculares y las funciones específicas van cambiando debido al entorno neural y a las propiedades reguladoras propias del desarrollo; las células del neuroepéndima pierden las *strap junctions* intercelulares, perdiendo de esta manera las propiedades de barrera y convirtiéndose en epéndima maduro (Saunders *et al.*, 2008; Neuwelt *et al.*, 2011). Como consecuencia, el epéndima maduro no restringe el intercambio paracelular de moléculas entre el LCR y el fluido intersticial del parénquima cerebral (Saunders *et al.*, 2008).

A nivel encefálico, y particularmente a nivel cerebral, las cuatro barreras homeostáticas principales son la BHE, el plexo coroideo, la barrera aracnoidea y el neuroepéndima fetal (Figura 1) (Liddel, 2011; Strazielle y Gherzi-Egea, 2013). Entre todas estas barreras, la BHE es la más restrictiva, compleja y con mayor superficie para el intercambio de sustancias, siendo por tanto la barrera que mayor control ejerce sobre el medio interno del SNC (Gaillard *et al.*, 2005; Nag y Begley, 2005; Abbott *et al.*, 2006; Neuwelt *et al.*, 2011; De Bock *et al.*, 2014; Keaney y Campbell, 2015).

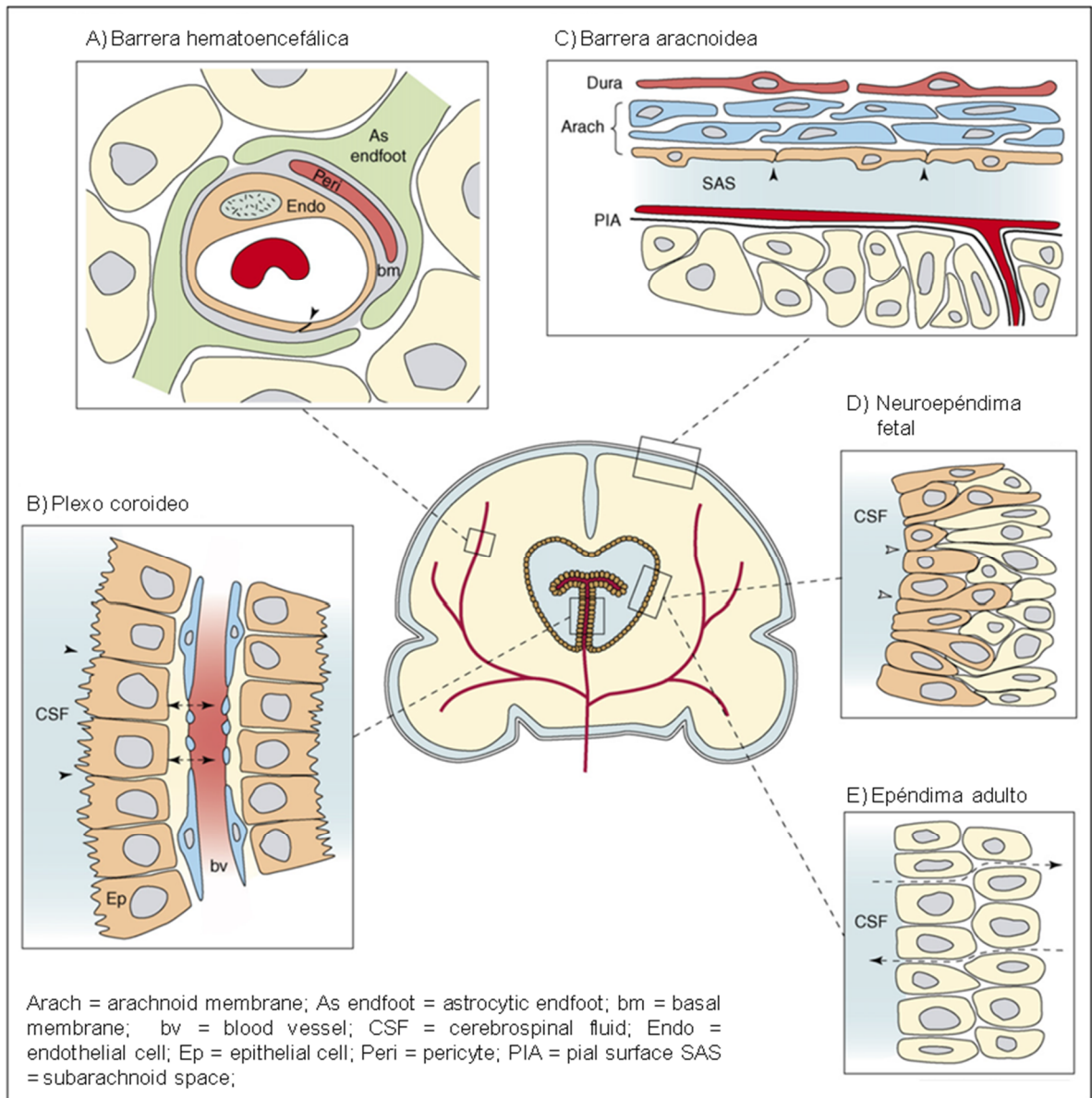


Figura 1. Representación esquemática de las barreras homeostáticas presentes en el SNC. A) La barrera hematoencefálica. B) El plexo coroideo. C) La barrera aracnoidea. D) El neuroepéndima fetal. E) El epéndima adulto sin restricción en el intercambio de sustancias (modificada de Saunders *et al.*, 2008).

2. LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

La BHE es la barrera que separa la sangre del parénquima cerebral y que está formada principalmente por las células endoteliales de los capilares sanguíneos cerebrales (CECC) (Gherzi-Egea *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 2005). Su función principal es mantener la homeostasis del cerebro regulando el intercambio de sustancias. La vasculatura del SNC presenta diferencias estructurales con respecto a la de la mayoría de los órganos, y se caracteriza principalmente por la presencia de un elevado número de TJ entre las CECC (Temsamani *et al.*, 2001).

Los capilares sanguíneos cerebrales que forman la BHE tienen una longitud total aproximada de 600 km en un humano adulto, y la superficie estimada para el transporte molecular es de 20 m² (Begley y Brightman, 2003; Abbott *et al.*, 2010). El grosor de la pared capilar es de 0.2 - 0.3 μm (Zlokovic, 2008), y todas las células neurales tienen algún capilar en sus proximidades, sin distar más de 8-25 μm (Abbott *et al.*, 2010). Todas estas características contribuyen a que la BHE sea la barrera más importante para el flujo de sustancias entre la sangre y el cerebro (Abbott, 2013).

Las funciones principales que desempeña la BHE son la regulación iónica, la regulación del flujo de neurotransmisores, el control de entrada de macromoléculas y neurotoxinas en el parénquima cerebral, y la entrada selectiva de nutrientes (Abbott *et al.*, 2010).

2.1. Historia: observaciones iniciales de la BHE

El concepto de la BHE comenzó a surgir de la mano del microbiólogo alemán Paul Ehrlich, quien en la década de 1880 llevó a cabo una serie de experimentos en los que observó la falta de permeabilidad de los vasos sanguíneos cerebrales a ciertos colorantes hidrofílicos, cuando estos eran inyectados en el sistema circulatorio (Ehrlich, 1885). Ehrlich, aun así, atribuyó erróneamente estos resultados a una baja afinidad del sistema nervioso por estos colorantes (Ehrlich, 1904).

Experimentos realizados poco después por Biedl y Kraus (1898) y Lewandowsky (1890), demostraron que ciertos compuestos como el ferrocianuro de sodio perdían su actividad farmacológica cuando se inyectaban intravenosamente, mientras que podían producir síntomas neurológicos drásticos cuando eran inyectados directamente en el LCR. Estas observaciones sugirieron la presencia de una barrera entre la sangre y el cerebro, siendo el mismo Lewandowsky quien acuñaría por primera vez el término *bluthirnschranke* (barrera hematoencefálica). Esta hipótesis de la existencia de una BHE ganó importancia gracias a los experimentos realizados por Edwin Goldmann (1909, 1913), un estudiante de Ehrlich que utilizando los mismos colorantes que su mentor, entre los que se encontraba el azul tripán, demostró que inyectándolos en el torrente sanguíneo teñían la mayoría de los tejidos excepto el cerebro y la médula espinal, y que cuando eran inyectados directamente en el LCR, teñían rápidamente las zonas adyacentes del tejido nervioso, pero no el resto de tejidos (Figura 2).

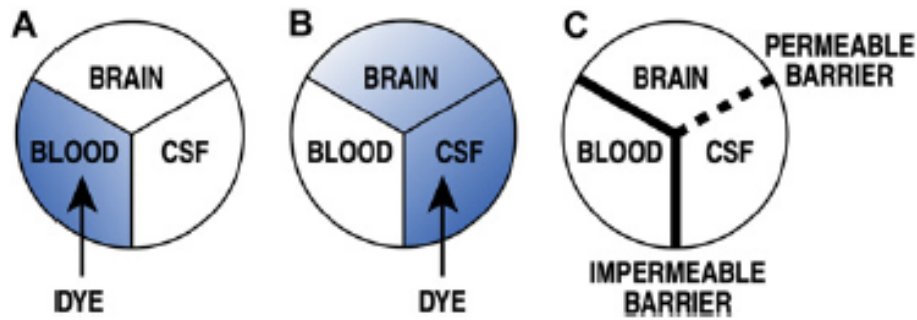


Figura 2. Experimentos de Edwin Goldman para demostrar la existencia de la BHE (Zlokovic, 2008).

De este modo se concluyó que existía una barrera a nivel de vasos sanguíneos cerebrales, y que esta barrera no estaba presente entre el LCR y el cerebro.

Gracias a los avances en microscopía electrónica, fue posible localizar ultraestructuralmente esta barrera a nivel de las células endoteliales cerebrales. Estudios llevados a cabo con peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase, HRP*) (Reese y Karnovsky, 1967; Brightman, 1968; Brightman y Reese, 1969) demostraron que tras la administración i.v. de esta proteína de 40 kDa, esta conseguía difundirse por los espacios intercelulares de las CECC hasta llegar a las TJ, pero no más allá de ellas. De este modo, en vertebrados, las TJ interendoteliales pasaron a ser la característica morfológica principal de la BHE.

2.2. Estructura de la BHE

Las CECC y las TJ, principales componentes anatómicos de la BHE, forman junto con la membrana basal del endotelio, los pericitos y los astrocitos la estructura completa de la BHE. Todos estos elementos celulares, además, interactúan estrechamente con las neuronas adyacentes formando la unidad funcional comúnmente denominada "unidad neurovascular" (UNV), la cual se considera la unidad básica y funcional de la BHE (Abbott *et al.*, 2006; Persidsky, 2006; Zlokovic, 2008). Esta unidad acopla la función vascular a la actividad neuronal (ElAli *et al.*, 2014). La proximidad de las CECC con los diferentes tipos de células gliales y neuronas permite una regulación paracrina eficaz y esencial para el buen funcionamiento del SNC (Zlokovic, 2008). Una alteración en esta coordinación puede ser clave en diversas enfermedades (Abbott *et al.*, 2006). En la Figura 3 se puede observar un esquema representativo de las principales estructuras que forman la BHE.

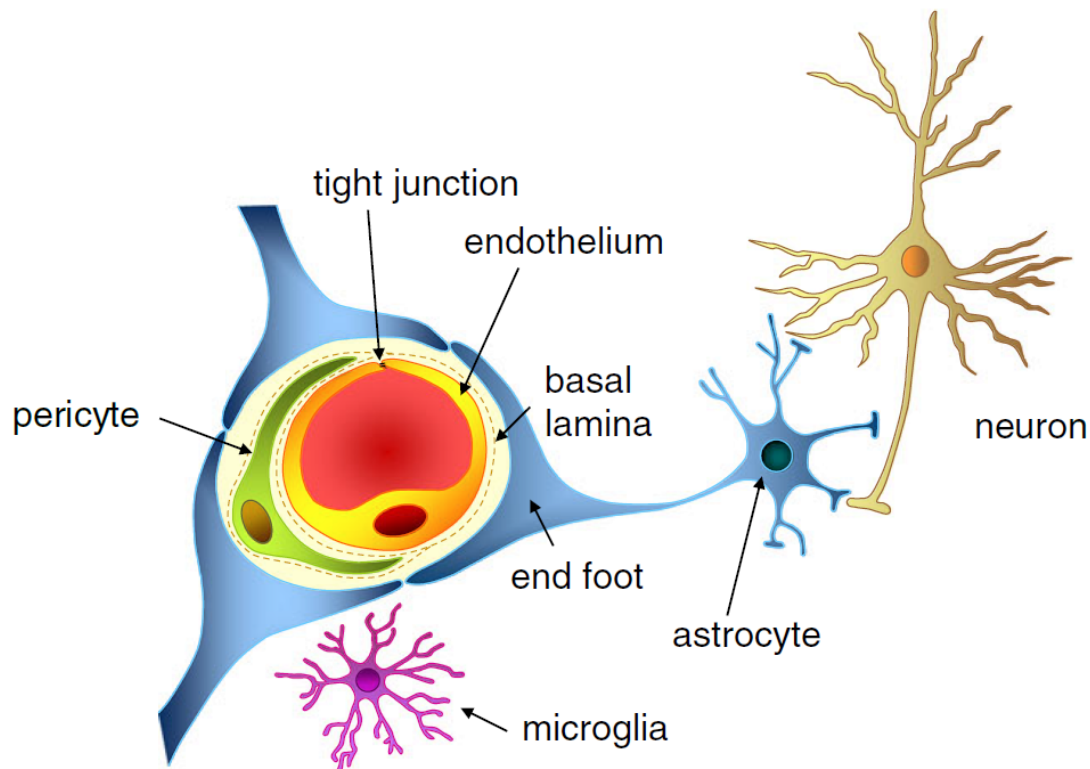


Figura 3. Esquema representativo de los principales componentes celulares y estructuras que forman la BHE: CECC, pericitos, pies astrocíticos, TJ y lámina basal (modificada de Abbott, 2013).

La membrana basal del endotelio vascular separa las CECC de los pericitos, cuyas prolongaciones envuelven prácticamente toda la superficie externa de la pared vascular (Stanimirovic y Friedman, 2012). Además, los pericitos también se encuentran rodeados por esta membrana, y pueden comunicarse directamente con las CECC en puntos de contacto (von Tell *et al.*, 2006; Zlokovic, 2008). Alrededor de estos, se encuentran los procesos astrocíticos perivascularales, cubriendo también grandes dominios de los capilares. Los astrocitos se comunican con las neuronas, actuando como mediadores en la comunicación endotelial-neuronal. Las proyecciones axonales que contienen neurotransmisores y péptidos vasoactivos se extienden también a zonas próximas a la microvasculatura cerebral, aunque en este caso, estos "botones" neuronales están más bien en contacto con los procesos astrocíticos, siendo únicamente una pequeña proporción la que está en contacto directo con la lámina basal (Hamel, 2006). En el caso de vasos de mayor tamaño (arteriolas, arterias y venas), las células del músculo liso forman una capa continua, reemplazando a los pericitos (Abbott *et al.*, 2006). La Figura 4 contiene una imagen de microscopía electrónica de un capilar cerebral donde se puede observar la ultraestructura de la BHE.

Las funciones adaptativas de la UNV frente a estímulos tanto fisiológicos como patológicos se efectúan a través de complejas interacciones celulares e interacciones entre células y matriz extracelular. Las principales funciones integradas de la UNV son la regulación local del flujo sanguíneo cerebral, la permeabilidad y el transporte en la BHE, las respuestas neuroinmunes, la inactivación de neurotransmisores, los acoplamiento neurotróficos y la coordinación angiogénica y neurogénica (Zlokovic, 2008; Stanimirovic y Friedman, 2012).

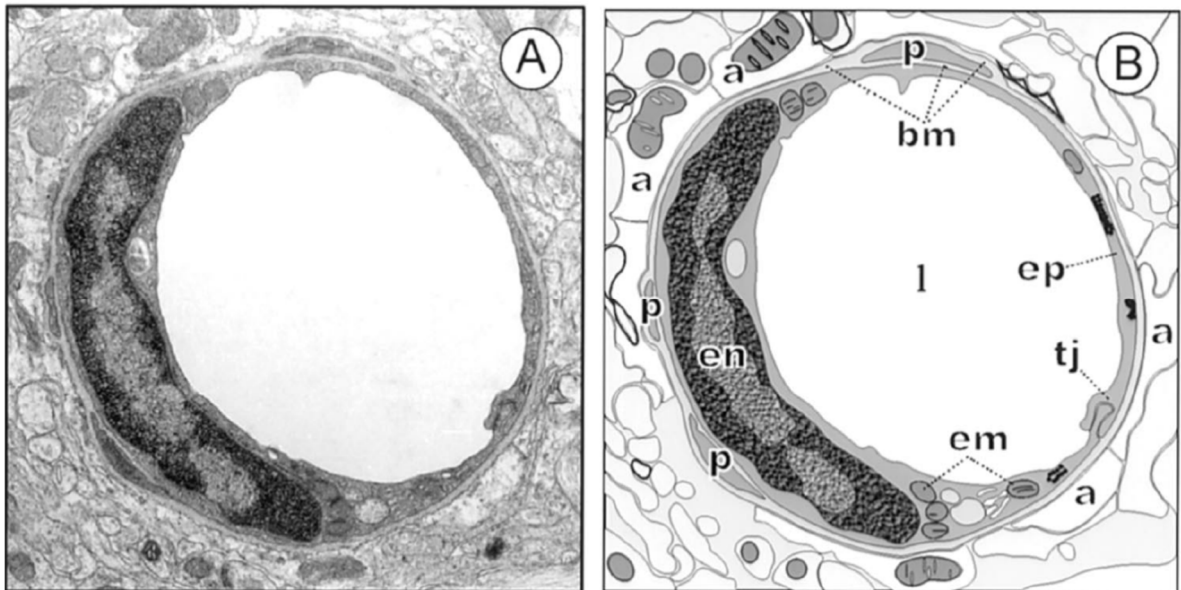


Figura 4. Ultraestructura de un capilar cerebral de rata. a) Imagen de microscopía electrónica de un capilar cerebral de córtex de rata Wistar-Kyoto. b) Reconstrucción gráfica del capilar. a = astrocytic endfeet; bm = basa membrane; em = endotelial mitocondria; en = endotelial nucleus; ep = endotelial cytoplasm; l = capillary lumen; p = pericyte; tj = tight junction (Farkas y Luiten, 2001).

2.3. Función de barrera de la BHE

La función de barrera se consigue gracias a la combinación de una ‘barrera física’, donde las TJ evitan el intercambio de sustancias vía paracelular y obligan a que el tráfico molecular siga una ruta transcelular a través de la BHE, junto con una ‘barrera metabólica’ (enzimas que pueden metabolizar moléculas en tránsito) y una ‘barrera de transportadores activos de eflujo’. Aun así, la BHE no es una barrera fija y estática, sino una barrera flexible y dinámica que puede ser modulada y regulada tanto en condiciones fisiológicas como en situaciones patológicas (Abbott *et al.*, 2006).

2.3.1. Barrera física

Desde un punto de vista estructural, el componente principal de la BHE son las CECC. Estas células, a diferencia de las células endoteliales de los capilares de otros tejidos, están fuertemente unidas entre sí por las TJ y las uniones adherentes (UA). Además, no presentan fenestraciones, tienen una baja actividad pinocítica y ejercen un fuerte control sobre el paso de sustancias por la vía transcelular. Únicamente moléculas con características muy específicas pueden atravesar las CECC (Bernacki *et al.*, 2008; Zlokovic, 2008; Candela *et al.*, 2008; Ramos-Cabrer y Campos, 2013).

Las TJ se encuentran entre las CECC y las rodean como un cinturón continuo; se caracterizan por una alta resistencia eléctrica ($1500-2000 \Omega\text{cm}^2$) y contribuyen de manera importante a la impermeabilidad de la BHE limitando el flujo de sustancias por la vía paracelular (Bernacki *et al.*, 2008). El número de puntos de fusión entre las TJ puede variar según la región cerebral, hecho que genera un nivel de hermeticidad no homogénea en las diferentes zonas del cerebro; de este modo, a medida que los capilares se transforman en vénulas postcapilares, se observa un sellado menor (Simionescu *et al.*, 1976).

Diversas proteínas han sido identificadas como componentes de las TJ, entre las que se encuentran la claudina, la ocludina y las *junctional adhesion molecules* (JAM). Además, las proteínas *zonula occludens* (ZO) 1, 2 y 3 junto con la cingulina han sido identificadas como proteínas citoplasmáticas que unen las proteínas de la membrana con la actina, proteína del citoesqueleto responsable de la integridad estructural y funcional del endotelio (Ballabh *et al.*, 2004).

Las UA no forman estrictamente parte de las TJ; constituyen un segundo nivel de ajuste en la unión entre las CECC, tienen una localización más basal y desempeñan un papel clave en la localización y estabilización de las TJ (Dejana *et al.*, 2008). Aunque se desconoce el papel de las UA en la permeabilidad de la BHE durante procesos patológicos, se ha demostrado que las UA interactúan con el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 2 (Lampugnani *et al.*, 2006), implicándose así en los procesos angiogénicos. Otros estudios han demostrado que el incremento en la expresión de claudina 5 puede necesitar la participación de la cadherina del endotelio vascular, mostrando que las UA tienen una relación directa con la integridad de la BHE (Taddei *et al.*, 2008).

2.3.2. Barrera metabólica

Las CECC, junto con los astrocitos y pericitos de la BHE, forman una barrera metabólica gracias a la expresión de una serie de enzimas que modifican moléculas endógenas y exógenas que de otro modo podrían atravesar la barrera física y afectar negativamente a la función neuronal (Pardridge, 2005a). De esta manera, la expresión intra- y extracelular de diversas enzimas como aminopeptidasas, endopeptidasas y colinesterasas entre otros,

pueden dotar a la BHE de una "barrera metabólica". Así, ectoenzimas como las peptidasas y nucleotidasas son capaces de metabolizar diferentes péptidos y ATP, respectivamente, mientras que enzimas intracelulares como la monoaminoxidasa y el citocromo P450 pueden desactivar diversos compuestos neuroactivos tóxicos (el-Bacha y Minn, 1999).

2.3.3. Barrera de transportadores activos de eflujo

A pesar de que teóricamente las sustancias lipófilas pueden difundirse libremente a través de la BHE, la tasa de penetración en el SNC es menor de lo que se esperaba en el caso de muchos solutos (Abbott *et al.*, 2010). Esto es debido a que estas sustancias, así como muchos de sus metabolitos, son sustrato de miembros de la familia de los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) de eflujo.

En la BHE, los transportadores ABC más importantes son la glicoproteína-P (Pgp), las *Multidrug Resistance-associated Proteins* (MRPs) y la *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) (Dauchy *et al.*, 2008). Se encuentran principalmente en la membrana luminal de las CECC, y actúan como bombas activas de eflujo, consumiendo ATP y transportando un amplio rango de compuestos liposolubles fuera de las CECC y el SNC (Abbott, 2013). De este modo, se reduce la entrada de muchos compuestos potencialmente tóxicos provenientes de la dieta y el entorno en el cerebro. Además, muchos fármacos también son sustrato de estos transportadores de eflujo, lo que supone una penetración reducida de los mismos en el cerebro (Abbott *et al.*, 2010).

Los transportadores ABC actúan en estrecha colaboración con una serie de enzimas metabolizantes, principalmente los citocromos P450 de células endoteliales y terminaciones astrocíticas; por tanto, cualquier tóxico que atravesase la primera línea de defensa será posteriormente metabolizado por estas enzimas, y los metabolitos correspondientes serán expulsados por las bombas (Abbott, 2013).

2.4. Intercambio de sustancias a través de la BHE

La difusión paracelular de sustancias a través de la BHE es sumamente limitada debido a la presencia de las TJ. Debido a la unión total, la vía paracelular queda totalmente sellada y las sustancias de peso molecular superior a 180 Da se ven obligadas a cruzar la membrana y el citosol de las CECC (Grieb *et al.*, 1985; Mitic y Anderson, 1998). Además, la baja actividad pinocítica y la elevada actividad metabólica de la BHE (de Boer y Gaillard, 2007) hacen que la permeabilidad pasiva transcelular sea también baja frente a muchos nutrientes hidrosolubles esenciales para el SNC. Es por ello que existen diversos sistemas específicos y selectivos de transporte en la BHE que garantizan un suministro adecuado de determinados compuestos (Abbott *et al.*, 2010). De esta manera, se permite o facilita la entrada de los nutrientes requeridos, y se excluye la de los compuestos que sean potencialmente nocivos para el SNC (Abbott *et al.*, 2006). En la Figura 5 se pueden observar las diferentes rutas o

mecanismos para el tráfico molecular existentes en las CECC, así como las funciones de barrera mencionadas anteriormente.

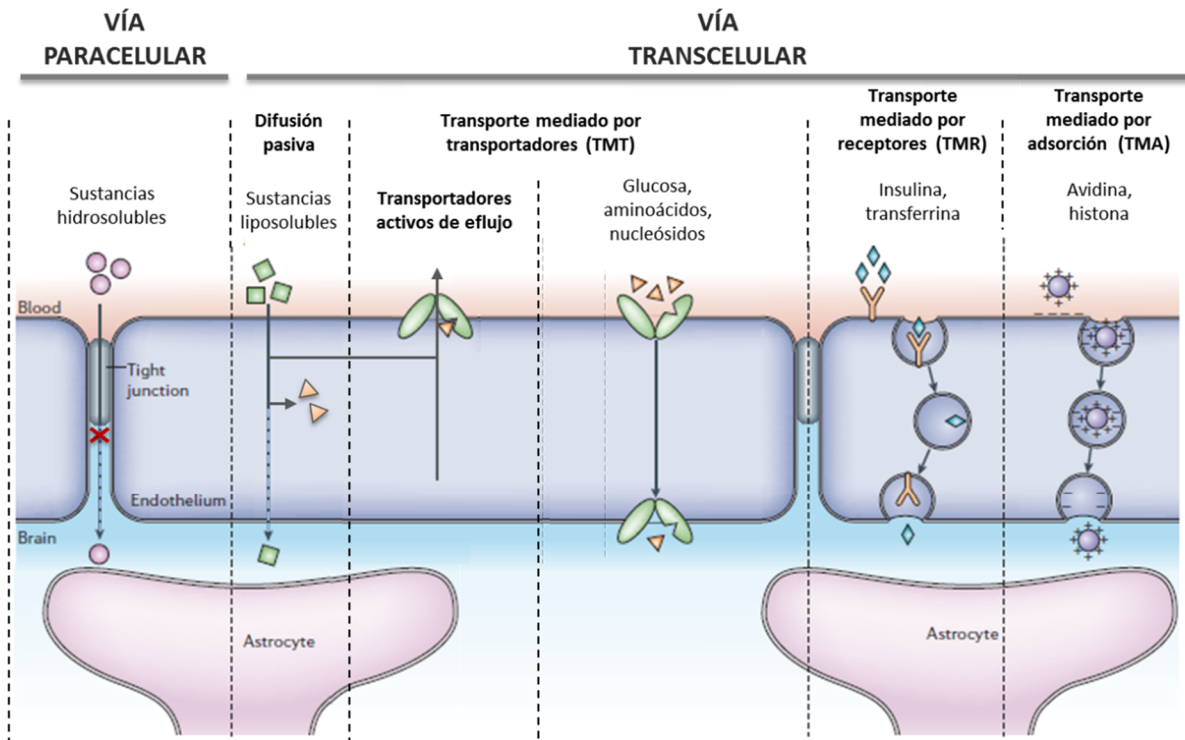


Figura 5. Mecanismos de transporte para el intercambio de sustancias a través de la BHE (modificada de Abbott *et al.*, 2006).

2.4.1. Difusión pasiva

La difusión pasiva vía transcelular depende de la liposolubilidad y del gradiente de concentración (directamente proporcional), y del peso molecular e ionización del compuesto (inversamente proporcional) (Temsamani *et al.*, 2001). Una baja liposolubilidad del compuesto equivale a una alta capacidad para formar puentes de hidrógeno, lo que dificulta la difusión pasiva de la molécula a través de la membrana celular (Vlieghe y Khrestchatisky, 2013).

Solamente las moléculas lipófilas de pequeño tamaño (<400-600 Da), que no tienen una elevada superficie polar, que tienen poca capacidad de unión a las proteínas plasmáticas, que no son sustrato de los transportadores de eflujo activo y que no son metabolizadas por las CECC, se difundirán libremente por la vía transcelular. Las moléculas gaseosas como el O₂ y CO₂ también podrán utilizar esta vía para difundirse (Pardridge, 2005b; Jones y Shusta, 2007; Abbott *et al.*, 2010; Abbott, 2013).

2.4.2. Transporte de iones

La BHE tiene una gran densidad de mitocondrias, lo cual refleja las altas demandas de energía por los transportadores dependientes de ATP, como la bomba Na^+/K^+ , que se encuentra en la membrana abluminal de la BHE (Vorbrodt, 1988). Por otro lado, el cotransportador de Na^+ , K^+ , y 2Cl^- se encuentra principalmente en la membrana luminal (O'Donnell *et al.*, 2006) y se encarga de cotransportar estos iones desde la sangre a las CECC. Además, también están el intercambiador de Na^+/H^+ en la membrana luminal y el intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en ambas membranas, mostrando ambos transportadores un papel clave en la regulación del pH intracelular del endotelio (Taylor *et al.*, 2006). Por otro lado, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ también está presente en la BHE y se encarga del flujo de salida del Ca^{++} de las CECC (Zlokovic, 2008).

2.4.3. Sistemas de transporte transcelular

Como se ha mencionado anteriormente, solamente sustancias lipófilas menores de 400-600 Da pueden atravesar la BHE. Este contexto implica la necesidad de sistemas de transporte transcelular para asegurar la aportación básica de nutrientes a las células que forman el SNC. En ocasiones, la expresión de las proteínas implicadas en estos sistemas está altamente polarizada en la membrana luminal o la membrana basolateral; o repartida entre ambas (Begley y Brightman, 2003). Las TJ constituyen una frontera que limita la libre difusión de las proteínas y lípidos de membrana, dando así polaridad a las CECC y limitando la presencia de unos y otros transportadores entre las membranas luminal y abluminal (Grieb *et al.*, 1985; Mitic y Anderson, 1998).

Los sistemas de transporte transcelular activo y/o selectivo presentes en la BHE se clasifican en tres grupos: transporte mediado por transportadores (TMT), transporte mediado por adsorción (TMA) y transporte mediado por receptores (TMR). El TMT se encarga de transportar iones y solutos polares de pequeño tamaño, mientras que los otros dos sistemas transportan macromoléculas (p. ej. péptidos y proteínas) o compuestos de mayor tamaño (Pasha y Gupta, 2010). Cada uno de estos sistemas se explicará en detalle en el siguiente apartado.

3. SISTEMAS DE TRANSPORTE TRANSCELULAR EN LA BHE

3.1. Transporte mediado por transportadores (TMT)

El TMT es un sistema de transporte específico que facilita el transporte de nutrientes polares esenciales tales como hexosas (glucosa, galactosa), diversos aminoácidos necesarios para el metabolismo, ácidos monocarboxílicos (lactato, piruvato, cuerpos cetónicos), nucleósidos (adenosina, guanosina, uridina), purinas (adenina, guanina), aminas

(colina) y vitaminas (Hawkins *et al.*, 2006; Simpson *et al.*, 2007; Ohtsuki y Terasaki, 2007; Deeken y Löscher, 2007; Spector y Johanson, 2007; Zlokovic, 2008; Abbott, 2013, Campos-Bedolla *et al.*, 2014).

Este transporte se lleva a cabo gracias a proteínas transportadoras especializadas, estereoespecíficas, saturables y de pequeño tamaño, presentes en las membranas luminal y/o abluminal de la célula endotelial (de Boer *et al.*, 2003; Jones y Shusta, 2007). Las regiones transmembrana de estas proteínas transportadoras forman poros estereoespecíficos que atraviesan la membrana luminal o abluminal (Pardridge, 2001), y serán estos los puntos de paso de los solutos. La unión del soluto a la proteína transportadora provoca un cambio conformacional en dicha proteína, facilitando así el paso del soluto a través de la membrana. Si el compuesto necesita ser transportado en contra del gradiente de concentración el proceso será ATP-dependiente (Abbott *et al.*, 2010; Chen y Liu, 2012).

Las CECC expresan una amplia variedad de proteínas transportadoras para un gran número de solutos y nutrientes, que median el flujo tanto de la sangre al cerebro, como en el sentido contrario. La expresión de muchos de estos transportadores está altamente polarizada, mientras que otros se expresan en ambas membranas. La orientación de estos transportadores influirá por tanto en la direccionalidad preferencial de transporte para cada soluto (Abbott *et al.*, 2010).

Los ejemplos más destacables son el transportador de glucosa GLUT1, el transportador de ácidos monocarboxílicos MCT1, el transportador de aminoácidos neutros LAT1 y el transportador de nucleósidos CNT2 (Vilella *et al.*, 2015).

3.2. Transporte de macromoléculas

La transcitosis de macromoléculas a través de la BHE vía mecanismos endocíticos, transporte citosólico y mecanismos exocíticos, supone la principal ruta de entrada para solutos de gran tamaño molecular como péptidos y proteínas. A pesar de que la mayoría de moléculas provenientes de la sangre no pueden acceder al cerebro debido a la presencia de la BHE, existen algunos mecanismos transcitóticos específicos y no-específicos. Estos mecanismos vesiculares son principalmente el TMR, el TMA y en menor medida, la transcitosis de fase fluida (TFF). A diferencia de la TFF, el TMR y el TMA requieren la interacción entre el ligando y la membrana luminal para desencadenar el proceso de transporte. La interacción en el caso del TMR es específica, mientras que en el caso del TMA es no-específica (Hervé *et al.*, 2008a).

La transcitosis de macromoléculas en la BHE es ATP-dependiente, tanto para el proceso de endocitosis en la membrana luminal, como para el transporte a través de la CECC y la posterior exocitosis en la membrana basolateral. La densidad mitocondrial en las CECC es

alrededor de 5 veces mayor que en el endotelio periférico, lo que incrementa el potencial energético de la BHE, y permite así el transporte vesicular transcapilar (Hervé *et al.*, 2008a).

El grosor de la pared de los capilares cerebrales es un 40% menor en comparación con la de los capilares periféricos (Coomber y Stuart, 1986). Se ha sugerido que esta diferencia puede ser una modulación de la permeabilidad restrictiva de la BHE, permitiendo así que las sustancias ahorren en tiempo y distancia a la hora de atravesar las CECC y alcanzar el parénquima cerebral (Hervé *et al.*, 2008a).

3.2.1. TMA:

El TMA se inicia por la unión de sustancias policatiónicas a las cargas negativas de la membrana plasmática (Bickel *et al.*, 2001) y su posterior endocitosis.

A pH fisiológico sistémico, la membrana luminal de las CECC presenta una carga total negativa (Hervé *et al.*, 2008a). Estudios ultraestructurales (Vorbrodt, 1989) han identificado sialo-glicoconjugados y proteoglicanos heparán sulfato presentes en la BHE, y se piensa que son componentes que la dotan de carga negativa.

Varios tipos de moléculas son transportadas a través de las CECC vía TMA, entre las que se encuentran la avidina, la histona, la protamina y la aglutinina de germen de trigo.

Este tipo de transporte no requiere la interacción del ligando con ningún receptor de membrana específico y la endocitosis se inicia al darse la interacción carga-carga entre las sustancias policatiónicas y las cargas negativas de la superficie endotelial. Se pueden formar dos tipos de vesículas endocíticas en la membrana luminal de las CECC; las caveolas y las vesículas recubiertas de clatrina. Las vesículas recubiertas de clatrina están negativamente cargadas en la membrana luminal, por lo que son capaces de unirse a moléculas cargadas positivamente (Hervé *et al.*, 2008a).

Varios estudios, sin embargo, han demostrado la presencia de caveolas en el TMA, como se ha observado en la transcitosis de fragmentos $F(ab')^2$ cationizados a través de un modelo de barrera *in vitro* (Girod *et al.*, 1999). Además, se ha observado también la transcitosis caveola-independiente de fragmentos Fab y $F(ab')^2$ (Hong *et al.*, 2000; Welfringer *et al.*, 2005; Hervé *et al.*, 2008b), así como de péptidos Syn-B, una familia de *cell-penetrating peptides* que exhiben selectividad por carga en la BHE (Drin *et al.*, 2003). Todos estos datos generan controversia alrededor de los mecanismos implicados en el TMA, pero podemos llegar a la conclusión de que es un sistema de transporte que puede albergar los diferentes mecanismos mencionados.

3.2.2. TMR:

El TMR se inicia gracias a la interacción específica entre un ligando y un receptor presente en la membrana de las CECC, la cual provocará la internalización de todo el complejo. El proceso de endocitosis comienza con la agrupación de varios complejos receptor-ligando y la posterior invaginación de la membrana celular, tras la cual se formará una vesícula endocítica que entrará en el sistema endosomal intraendotelial. Las vesículas de transporte son sujeto de clasificación dentro de la célula, y en el caso de la transcitosis, las vesículas que contienen el complejo ligando-receptor o el ligando disociado, atravesarán el citoplasma, terminando en exocitosis en la membrana basolateral (Jones y Shusta, 2007). La disociación entre el ligando y el receptor ocurrirá presumiblemente durante el tránsito celular o el proceso exocítico (Abbott *et al.*, 2010).

Al igual que ocurre en el caso del TMA, el TMR no sigue siempre el mismo proceso transcitótico, viéndose en algunos casos implicadas las caveolas, y en otros las vesículas recubiertas de clatrina (Abbott, 2013). Así mismo, la ruta transcitótica puede ser también caveola- y clatrina-independiente (Georgieva *et al.*, 2014).

Existe un gran número de moléculas que son transportadas mediante este sistema, entre las que cabe destacar, la insulina, la leptina, la melanotransferrina, lipoproteínas y moléculas unidas a la apolipoproteína E (ApoE), y el hierro unido a la transferrina (Tf) (Jones y Shusta, 2007; Abbott *et al.*, 2010). Existe cierta controversia en torno al transporte de este último, ya que como se explicará con mayor detalle en un apartado posterior, puede que la transcitosis no se complete vía mecanismos endocíticos, sino mediante una serie de transportadores (Quian *et al.*, 2002; Leitner y Connor, 2012; Zheng y Monnot, 2012). Lo que sí está totalmente elucidado es que la internalización del hierro en las CECC se da gracias al proceso de endocitosis inducido por la interacción de la Tf con su receptor (Moos *et al.*, 2007).

Tanto en el caso del TMA como en el TMR, para que el péptido o proteína transportado complete la transcitosis, es necesario esquivar la ruta lisosomal y degradativa, característica importante de la BHE y no tan común en el resto del endotelio (Abbott *et al.*, 2010), donde suele ser más frecuente la degradación enzimática lisosomal del contenido endocitado.

Ambos procesos vesiculares necesitan más tiempo para llevar a cabo la transcitosis en comparación con el TMT; el transporte suele durar unos minutos (Egleton y Davis, 1997). Además, ambos procesos son saturables, a pesar de que el TMA necesita una mayor concentración de soluto para llegar a la saturación (Hervé *et al.*, 2008a).

3.2.3. TFF

Las moléculas solubles plasmáticas pueden ser aleatoriamente internalizadas por caveolas dentro de un volumen de plasma sanguíneo, y transportadas a través de las CECC. Este tipo

de transporte, la TFF, es independiente de cualquier tipo de interacción entre las moléculas transportadas y la membrana endotelial (Simionescu y Simionescu, 1991). Mientras que la TFF es el principal proceso de transporte para el reparto transendotelial de proteínas desde la sangre a los tejidos periféricos, este proceso es mucho menos frecuente en el caso de una BHE sana, debido a una escasa presencia de caveolas en la misma. Por el contrario, las CECC se caracterizan por una alta densidad de vesículas recubiertas de clatrina. Las vesículas recubiertas de clatrina abiertas a la parte luminal de la superficie endotelial están cargadas negativamente, por lo que repelen las moléculas aniónicas. Por lo tanto, solo una pequeña porción de las proteínas plasmáticas pueden ser transportadas aleatoriamente dentro de la fase fluida de las vesículas de clatrina (Hervé *et al.*, 2008a).

4. LA BHE: FACTOR LIMITANTE PARA DISTRIBUIR FÁRMACOS EN EL SNC

La función protectora que ejerce la BHE en el cerebro limitando el paso de moléculas provenientes de la circulación sanguínea, supone un problema a la hora de tratar diversas patologías del SNC, ya que la mayoría de moléculas y fármacos no pueden atravesar la BHE y llegar al parénquima cerebral por la vía sistémica, y como consecuencia, por la vía oral. (Pardridge, 1998; Temsamani *et al.*, 2001; Jones y Shusta, 2007; Tajés *et al.*, 2014).

Solamente las moléculas lipófilas con un peso molecular menor a 400-600 Da y con una carga apropiada pueden atravesar mediante difusión pasiva la BHE (Pardridge, 1998; Gaillard *et al.*, 2005; Gabathuler, 2010). Aproximadamente un 98% de las moléculas de pequeño tamaño (< 500 Da), y casi el 100% de las moléculas de gran tamaño (> 1000 Da), como las biomacromoléculas terapéuticas (ej. proteínas recombinantes o los ácidos nucleicos utilizados en la terapia génica), no atraviesan la BHE (Pardridge, 2005b; Gaillard *et al.*, 2005; Hillarieau y Couvreur, 2009; Gabathuler, 2010). Por lo tanto, a pesar de que la superficie de la microvasculatura cerebral humana (20 m²) es más que adecuada para distribuir cualquier tratamiento farmacológico en todo el cerebro, las propiedades de barrera de la BHE restringen el paso de fármacos desde la vía sistémica (Jones y Shusta, 2007).

Por todo ello, diversas patologías del SNC, como son los tumores cerebrales, varios desórdenes psiquiátricos (depresión, esquizofrenia), enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple), la epilepsia, la migraña, enfermedades de almacenamiento lisosomal y algunas enfermedades infecciosas que afectan al SNC (VIH, meningitis vírica y bacteriana), siguen sin tener un tratamiento diagnóstico o un tratamiento terapéutico no-invasivo, totalmente efectivo, óptimo o curativo, no por la falta de fármacos candidatos, sino por la incapacidad de estos para atravesar la BHE (de Boer y Gaillard, 2007; Alam *et al.*, 2010; Chen y Liu 2012; Abbott, 2013; Tajés *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (2016), cientos de millones de personas en todo el mundo padecen trastornos neurológicos. Más de 6 millones de personas mueren cada año por accidentes cerebrovasculares, más de 50 millones de personas en todo el mundo tienen epilepsia y se estima que 47.5 millones de personas sufren demencia, con la aparición de 7.7 millones de nuevos casos cada año. La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia, representando el 60-70% de los casos. Se prevé que los trastornos neurológicos sean el principal problema médico del siglo XXI, ya que la media de edad de la población mundial va en aumento, y la incidencia de muchas de las patologías del SNC aumenta exponencialmente a partir de los 65 años (Palmer, 2010).

5. ESTRATEGIAS PARA DISTRIBUIR FÁRMACOS EN EL SNC

Durante las últimas décadas se ha hecho un esfuerzo importante en estudiar y desarrollar diversas estrategias para distribuir fármacos y sustancias terapéuticas en el SNC de manera efectiva. Las diferentes técnicas existentes pueden clasificarse en dos grupos principales: las técnicas invasivas y las no-invasivas (Figura 6). A continuación se describen las principales técnicas desarrolladas hasta la fecha.

5.1. Técnicas invasivas

5.1.1. Métodos quirúrgicos

Los métodos quirúrgicos consisten en la inyección o infusión local del fármaco o agente terapéutico directamente en el LCR o parénquima cerebral, así como en el uso de microchips o implantes para una liberación local controlada del agente terapéutico (Gabathuler, 2010; Tajés *et al.*, 2014). Estos métodos evitan el paso a través de la BHE y permiten liberar una mayor concentración del fármaco en la zona deseada, minimizando la toxicidad sistémica y su presencia en otras áreas del cerebro o áreas periféricas (Barcia y Gallego, 2009; Alam *et al.*, 2010). Pueden ser especialmente útiles para administrar agentes quimioterapéuticos en tumores cerebrales localizados (Gaillard *et al.*, 2005; Gabathuler, 2010), o para tratar otro tipo de afecciones de carácter localizado, como son los casos de epilepsia con resistencia a fármacos antiepilépticos administrados sistémicamente, en los que la administración directa del fármaco en el área epileptógena podría resultar efectiva (Barcia y Gallego, 2009), o casos de ictus isquémico con posteriores daños sub-agudos y crónicos en la zona infartada producidos por la isquemia/reperfusión (Rhim *et al.*, 2013). Existe sin embargo una gran limitación debido al bajo coeficiente de difusión de los fármacos, la cual depende del punto de administración del fármaco, su liposolubilidad, masa molecular, polaridad y afinidad por el tejido (Tajés *et al.*, 2014).

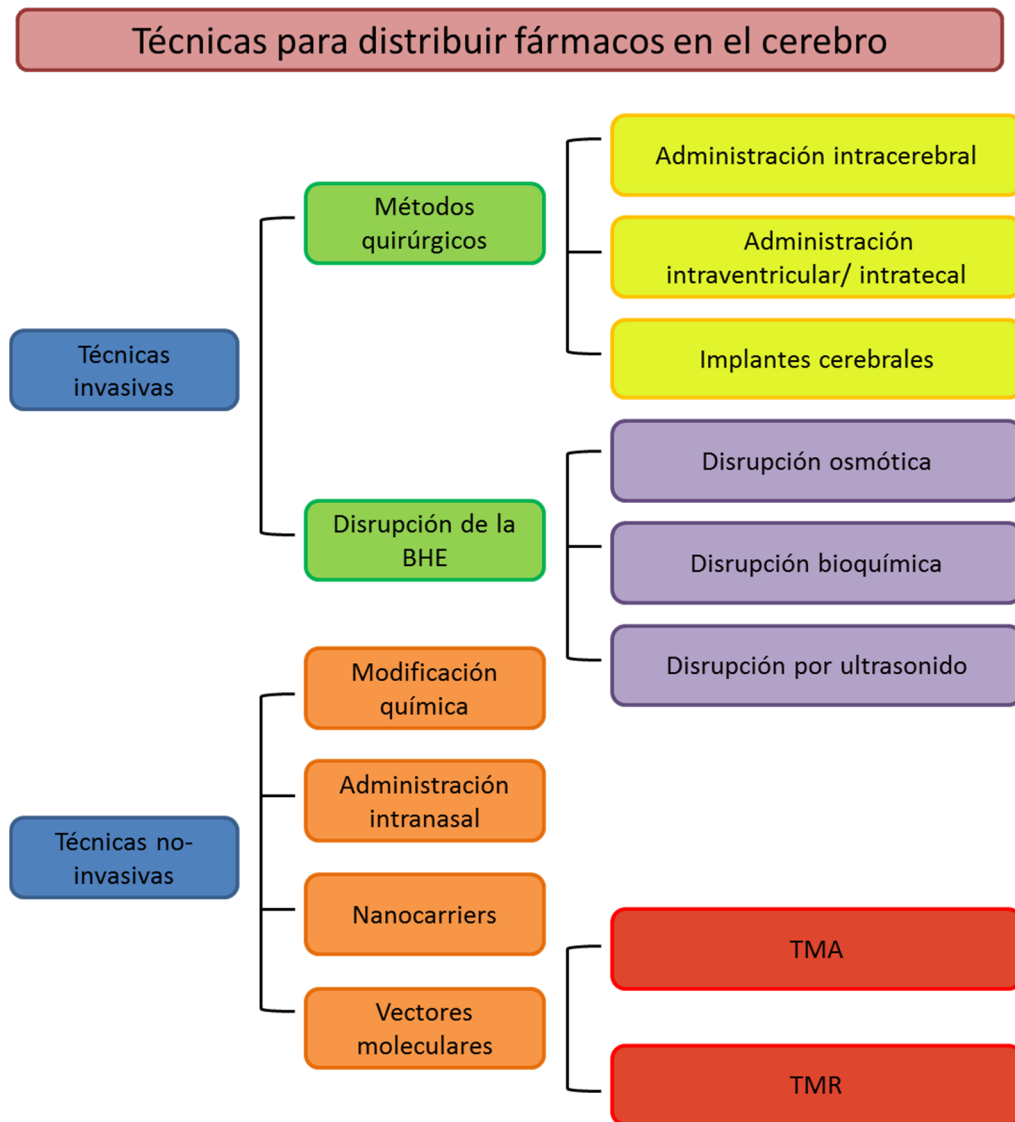


Figura 6. Representación esquemática de las diferentes técnicas o estrategias desarrolladas para distribuir fármacos en el cerebro. TMA = transporte mediado por adsorción; TMR = transporte mediado por receptores.

5.1.1.1. Administración intracerebral

La inyección/ infusión directa del fármaco en el parénquima cerebral ha resultado ser ineficiente y clínicamente limitada. Además de la necesidad de repetidas intervenciones quirúrgicas en el caso de la inyección en bolo, o de la invasividad en el caso de implantar un catéter conectado a un reservorio, la difusión del fármaco depende directamente de su masa molecular y del gradiente de concentración. La distribución del fármaco en el cerebro por difusión disminuye exponencialmente con la distancia, viéndose limitada a 3-5 mm desde el punto de inyección. (Tajes *et al.*, 2014; Chaichana *et al.*, 2015).

Alternativamente, existe un método de infusión activa y continua denominada *distribución mejorada por convección (DMC)*. Este método consiste en bombear continuamente el

fármaco a través de un catéter, aplicando presión positiva para que este alcance mayores regiones de tejido desplazando el líquido intersticial. En comparación con la administración por difusión pasiva, la DMC consigue distribuir fármacos en relativamente grandes cantidades, manteniendo su concentración y distribución (hasta 3 cm desde el punto de administración) a lo largo del tiempo. Aun así, la gran desventaja de la infusión de fármacos mediante sistemas de bombeo externos, al igual que en el caso de la infusión por difusión pasiva vía catéter, es la necesidad de rellenar el contenido del reservorio continuamente (de Boer y Gaillard, 2007; Barcia y Gallego, 2009; Alam *et al.*, 2010; Gabathuler, 2010; Chaichana *et al.*, 2015).

La DMC ha sido utilizada en diversos ensayos clínicos para administrar agentes quimioterapéuticos y biológicos (inmunotoxinas), y estudiar la eficacia del método en el tratamiento contra gliomas malignos. A pesar de postularse como un método prometedor, aún son necesarios estudios clínicos donde se demuestre que mejora la media de supervivencia de los pacientes para poder incluirlo o combinarlo con tratamientos actuales (Huyhn *et al.*, 2006; Chaichana *et al.*, 2015; Papademetriou y Porter, 2015).

A pesar de las ventajas que pueden ofrecer estos métodos con respecto a otros existentes, los riesgos asociados al procedimiento quirúrgico, así como al uso continuo de sistemas de bombeo externos pueden ser varios, incluyendo el riesgo de hemorragia intracraneal, infección, rechazo, fallos mecánicos, mal posicionamiento del catéter y obstrucción, entre otros (Barcia y Gallego, 2009; Chaichana *et al.*, 2015).

5.1.1.2. Administración intraventricular/ intratecal

Estos dos tipos de administración consisten en la inyección/infusión directa del fármaco en el LCR, evitando el paso a través de la BHE y la barrera sangre-LCR (Huyhn *et al.*, 2006; de Boer y Gaillard, 2007; Tajés *et al.*, 2014). El sistema ventricular está directamente conectado con el SNC a través del epéndima, por lo que cualquier compuesto disuelto en el LCR puede difundirse y alcanzar regiones cercanas del parénquima cerebral (Tajés *et al.*, 2014). Aun así, se ha demostrado que la concentración de un fármaco en zonas del cerebro adyacentes a los ventrículos (a 1-2 mm de la superficie ventricular) corresponde solamente al 1-2% de la concentración del fármaco en el LCR (Blasberg *et al.*, 1975). Además, el LCR es rápidamente drenado a la circulación venosa, produciéndose una rápida limpieza o intercambio del fluido y su contenido; en humanos, el intercambio o drenaje del volumen total de LCR (~140 mL) sucede en 4-5 h (de Boer y Gaillard, 2007; Pardridge, 2012; Tajés *et al.*, 2014). Estas desventajas hacen que este método sea solamente eficiente para difundir sustancias a zonas cerebrales adyacentes a los ventrículos (Gabathuler, 2010). Se han observado efectos farmacológicos, por ejemplo, cuando los receptores diana del fármaco (péptidos opioides) administrado intracerebroventricularmente se encuentran cerca de la superficie endotelial del cerebro (Pardridge, 2007).

La administración intratecal en la cisterna magna es menos invasiva que la administración intracerebroventricular, pero no resulta eficiente a la hora de distribuir fármacos al parénquima cerebral. A menudo, existe una importante difusión del fármaco a lo largo del canal espinal, como se observó en la inyección intratecal del agente antitumoral etopósido en la cisterna magna de perros (Savarj *et al.*, 1992). Por lo tanto, la ruta intratecal es más adecuada para el tratamiento de enfermedades de la médula espinal o enfermedades meningocócicas diseminadas (Huyhn *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2010).

La punción lumbar en el espacio subaracnoideo es también otra vía de administración intratecal. Hoy día ya hay en el mercado bombas implantables para la administración intratecal de fármacos para tratar dolor crónico intratable y espasticidad severa de origen cerebral o espinal. El empleo de estas bombas, sin embargo, puede causar complicaciones debido al riesgo de infección en la zona del implante (Vlieghe y Khrestchatisky, 2013).

5.1.1.3. *Implantes intracerebrales*

Los implantes intracerebrales han sido diseñados para liberar de manera controlada el fármaco en la zona cerebral de interés, y han sido especialmente estudiados en el tratamiento contra tumores cerebrales. Estos implantes son polímeros biodegradables capaces de encapsular fármacos en su matriz, y una vez implantados, van degradándose, liberando de este modo el fármaco en el parénquima cerebral. Actualmente ya se comercializa un polímero biodegradable llamado Gliadel® como terapia adyuvante. Este polímero contiene el agente quimioterapéutico carmustina, y se implanta en la cavidad de la resección tumoral con el objetivo de combatir localmente y prevenir la recurrencia del glioma maligno (Huyhn *et al.*, 2006; Chaichana *et al.*, 2015; Papademetriou y Porter, 2015). La carmustina se libera durante un período de 5 días, a medida que el polímero se degrada. El polímero, sin embargo, tarda unas 6 semanas en degradarse por completo (Fleming y Saltzman, 2002). De todas las técnicas invasivas descritas, esta es la única que ha sido aprobada para su uso en humanos junto con las bombas implantables intratecales. Existen también otros diseños poliméricos que se están estudiando a nivel experimental, pero que aún no se han estudiado en humanos (Chaichana *et al.*, 2015).

El uso de polímeros biodegradables no comprende tantos riesgos como el uso del catéter. Además, los polímeros permiten una liberación sostenida del fármaco a lo largo de su proceso de degradación, a diferencia de la inyección/ infusión volumen-dependiente intracerebral, y pueden ser manipulados en el momento de la cirugía, lo que permite colocarlos en todos los bordes de la cavidad tumoral, en lugar de depender de la ubicación del catéter para administrar el fármaco. Sin embargo, el uso de estos implantes también tiene una serie de desventajas. La liberación sostenida del fármaco tiene una duración determinada, y el uso de un número adecuado de polímeros (preferiblemente 8 polímeros) requiere una cavidad de resección más grande de lo que muchas veces es posible. Además,

la colocación de los polímeros se limita a la cavidad de resección, por lo que no pueden insertarse en áreas peritumorales (Chaichana *et al.*, 2015).

En resumen, las técnicas quirúrgicas, aparte de los riesgos asociados que conllevan, sólo permiten una distribución local y limitada del fármaco, por lo tanto, ni son la mejor alternativa ni pueden considerarse como opción viable para tratar enfermedades que requieren una distribución más amplia y general de los agentes terapéuticos (ej. enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedades de almacenamiento lisosomal). La única ruta para una distribución global y efectiva es la ruta sistémica.

5.1.2. Modificación o disrupción de la BHE

La disrupción o modificación de la BHE consiste en incrementar la permeabilidad de la misma provocando la apertura de las TJ y permitiendo así la entrada de fármacos al parénquima cerebral por la vía paracelular.

5.1.2.1 Disrupción osmótica

La administración de una solución hiperosmótica provoca la apertura temporal y reversible de las TJ, aumentando así la permeabilidad de la BHE y permitiendo el paso paracelular de fármacos. La presión osmótica generada por el ambiente hipertónico hace que las CECC expulsen agua de su interior y se encojan, provocando la desorganización de las proteínas extracelulares de las TJ y dando lugar a pequeños agujeros por los que pasan los fármacos. La solución hipertónica de manitol es la más utilizada en estudios de terapias anticancerosas; se administra por la arteria carótida junto con agentes anticancerosos facilitando su entrada en el cerebro. A pesar de su efectividad, la disrupción de barrera puede dar lugar a daños neuronales irreversibles e infecciones debido a la entrada de sustancias no deseadas provenientes de la sangre (de Boer y Gaillard, 2007; Gabathuler, 2010; Alam *et al.*, 2010; Tajés *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014).

5.1.2.2. Disrupción bioquímica

Varios estudios han demostrado que moléculas vasoactivas como la histamina o la bradiquinina son capaces de provocar la apertura de las TJ. La molécula análoga de la bradiquinina llamada RMP-7 o Cereport™ ha sido ampliamente estudiada para facilitar el transporte de sustancias por la vía paracelular. Actúa sobre los receptores B2 presentes en las CECC provocando la apertura de los complejos interendoteliales a través de un mecanismo de señalización mediado por calcio. A pesar de los prometedores resultados obtenidos en modelos animales y en estudios clínicos de fase I, esta técnica fue abandonada en estudios de fase II y fase III debido a la falta de eficacia al administrarse en combinación con carboplatino y radioterapia (Gabathuler, 2010; Chen y Liu, 2012; Tajés *et al.*, 2014).

5.1.2.3. *Disrupción por ultrasonido*

La aplicación localizada de ultrasonido con la ayuda de técnicas de imagen por resonancia magnética permite la apertura transitoria de la BHE en la zona deseada (Wager *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2014). El uso de esta estrategia junto con la administración intravenosa de microburbujas preformadas que contienen el fármaco resulta prometedor, ya que el proceso cavitacional al que son sometidas las microburbujas en el campo acústico, ayuda a la apertura de la barrera y a una más fácil distribución del fármaco en el cerebro. Además, de este modo, la energía ultrasónica requerida para la disrupción de la BHE es menor, y por tanto, el riesgo de recalentamiento del cráneo también (Hynynen *et al.*, 2001; Gabathuler, 2010; Lu *et al.*, 2014; Burgess y Hynynen, 2016).

5.2. Técnicas no-invasivas

En vista de los riesgos y limitaciones que conllevan las técnicas invasivas, las estrategias para incrementar el transporte de fármacos a través de las CECC de manera no-invasiva parecen mejor opción. Existen diferentes técnicas o aproximaciones mediante las que abordar esta idea, desde la modificación química del propio fármaco hasta el uso de vectores moleculares.

Todas estas estrategias hacen uso de una manera u otra de los mecanismos fisiológicos propios del organismo para que el fármaco alcance satisfactoriamente el tejido nervioso. En muchas de ellas es la misma BHE la que está implicada en el proceso, ya que lo que se pretende es atravesarla de manera no-invasiva a través de diversos mecanismos.

Cabe mencionar que la disfunción de la BHE es una característica implícita en muchas patologías del SNC, como puede ser en el caso de la hipoxia e isquemia, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia, enfermedades lisosomales y tumores cerebrales, entre otras. Dicha disfunción puede ser desde una leve y transitoria disrupción de las TJ hasta una ruptura crónica de la barrera que puede implicar cambios en los sistemas de transporte (Abbott *et al.*, 2010). Aun así, estas alteraciones en la permeabilidad y el transporte suelen ser significativas solamente en estadios avanzados de la enfermedad y en las zonas más afectadas (Oller-Salvia *et al.*, 2016).

5.2.1. Modificación química del fármaco

Una estrategia para facilitar el paso de sustancias de pequeño tamaño a través de la BHE consiste en modificar las propiedades físico-químicas que determinan su permeabilidad. La producción de fármacos análogos lipofílicos, por ejemplo, se basa en la modificación del fármaco añadiendo grupos lipídicos a los grupos polares. Esto resulta en un aumento de la liposolubilidad y en una disminución de la polaridad y capacidad para formar puentes de hidrógeno, y por lo tanto, en un aumento de la difusión pasiva del fármaco (Tajes *et al.*,

2014; Lu *et al.*, 2014). Dicho aumento en la lipofilidad, sin embargo, incrementa la interacción inespecífica con las membranas celulares, y como consecuencia, disminuye la selectividad por los tejidos diana (Lu *et al.*, 2014). Además, los análogos lipofílicos pueden ser sustrato de las bombas activas de eflujo. Es por ello que la co-administración de inhibidores de estos transportadores de eflujo ha sido utilizada en muchos casos para aumentar su distribución en el cerebro (Chen y Liu, 2012; Oller Salvia, 2015).

Otra estrategia para aumentar la permeabilidad cerebrovascular de moléculas de pequeño tamaño de manera más selectiva consiste en modificar el fármaco de modo que actúe como un sustrato endógeno de transportadores con una elevada expresión en las CECC. Hoy día, diversos fármacos de naturaleza aminoacídica, como la gabapentina y el melfalán, tienen ya uso clínico (Rautio *et al.*, 2008; Oller Salvia, 2015).

La modificación química del fármaco, sin embargo, puede causar la pérdida o disminución de la actividad farmacológica. Es por ello que se empezó a desarrollar el concepto profármaco, que consiste en diseñar derivados estables que puedan biotransformarse (mediante conversión química o enzimática) en la forma activa una vez alcanzada la diana (Rautio *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2014; Oller Salvia, 2015). El caso más conocido es el de la levodopa, utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; el profármaco es transportado a través del transportador LAT1, y una vez atravesada la BHE, es descarboxilado convirtiéndose en dopamina (Rautio *et al.*, 2008; Oller Salvia, 2015).

Esta estrategia es aplicable a fármacos de pequeño tamaño, pero no resulta adecuada en el caso de fármacos de gran tamaño, como son las biomacromoléculas terapéuticas cuyo desarrollo hoy día se encuentra en gran auge. La cationización de péptidos y proteínas ha sido un método de modificación química utilizado en diversos estudios para aumentar su transporte a través de la BHE. La forma catiónica de dichas moléculas, tiene una mayor carga neta positiva, y por lo tanto, mayor facilidad para completar la transcitosis mediante TMA, pero también una mayor distribución en órganos periféricos al ser un transporte no-específico (Alam *et al.*, 2010; Oller Salvia, 2015).

5.2.2. Administración intranasal

La vía de administración intranasal ha sido una ruta de administración alternativa estudiada para evitar el paso a través de la BHE. Las moléculas pueden ser transportadas a través del nervio olfatorio y el nervio trigeminal que conectan la mucosa nasal y el LCR del cerebro de manera no-invasiva y evitando el primer paso hepático (McGowan *et al.*, 2015; Velasco-Aguirre *et al.*, 2015). La distribución del fármaco en este caso también depende del peso molecular y liposolubilidad del mismo; es por ello que varios estudios han implementado el uso de partículas coloidales para enmascarar la naturaleza hidrofílica del fármaco y favorecer así su entrada en el cerebro (Tajes *et al.*, 2014). Esta estrategia, sin embargo, también comprende una serie de limitaciones y desventajas: la tasa de aclaración

mucociliar de la cavidad nasal es rápida, existe riesgo de degradación enzimática del fármaco en la mucosa nasal y puede causar irritación de la misma. Además, cierta cantidad del fármaco administrado puede ser absorbida por la vasculatura y no llegar directamente al SNC (Alam *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2014; McGowan *et al.*, 2015; Velasco-Aguirre *et al.*, 2015).

5.2.3. Nanocarriers

El campo de la nanotecnología se encuentra en gran auge dentro del ámbito médico, y especialmente dentro del área de desarrollo de nuevas tecnologías para el tratamiento de diferentes enfermedades del SNC. Existen diferentes sistemas transportadores coloidales, cuyo tamaño puede variar entre 1 y 1000 nm, y en los cuales el fármaco puede ser encapsulado, disuelto, absorbido, atrapado en el interior de la estructura o conjugado químicamente a la superficie, de modo que se enmascaran sus propiedades físico-químicas y puede ser eficientemente transportado a través de la BHE (Vlieghe y Khrestchatisky, 2013; Lu *et al.*, 2014; Loureiro *et al.*, 2014). Estas estructuras coloidales o *nanocarriers* pueden albergar varias copias de la molécula terapéutica, pueden permitir una liberación controlada de la misma, y además, pueden ser modificadas o funcionalizadas de modo que puedan dirigirse de manera selectiva a los tejidos diana de interés. Otras ventajas o cualidades de estos sistemas son su naturaleza biocompatible, biodegradable, no-tóxica y no-inmunogénica, así como una buena estabilidad en sangre (sin agregarse ni disociarse) y duración prolongada en la circulación sanguínea. Esta prolongada vida media plasmática usualmente se consigue modificando la superficie del *nanocarrier* con el polímero hidrofílico polietilenglicol (PEG) (Chen y Liu, 2012). Se ha demostrado que estos sistemas interactúan con la membrana luminal de las CECC y son transportados a través de la BHE mediante mecanismos endocíticos/transcitóticos, aunque dependiendo de la naturaleza de cada sistema (tamaño, forma, componentes químicos, etc.) el mecanismo variará (Vlieghe y Khrestchatisky, 2013; Lu *et al.*, 2014).

Los sistemas coloidales pueden ser clasificados en sistemas reversibles e irreversibles. Los sistemas reversibles como los liposomas o las micelas, son complejos supramoleculares formados por interacciones intermoleculares no-covalentes como las fuerzas *de Van der Waals* o las interacciones lipofílicas. Sus componentes se unen de manera espontánea bajo condiciones ambientales determinadas (ej. temperatura, pH, polaridad del medio, etc.). Si dichas condiciones cambian, puede darse la disgregación molecular de las unidades que forman el complejo. Esto puede resultar una ventaja si se quiere liberar el fármaco en determinadas condiciones (ej. ante una bajada de pH como ocurre en el tejido isquémico cerebral tras la acidosis láctica), pero también puede resultar un inconveniente si la disgregación se da antes de que el fármaco alcance su diana. Esta naturaleza inestable de los sistemas reversibles, por lo tanto, hace que estos no sean del todo atractivos para la industria farmacéutica y su producción comercial (Ramos-Cabrer y Campos, 2013).

Por el contrario, los complejos no-reversibles como los dedrimeros o nanopartículas (NP, nanocápsulas, nanoesferas, etc.) están formados por uniones covalentes o metálicas que les confieren un alto grado de estabilidad, a la vez que una mayor rigidez y complejidad a la hora de su síntesis y manejo (Ramos-Cabrer y Campos, 2013).

5.2.4. Transporte mediado por vectores moleculares

Los vectores moleculares son moléculas que se conjugan con el fármaco, o *nanocarrier* que lo contiene, para facilitar su paso mediante difusión pasiva o a través de algún sistema de transporte transcelular propio de la BHE, como por ejemplo el TMT, el TMA o el TMR.

Los vectores que promueven el paso de sustancias mediante difusión pasiva o TMT están principalmente enfocados al transporte de fármacos de pequeño tamaño (Oller Salvia, 2015). El TMT implica el uso de vectores que sean sustratos naturales de los transportadores (ej. glucosa, aminoácidos neutros o nucleósidos, entre otros) o análogos de los mismos (Vlieghe y Khrestchatisky, 2013; Oller Salvia, 2015). Este mecanismo es muy selectivo y sensible al sustrato, ya que este provoca el cambio conformacional necesario de la proteína transmembrana para que la sustancia pueda ser transportada (Nagpal *et al.*, 2013). El constructo fármaco-vector resultante, por tanto, debe parecerse en la mayor medida posible al sustrato natural en lo que a estructura y tamaño se refiere (Chen y Liu, 2012; Vlieghe y Khrestchatisky, 2013). Cabe destacar, que los sustratos naturales utilizados como vectores competirán con las moléculas endógenas circulantes, lo que supone un problema a la hora de utilizar esta estrategia. Es por ello que los vectores que promueven el transporte por difusión pasiva, a pesar de su menor selectividad, obtienen mayores tasas de transporte (Oller Salvia, 2015).

El transporte de cargos de mayor tamaño, como pueden ser proteínas, oligonucleótidos, *nanocarriers* o incluso virus, requiere la utilización de mecanismos endocíticos, por lo que en este caso, los vectores están enfocados a otros sistemas de transporte como son el TMA y el TMR. El TMA es un sistema de transporte no-específico, mientras que el TMR requiere la interacción específica ligando-receptor para desencadenar el proceso (Jones y Shusta, 2007; Hervé *et al.*, 2008a). Esto supone una desventaja a la hora de utilizar el TMA como estrategia, ya que la distribución del fármaco se puede dar también en tejidos no deseados. El TMA, sin embargo, es un sistema de transporte más difícilmente saturable que el TMR, por lo que se pueden transportar mayores cantidades de fármaco (Hervé *et al.*, 2008a).

5.2.4.1. Transporte de fármacos mediante TMA

Los péptidos denominados *cell-penetrating peptides* (CPP) son secuencias aminoacídicas de menos de 30 aminoácidos y de naturaleza catiónica o anfipática, capaces de transportar sustancias a través de la BHE de manera no-selectiva y sin necesidad de un receptor. A pesar de que se desconocen los mecanismos de transporte exactos mediante los cuales

actúan estos vectores, y probablemente estos difieran de un tipo de CPP a otro, es generalmente asumible que, al igual que en el caso de las moléculas terapéuticas cationizadas, el transporte se dé vía TMA (Chen y Liu, 2012; Vlieghe y Khrestchatisky, 2013; Oller-Salvia *et al.*, 2016). Uno de los primeros CPP descritos fue el péptido TAT (transactivador de transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1)), seguido de otros péptidos naturales como Antennapedia o Penetratin, y la familia de péptidos Syn-B (familia de vectores derivados de la proteína antimicrobiana protegrina-1) (Tajes *et al.*, 2014). Estos y otros muchos CPP han sido estudiados como vectores para distribuir fármacos en el cerebro de manera eficiente. A pesar de su potencial, también conllevan una serie de limitaciones, ya que pueden provocar efectos tóxicos en células y orgánulos, pueden activar el complemento, no tienen buenas propiedades farmacocinéticas, y tienen una semivida biológica bastante corta, ya que al tener secuencias aminoacídicas ricas en arginina y lisina son muy susceptibles a las enzimas proteolíticas (Vlieghe y Khrestchatisky, 2013).

5.2.4.2. Transporte de fármacos mediante TMR

El uso de vectores que actúan como ligandos de receptores de transcitosis presentes en las CECC es probablemente la estrategia más prometedora para el transporte de moléculas terapéuticas de pequeño y gran tamaño (Figura 7) (Vlieghe y Khrestchatisky, 2013). Debido a que es un mecanismo fisiológico con una alta especificidad, el TMR es considerado un sistema de distribución seguro y efectivo, con gran potencial para liberar fármacos en todo el cerebro de manera global y minimizar su distribución en órganos periféricos (Vlieghe y Khrestchatisky, 2013; Nagpal *et al.*, 2013). Esta estrategia ha sido utilizada para estudiar el transporte de diversos medicamentos biológicos, como son los anticuerpos monoclonales (*monoclonal antibodies*, mAbs) terapéuticos, las proteínas recombinantes, ADN o ARN (Lajoie y Shusta, 2015).

Las CECC expresan un amplio número de receptores implicados en este sistema de transporte específico de transcitosis. Entre los más destacables se encuentran los receptores de insulina, Tf, factores de crecimiento de tipo insulínico (*insulin-like growth factors*, IGF), leptina y lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoproteins*, LDL) (Pardridge, 1997; Gaillard *et al.*, 2005; de Boer y Gaillard, 2007; Tajes *et al.*, 2014). Todos ellos son considerados dianas potenciales para el diseño y desarrollo de vectores capaces de inducir la internalización y transcitosis de fármacos a través del TMR.

William M. Pardridge fue el primero en plantear y estudiar el TMR como estrategia para transportar péptidos terapéuticos a través de la BHE (Pardridge, 1986; Pardridge, 1987). Desde entonces, son ya incontables las estrategias y vectores diseñados, desarrollados y estudiados con el fin de hacer llegar la molécula deseada al parénquima cerebral y ejercer su efecto. El vector puede ser desde un ligando natural endógeno, a un péptido que lo

simule, o un mAb dirigido contra el receptor, capaz de desencadenar al menos el proceso de internalización (Figura 7) (Lajoie y Shusta, 2015). Una gran desventaja de los ligandos naturales con respecto a los mAb es que deben competir con las moléculas endógenas circulantes, lo que dificulta su uso como vectores (Jones y Shusta, 2007; Freskgård y Urich, 2016; Oller-Salvia *et al.*, 2016).

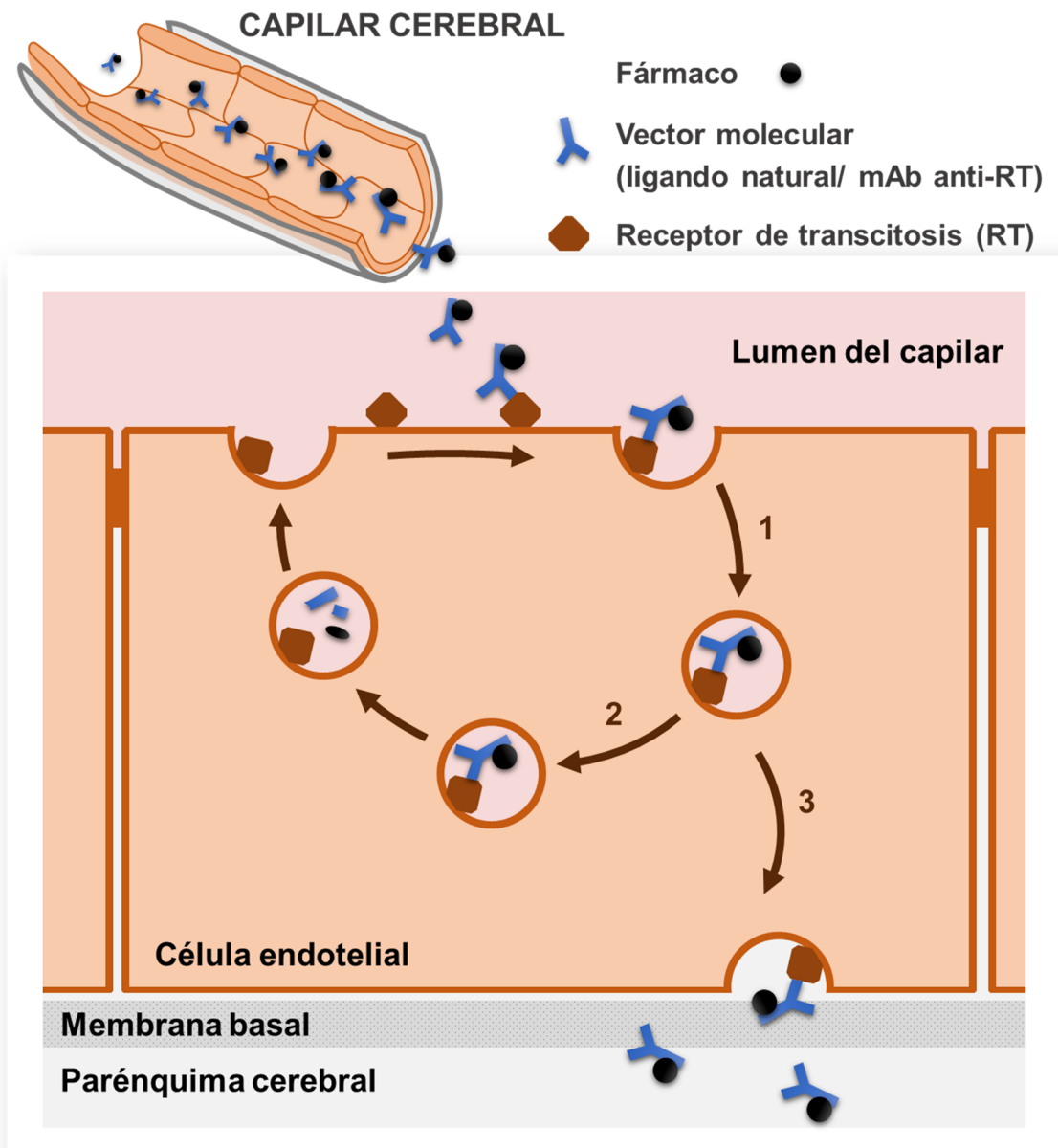


Figura 7. Modelo de transporte de fármacos a través del TMR y posibles destinos del complejo vector-fármaco/receptor. 1) endocitosis del complejo vector-fármaco/receptor; 2) exocitosis del fármaco y vector, y reciclaje del receptor; 3) acumulación del complejo vector-fármaco/receptor dentro de la célula endotelial; 4) degradación del fármaco y el vector.

El uso de estos vectores puede abordarse de dos maneras. Por un lado, el vector puede unirse directamente a la molécula terapéutica mediante uniones químicas (ej. estreptavidina-biotina) o generando proteínas de fusión mediante ingeniería genética. Por otro lado, estos vectores también pueden utilizarse para decorar o funcionalizar *nanocarriers* que contengan el fármaco en su interior y facilitar la liberación de este en el parénquima cerebral (Lajoie y Shusta, 2015).

Los sistemas de transcitosis de la insulina y la Tf son los mejor caracterizados y más estudiados hasta la fecha debido a la alta expresión de sus receptores en la BHE, y por lo tanto, a su gran potencial para ser explotados como medios de transporte para el paso de fármacos al cerebro (Wohlfart *et al.*, 2012; Campos-Bedolla *et al.*, 2014). El siguiente apartado se centra específicamente en el receptor de Tf (*transferrin receptor*, TfR) y en el uso de mAbs dirigidos contra dicho receptor como herramientas para desencadenar la transcitosis de sustancias a través de la BHE, siendo este el principal objeto de estudio de esta tesis.

6. VEHICULACIÓN DE SUSTANCIAS A TRAVÉS DEL RECEPTOR DE TRANSFERRINA

6.1. Tf y TfR

La Tf es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa, cuya función principal es el transporte del hierro desde la sangre a diferentes tejidos (Zheng *et al.*, 2003; Hirose, 2000; Leitner y Connor, 2012; Mayle *et al.*, 2012). El hierro es imprescindible para diversos procesos en el cerebro, como por ejemplo la neurotransmisión, la mielinización, la respiración mitocondrial, el transporte de oxígeno o la proliferación celular (Garrick y Garrick, 2009; Strazielle y Ghersi-Egea, 2013; McCarthy y Kosman, 2015). A pesar de que el transporte de hierro mediado por Tf es el mecanismo más conocido, cabe destacar que no es el único, y que existen mecanismos adicionales no dependientes de Tf para el transporte de hierro como se ha demostrado en diferentes estudios (Zheng y Monnot, 2012; McCarthy y Kosman, 2015), entre ellos el llevado a cabo por Beard *et al.* (2005) en ratones hipotransferrinémicos.

La apotransferrina, es decir, la Tf con ausencia de hierro, se une al Fe^{3+} circulante con una estequiometría de uno a dos, y da lugar a la holotransferrina, o Tf unida a hierro. Los cambios conformacionales que se producen en la proteína cuando se une al Fe^{3+} aumentan su afinidad por el TfR. El transporte del complejo Fe-Tf se puede producir de forma paracelular en otras zonas del organismo, pero en la BHE, la presencia de las TJ impide este paso, reforzando la necesidad de la presencia de TfR en las CECC (Burdo y Connor, 2003).

Existen dos subtipos de TfR: el TfR1 y el TfR2. El TfR1 tiene una afinidad 25 veces mayor por la Tf que el TfR2, y está implicado principalmente en el transporte de hierro, mientras que

el TfR2 participa en el metabolismo del hierro de una manera más global. Por otro lado, el TfR2 se expresa predominantemente en el hígado y en el intestino delgado, mientras que la distribución del TfR1 es menos restrictiva (Mayle *et al.*, 2012; Oller Salvia, 2015). En el SNC, el TfR se expresa de forma heterogénea, se concentra principalmente en las CECC, y en menor cantidad en las células epiteliales del PC y neuronas. Su expresión también es elevada a nivel de hepatocitos, eritrocitos, células intestinales y monocitos (Jefferies *et al.*, 1984; Ponka y Lok, 1999; Moss y Morgan, 2000). El TfR1 es por tanto el que mayor importancia tiene a nivel cerebral, y en el que nos centraremos a partir de ahora, refiriéndonos a él como TfR.

El TfR es una glicoproteína homodimérica transmembrana formada por dos subunidades de unos 90 kDa (Pardridge, 2001; Zheng *et al.*, 2003; Strazielle y Gherzi-Egea, 2013). Estas subunidades están unidas entre sí por dos puentes disulfuro, y cada una de ellas puede unirse a una molécula de Tf (Moos y Morgan, 2000). Cada monómero del TfR puede unirse a una molécula de Tf, por lo que un TfR podrá internalizar hasta cuatro átomos Fe^{3+} a la vez. La unión de la holotransferrina al TfR provoca la internalización del complejo Tf-TfR, que se lleva a cabo mediante un proceso de endocitosis mediado por clatrina (Leitner y Connor, 2012; McCarthy y Kosman, 2015). La vesícula endocítica resultante seguidamente se fusionará con endosomas tempranos y perderá el recubrimiento de clatrina. Durante el proceso de maduración endosomal, el ambiente interno de la vesícula se va acidificando gracias a las bombas de protones ATP-dependientes ($pH \approx 5.5-6$), lo que provocará la disociación entre el hierro y la Tf, y la reducción del hierro de Fe^{3+} a Fe^{2+} (Quian *et al.*, 2002; Ke y Quian, 2002; Hillarieau y Couvreur, 2009; Leitner y Connor, 2012; Zheng y Monnot, 2012; Strazielle y Gherzi-Egea, 2013; McCarthy y Kosman, 2015). El mecanismo por el cual el hierro es después transportado hasta el parénquima cerebral genera mucha controversia, y aún no se ha llegado a un consenso respecto al mismo. Varios autores apoyan la teoría de que el hierro es transportado fuera de la vesícula al citosol mediante el transportador de metales divalentes tipo 1 (*divalent metal transporter 1, DMT1*) (Quian *et al.*, 2002; Leitner y Connor, 2012), mientras que otros abogan la ausencia de este transportador en las CECC (Moos y Morgan, 2004; Moos y Rosengren Nielsen, 2006). En cuanto al transporte del hierro desde el citosol al espacio intersticial del parénquima cerebral, la implicación de la ferroportina y las ferroxiadasas hepaestina o ceruloplasmina sigue siendo tema de debate (Quian *et al.*, 2002; Zheng y Monnot, 2012). La apotransferrina, por su parte, permanecerá unida al TfR dentro del endosoma hasta ser reciclados y llevados de vuelta a la superficie luminal de la CECC, donde el pH fisiológico ($pH \approx 7.4$) hará que la apotransferrina pierda afinidad por el receptor, y sea disociada del mismo y liberada a la circulación (Leitner y Connor, 2012; Strazielle y Gherzi-Egea, 2013; McCarthy y Kosman, 2015). La Figura 8 muestra una de las hipótesis propuestas para el transporte de hierro a través de la BHE.

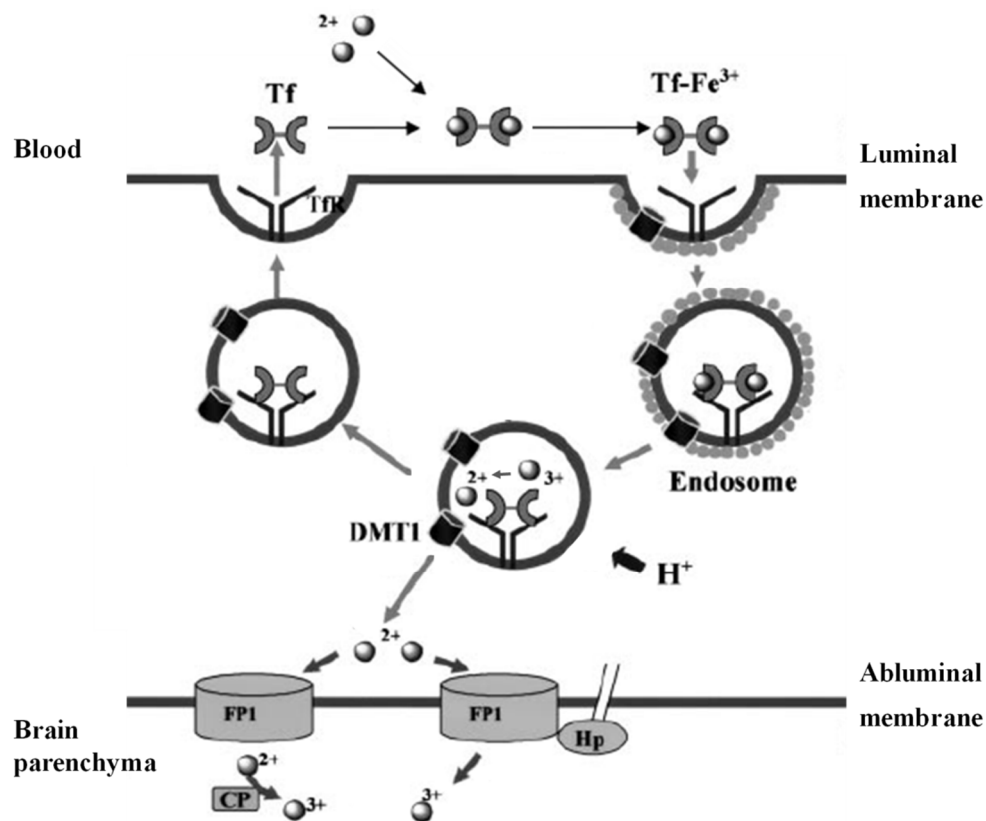


Figura 8. Hipótesis del transporte de hierro mediado por Tf-TfR en el endotelio de la BHE. CP = ceruloplasmina; FP1 = ferroportina; Hp = hepaestina (modificada Quian *et al.*, 2002).

Varios estudios sin embargo apoyan la teoría de que la apotransferrina y el TfR se disocian dentro del endosoma, antes de ser reciclados (Hillarieau y Couvreur, 2009). A pesar de ser esta la hipótesis más aceptada, también se ha postulado un modelo de transcitosis de la Tf, en el que el hierro permanece unido a la holotransferrina y llega a la superficie basal por exocitosis (Descamps *et al.*, 1996; Moos y Morgan, 2004; Leitner y Connor, 2012; Strazielle y Ghersi-Egea, 2013; McCarthy y Kosman, 2015).

6.2. Anticuerpos monoclonales (mAbs)

Debido a su elevada expresión en las CECC (Jefferies *et al.*, 1984), el TfR ha sido una de las principales dianas a la hora de estudiar el TMR como estrategia para transportar fármacos a través de la BHE. Como ya se ha comentado anteriormente, el uso de ligandos naturales, como es en este caso la Tf, presenta el inconveniente de que ha de competir con la molécula endógena, la cual se encuentra en este caso a elevadas concentraciones en plasma (Bickel *et al.*, 2001; Quian *et al.*, 2002). Es por ello que el uso de anticuerpos

peptidomiméticos dirigidos contra receptores presentes en la BHE resulta una buena alternativa para evitar el problema.

El concepto de “*anticuerpos peptidomiméticos*” surgió al observar que varios anticuerpos dirigidos contra receptores peptídicos presentaban las mismas propiedades que las moléculas agonistas (Shechter *et al.*, 1982; Zick *et al.*, 1984; Heffetz *et al.*, 1989; Soos *et al.*, 1989). Algunos de estos anticuerpos eran capaces de inducir el TMR a través de la unión a un epítipo exofacial del receptor, diferente del lugar de unión del ligando endógeno (Pardridge, 2002). Es así como surgió la idea de utilizar estos anticuerpos como vectores o *Caballos de Troya* moleculares para transportar sustancias terapéuticas a través de la BHE (Pardridge, 1986).

Uno de los anticuerpos más estudiados ha sido el mAb OX-26 de ratón dirigido contra el TfR de rata. Jefferies *et al.* (1984) lo utilizaron primeramente para determinar la localización del TfR en la membrana luminal de las CECC. Más tarde se observó también marcaje de OX-26 en neuronas y plexo coroideo, aunque la microvasculatura presentaba un marcaje mucho más destacable (Giometto *et al.*, 1990). Los primeros estudios como posible *Caballo de Troya* molecular fueron llevados a cabo por Friden *et al.* (1991) y Pardridge *et al.* (1991). En ambos estudios marcaron el mAb con un radioisótopo, lo administraron i.v. en rata y detectaron su presencia en el cerebro por radioactividad tras la depleción de capilares. De este modo concluyeron que el mAb sí podía completar la transcitosis y alcanzar el parénquima cerebral, y lo postularon como un potencial *Caballo de Troya* molecular. Moos y Morgan (2001) llevaron a cabo un estudio similar, y observaron que sólo un 6-9% del OX-26 alcanzaba el parénquima cerebral, mientras que la mayoría de anticuerpo se acumulaba en las CECC. La presencia de ese pequeño porcentaje en el cerebro lo atribuyeron a un transporte difásico, en el que el OX-26 era internalizado de manera masiva y específica en las CECC, y un mínimo porcentaje era liberado de manera no-específica por algún otro mecanismo en el cerebro, poniendo en duda la transcitosis mediada por receptor del anticuerpo. Otro estudio llevado a cabo mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica en el que el OX-26 se administraba i.v. conjugado a HRP, concluía que el OX-26 quedaba acumulado mayoritariamente en las CECC, aunque podía percibirse algo de marcaje en la zona perivascular (Broadwell *et al.*, 1996). Diversos estudios han abogado un aumento en la efectividad farmacológica del cargo terapéutico cuando este se administraba unido al mAb o era encapsulado en *nanocarriers* funcionalizados con el OX-26 (Jones y Shusta, 2007).

Existen otros mAbs homólogos al OX-26, como son el 8D3 o el RI7-217, ambos dirigidos con el TfR de ratón (Lesley *et al.*, 1989; Dreier *et al.*, 1998; Kissel *et al.*, 1998). En un estudio comparativo llevado a cabo entre el 8D3 y el RI-217, en el que analizaron su distribución tisular por radioactividad tras la depleción de capilares, se observó que en ambos casos había captación del anticuerpo en el cerebro, pero presentaban perfiles diferentes (Lee *et*

al., 2000). El 8D3 mostraba un pico más alto con una mayor concentración de anticuerpo en el cerebro, pero presentaba sin embargo una menor selectividad ya que también se observó presencia de 8D3 en hígado, y en menor cantidad en riñón. El RI-217, presentaba una mayor selectividad por el tejido nervioso, pero una menor captación.

El anticuerpo 8D3 fue producido por el grupo de la Dra. Britta Engelhardt en el Instituto Max Planck de Bad Nauheim, Alemania (Kissel *et al.*, 1998). Es un anticuerpo producido en rata y dirigido contra el TfR de ratón, y a pesar de haber sido menos estudiado que el OX-26, han sido varios los trabajos publicados en torno al estudio del 8D3 como *Caballo de Troya* molecular (Shi *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2004; Zhang y Pardridge, 2005; Rivest, 2007; Boado *et al.*, 2009). En general, las diferentes sustancias activas que se han intentado internalizar con el 8D3 en experimentos *in vivo*, han dado mejores resultados que al ser administradas libremente sin el 8D3 o con respecto a los controles pertinentes. Sin embargo, no se ha llegado a dilucidar el mecanismo por el cual el mAb y/o la sustancia activa atraviesan la BHE.

Dada la controversia generada por los resultados contradictorios obtenidos de diferentes estudios, parece necesario arrojar luz sobre cómo funcionan estos mAb y si verdaderamente resultan eficientes para transportar sustancias a través de la BHE. La falta de análisis más exhaustivos mediante técnicas microscópicas que permiten la detección y localización directa del mAb y/o cargo, así como el desconocimiento existente en cuanto a los procesos celulares e intracelulares mediante los cuales actúan estos mAbs en la BHE han sido la base y premisa a la hora de plantear la hipótesis de estas tesis.

Las buenas expectativas generadas por estudios previos hacen del 8D3 un potencial candidato para ser utilizado como vector molecular. Esta tesis está enfocada al estudio del anticuerpo 8D3 y al uso del TMR como estrategia para transportar sustancias a través de la BHE.

II. OBJETIVOS

El objetivo global del presente trabajo es estudiar la viabilidad del anticuerpo 8D3, dirigido contra el TfR presente en los capilares sanguíneos cerebrales, como posible Caballo de Troya molecular para transportar sustancias a través de la BHE de ratón. Así mismo, estudiar los mecanismos fisiológicos, celulares e intracelulares, por los cuales el 8D3 y/o su carga a vehicular podrían ser transportados a través de la BHE y aportar así nueva información para optimizar el TMR como estrategia para distribuir eficientemente fármacos en el cerebro.

En concreto se han formulado los siguientes objetivos:

1. Confirmar, mediante microscopía de fluorescencia, la reactividad del 8D3 por el TfR presente en las CECC tras su administración *in vivo*.
2. Estudiar, mediante microscopía de fluorescencia, la capacidad transcitótica del 8D3 tras su administración *in vivo*.
3. Desarrollar un inmunocomplejo (IC) formado por el 8D3 (vector molecular) y fragmentos Fab' (simulación de carga a vehicular).
4. Estudiar, mediante microscopía de fluorescencia, la localización, colocalización y estabilidad de los componentes del IC generado tras su administración i.v. y a diferentes tiempos de recirculación.
5. Desarrollar un IC formado por el 8D3 (vector molecular) y nanopartículas de oro (AuNPs, simulación de carga a vehicular) para realizar un estudio a nivel de microscopía electrónica.
6. Estudiar, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), la localización subcelular del conjugado 8D3-AuNP en la BHE tras su administración i.v. y a diferentes tiempos de recirculación.
7. Estudiar a nivel tridimensional la localización subcelular del conjugado 8D3-AuNP en la BHE tras su administración i.v. y aplicando la técnica *Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy* (SBF-SEM).
8. Establecer y caracterizar un patrón tiempo-dependiente de internalización endocítica y procesamiento endosomal del conjugado 8D3-AuNP en la BHE.

III. RESULTADOS

1. ARTÍCULO 1

**STUDY OF THE TRANSCYTOSIS OF AN ANTI-TRANSFERRIN
RECEPTOR ANTIBODY WITH A FAB' CARGO ACROSS THE BLOOD-
BRAIN BARRIER IN MICE**

Gemma Manich, Itsaso Cabezón, Jaume del Valle, Joaquim Duran-Vilaregut,
Antoni Camins, Mercè Pallàs, Carme Pelegrí, Jordi Vilaplana

European Journal of Pharmaceutical Sciences 2013, 49, 556-564

DOI: 10.1016/j.ejps.2013.05.027

RESUMEN

Objetivos: Determinar la viabilidad del anticuerpo 8D3, dirigido contra el TfR presente en las CECC, como *Caballo de Troya* molecular para transportar sustancias a través de la BHE. Se pretende en primer lugar desarrollar un inmunocomplejo (IC) formado por el 8D3 como *Caballo de Troya* y fragmentos Fab' como carga a vehicular; posteriormente, administrar vía i.v. el 8D3 sólo o el IC en ratón, estudiar su distribución en el cerebro, y analizar la localización y colocalización de los componentes a diferentes tiempos de recirculación.

Material y métodos: En todos los experimentos se utilizaron ratones ICR-CD1 machos de 7-9 semanas de edad.

Se obtuvieron cortes de cerebro de un primer grupo de animales para primeramente confirmar la reactividad del 8D3 con el TfR presente en los capilares sanguíneos cerebrales mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estos cortes se usaron también para determinar, en segundo lugar, la proporción óptima de 8D3 y Fab' para la formación de los IC.

En un segundo grupo de animales, el anticuerpo 8D3 fue administrado por vía i.v., y se dejó recircular durante 20 minutos por el torrente sanguíneo antes de llevar a cabo el sacrificio y proceder a su detección en cortes cerebrales.

Un tercer grupo de animales recibió la administración i.v. del IC 8D3: Fab' a una proporción 1:4 (proporción óptima previamente establecida). Dichos animales fueron divididos en dos subgrupos; la mitad de los animales fueron sacrificados después de 2.5 h de recirculación, y la otra mitad después de 24 h.

Para llevar a cabo los estudios de localización y colocalización del 8D3 y de los componentes del IC tras su administración i.v., se emplearon técnicas inmunohistoquímicas sobre cortes cerebrales obtenidos del segundo y tercer grupo de animales. Se utilizó el anticuerpo anti-laminina como marcador de vasos. Para la detección de los componentes administrados, sólo hizo falta la incubación de los anticuerpos secundarios dirigidos contra los mismos. Para estudiar la estabilidad del IC y los posibles cambios en la colocalización de los componentes del IC a diferentes tiempos de recirculación, se utilizó la técnica del FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

Con el fin de visualizar directamente el 8D3 sin necesidad de inmunohistoquímica, un cuarto grupo de animales recibió la administración del 8D3, previamente conjugado a isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*, FITC).

Por último, con el fin de localizar el IC en el cerebro de ratón sin necesidad de inmunohistoquímica, un quinto grupo de animales recibió la administración de un IC

formado por 8D3 y fragmentos Fab' unidos a FITC (8D3-Fab'^{FITC}). La proporción 8D3:Fab' se mantuvo a 1:4.

Todos los animales utilizados en este estudio fueron anestesiados y perfundidos con suero salino vía intracardíaca. Tras su extracción, los cerebros fueron congelados en isopentano y guardados a -80°C. Posteriormente, se obtuvieron secciones criostáticas cerebrales que fueron fijadas en acetona y congeladas a -20°C hasta su utilización en ensayos inmunohistoquímicos y posterior análisis por microscopía de fluorescencia y confocal.

Resultados: El anticuerpo 8D3 fue detectado a nivel de capilares sanguíneos cerebrales al incubarlo sobre corte, corroborando por tanto su reactividad con el TfR presente en las células endoteliales de la BHE. Tras su administración i.v., el 8D3 fue también detectado por inmunohistoquímica en los capilares sanguíneos cerebrales, demostrando que se une *in vivo* a la pared de las células endoteliales mediante el TfR. El patrón granular del marcaje sugiere cierto proceso endocítico mediante el cual el 8D3 podría haber sido internalizado en la célula endotelial. El marcaje simultáneo con laminina delimita externamente el marcaje granular del 8D3, sugiriendo que éste queda retenido en las células endoteliales.

En el caso del IC administrado vía i.v., la localización de ambos componentes se limita a los capilares sanguíneos, con un alto grado de colocalización de los componentes tanto a 2.5 h como a 24 h, y con un patrón de marcaje granular; estos resultados indican que el 8D3 y los fragmentos Fab' permanecen unidos, o al menos en el mismo compartimento endosomal. El marcaje simultáneo con laminina delimita externamente el marcaje del IC, sugiriendo que éste queda retenido en las células endoteliales. El análisis mediante FRET reveló una mayor colocalización de los componentes del IC a las 2.5 h que a las 24 h, siendo los valores medios de eficiencia de 11.75% (± 0.51) y 6.43% (± 0.67) respectivamente. Estos resultados sugieren una pérdida de colocalización a lo largo del tiempo, ya sea por disociación de los componentes o por su degradación.

Tanto el 8D3^{FITC} como el IC 8D3-Fab'^{FITC} administrados i.v. mostraron un patrón de marcaje similar a los anteriores casos, delimitado nuevamente por el marcaje simultáneo con laminina. La señal observada era mayor en el caso del IC 8D3-Fab'^{FITC}, probablemente debido a una mayor cantidad de FITC por molécula 8D3.

En ninguno de los casos se ha observado fluorescencia más allá de la membrana basal alcanzando el parénquima cerebral.

Conclusiones: El anticuerpo 8D3 administrado i.v., sólo o con carga añadida, es capaz de unirse y quedarse retenido en las CECC. Sin embargo, ni el 8D3 ni el IC parecen haber atravesado la BHE, y por consiguiente, haber alcanzado el parénquima cerebral. La disminución de la colocalización entre el 8D3 y los fragmentos Fab' que se observa al pasar de 2.5 h a 24 h sugiere algún tipo de procesamiento del IC dentro de las CECC.



Study of the transcytosis of an anti-transferrin receptor antibody with a Fab' cargo across the blood–brain barrier in mice



Gemma Manich^a, Itsaso Cabezón^a, Jaume del Valle^{a,d}, Joaquim Duran-Vilaregut^{a,d}, Antoni Camins^{b,c}, Mercè Pallàs^{b,c}, Carme Pelegrí^{a,d,1}, Jordi Vilaplana^{a,d,*,1}

^a Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^d CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 January 2013

Received in revised form 28 May 2013

Accepted 28 May 2013

Available online 7 June 2013

Keywords:

Blood–brain barrier

Transferrin receptor

8D3 antibody

Receptor-mediated transcytosis

ABSTRACT

One strategy used to transport pharmacologically active substances across the blood–brain barrier (BBB) is to link the substance to a molecule capable of crossing the BBB using a receptor-mediated transcellular transport system in brain capillary endothelial cells. The transferrin receptor (TfR) is related to a transcytosis process in these cells, and the 8D3 antibody, directed against mouse TfR, is able to induce a receptor response. In this work, the potential of 8D3 to carry molecules across the BBB was investigated. This antibody (either unlabeled or FITC-labeled) was intravenously administered to ICR-CD1 mice. Immuno-complexes (ICs) consisting of 8D3 antibody (carrier) and Fab' fragments (simulated cargo), in some cases directly fluorolabeled with FITC, were also administered to ICR-CD1 mice. At different time-points of recirculation, the IC components were studied using immunohistochemical procedures and fluorescence resonance energy transfer (FRET). The results suggested that 8D3 alone or in an IC with Fab' fragments entered the endothelial cells. FRET analysis indicated that the colocalization of their fluorescent signals inside the endothelial cells decreased with time, indicating that ICs can be processed and Fab' fragments probably separated from 8D3. However, neither 8D3 alone nor the IC components crossed the BBB.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Due to the physical and physiological barrier properties of the blood–brain barrier (BBB), the transport of neuropharmaceutical drugs from the blood to the brain is extremely difficult and has become a major pharmaceutical challenge in recent decades. Only lipophilic molecules with a molecular mass under a 400–600 Da threshold are able to cross the BBB (Pardridge, 1998; de Boer and Gaillard, 2007). Furthermore, efflux transport systems such as P-glycoprotein present in the brain capillary endothelial cells

(BCECs) are able to export some of these small drugs back to the blood (Begley, 1996; Pardridge, 1998; de Boer et al., 2003; Terasaki and Ohtsuki, 2005). Thus, 98% of all small molecule drugs and almost 100% of large molecule drugs are unable to cross the BBB. For these reasons, most neurodegenerative diseases currently have few treatment options (Pardridge, 2005).

As a result of these barrier properties and in order to regulate and maintain brain homeostasis, the BBB is endowed with different transcellular transport systems that allow the selective passage of substances into and out of the brain (de Boer et al., 2003; Jones and Shusta, 2007). Harnessing these transport systems has been considered a useful and noninvasive strategy for the delivery of drugs that cannot cross the BBB by themselves. One of these transport systems is the receptor-mediated transport mechanism, in which substances cross BBB by a transcytosis process (Scherrmann, 2002; de Boer and Gaillard, 2007). Using natural ligands or monoclonal antibodies (MAbs) that bind a particular receptor as Trojan horses by conjugating them with a neurotherapeutic cargo is a strategy that requires further study. The transferrin (Tf) receptor (TfR), which is abundant in brain capillaries (Scherrmann, 2002), has been extensively studied in rodents. The available data suggest that the Tf/TfR pathway is the main route of iron transport across

Abbreviations: AF, Alexa Fluor; BBB, blood–brain barrier; BCEC, brain capillary endothelial cell; BSA, Bovine Serum Albumin; FITC, fluorescein isothiocyanate; FRET, fluorescence resonance energy transfer; IC, immunocomplex; i.v., intravenous; MAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate-buffered saline; PS, positive staining; ROI, region of interest; Tf, transferrin; TfR, transferrin receptor.

* Corresponding author. Address: Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4024505; fax: +34 93 4035901.

E-mail addresses: gemma.mr@gmail.com (G. Manich), itsas_c@hotmail.com (I. Cabezón), jaume.delvalle@gmail.com (J. del Valle), quimdurarvi@yahoo.es (J. Duran-Vilaregut), camins@ub.edu (A. Camins), pallas@ub.edu (M. Pallàs), carmepelegri@ub.edu (C. Pelegrí), vilaplana@ub.edu (J. Vilaplana).

¹ These authors contributed equally to this work.

the BBB (Bradbury, 1997; Moos and Morgan, 1998). Tf-bound iron is internalized in the endothelial cells via TfR-mediated endocytosis. Once inside the cell, iron is dissociated from the Tf–TfR complex due to acidification of the endosome and is released into the cytosol, before being transported to the brain parenchyma (Qian et al., 1997; Moos and Morgan, 1998). Although the fate of the Tf following dissociation from iron has not yet been clarified, some authors support the hypothesis that most of the Tf returns to the luminal membrane with the TfR (Bradbury, 1997; Moos and Morgan, 1998, 2000; Ke and Qian, 2007).

Rat MAbs 8D3 and Ri7 directed against mouse TfR, as well as mouse MAb OX-26 directed against rat TfR, have been shown to be useful tools with which to study the tissue distribution of TfR and TfR-mediated transcytosis across tissue barriers in rodents (Jefferies et al., 1984; Friden et al., 1991; Moos, 1996; Kissel et al., 1998; Lee et al., 2000). Some studies examining the penetration of these MAbs into the brain have concluded that they accumulate in brain endothelial cells but do not cross the BBB (Bickel et al., 1994; Moos and Morgan, 2001; Gosk et al., 2004; Paris-Robidas et al., 2011). However, other studies, most of them using the capillary depletion method or indirect outcome measures such as protein expression or enzymatic activity, have concluded that MAbs are transported across the BBB (Friden et al., 1991; Lee et al., 2000; Shi and Pardridge, 2000; Zhang et al., 2003; Zhang and Pardridge, 2005). Thus, whether or not MAbs targeting TfR undergo receptor-mediated transcytosis remains unclear.

In order to test the viability of 8D3 as a potential molecular Trojan horse for the transport of pharmacologically active substances across the BBB, we developed an immunocomplex (IC) formed from 8D3 and Fab' fragments that simulate the cargo attached to the MAb. Moreover, we studied the brain distribution of the complex following intravenous (i.v.) administration in mice, and the localization and colocalization of its components after different periods of recirculation.

2. Material and methods

2.1. Animals and experimental design

Male ICR-CD1 mice were purchased from Harlan Interfauna Iberica SA (Barcelona, Spain) and kept in standard conditions of temperature ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) and light–dark cycles (12:12 h, 300 lx/0 lx) with access to food and water *ad libitum*. At 7–9 weeks of age (25–35 g body weight), these animals were used for different experimental procedures.

Brain samples were obtained from a first group of animals in order to verify the reactivity of the rat 8D3 antibody (AbD Serotec, UK) with the TfR present in the brain capillary vessels and to study its localization through immunohistochemical techniques. These brain samples were also used to determine the optimal 8D3:Fab' proportion for the formation of the ICs (see below). A second group of animals underwent i.v. administration of 100 μg of 8D3 antibody in the caudal vein. After 20 min of recirculation, brain samples were taken and localization of 8D3 was determined via immunohistochemical techniques. A third group of animals received an i.v. injection of the 8D3–Fab' ICs in the optimal proportions established previously (100 μg 8D3, 1:4 weight/weight 8D3/Fab'). After different periods of recirculation (2.5 h and 24 h), brains were obtained in order to study the localization and colocalization of both components of the IC by immunohistochemistry. Moreover, the fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique was used to accurately determine changes in the colocalization of the two components over time. Control animals in these experiments underwent i.v. administration of ICs formed by serum rat IgG not directed

against TfR (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) and Fab' fragments. In order to directly visualize the administered antibodies, a fourth group of mice received an i.v. injection of 100 μg of 8D3 directly marked with fluorescein isothiocyanate (FITC). The conjugation of 8D3 and FITC was carried out using the Lynx Rapid Fluorescein Conjugation Kit (AbD Serotec, UK). A fifth group underwent i.v. administration of 8D3–Fab' ICs with FITC attached to Fab' (8D3–Fab'^{FITC}). Given that the optimal 8D3–Fab' ratio was 1:4 (as stated above), the IC solution was prepared using (FITC)-conjugated Fab' fragment goat anti-rat IgG (Jackson IR, PA, USA).

All studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the Universitat de Barcelona.

2.2. Brain processing

Animals were anesthetized with 80 mg/kg of sodium pentobarbital by intraperitoneal injection, the thoracic cavity was opened and an intracardiac gravity-dependent perfusion of 50 mL of phosphate-buffered saline (PBS, pH = 7.2) was performed. Thereafter, brains were dissected, frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until sectioning. Frozen brains were then embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA), and 20- μm -thick sections were obtained using a cryostat (Leica Microsystems, Germany) at $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sections at about bregma -2.30 , including the central zone of the hippocampus, were selected according to a mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2001). Slices were picked up on common slides, fixed with acetone at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, allowed to dry at room temperature and finally frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until staining.

2.3. Immunohistochemistry

Slides of brain sections were allowed to thaw at room temperature before being rehydrated with PBS for 5 min. Sections were then blocked and permeabilized with PBS containing 1% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma–Aldrich) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma–Aldrich) for 20 min. Thereafter, they were washed twice in PBS for 5 min and incubated with the primary antibody (see below) for 1 h 30 min in the dark at room temperature. These slides were washed again and then exposed to the fluorescent stained secondary antibody (see below) for 1 h in the dark at room temperature. Five minutes before the end of the second incubation, nuclear staining was performed by adding Hoechst (H-33258, Fluka, Madrid, Spain) reagent at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS to the incubation medium to a final concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Finally, the slides were washed, coverslipped with Prolong Gold anti-fade medium (Life Technologies, Carlsbad, CA), allowed to dry for 3 h at room temperature and stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the dark. Staining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or both primary and secondary antibodies. In double stainings, controls for the cross reactivity of the antibodies were also performed.

In the case of mice that had undergone i.v. administration of 8D3 or ICs, as 8D3 or both 8D3 and Fab' were already in their tissues, it was only necessary to add their respective secondary antibodies in order to detect them. When administered with 8D3–Fab'^{FITC} or 8D3^{FITC}, the fluorescence of the marked components could be directly observed. In order to precisely localize the 8D3 or Fab', in some cases the 8D3 and Fab' stainings were combined with the staining of laminin, a component of the basal membrane of the brain blood vessels, using an anti-laminin antibody.

The following primary antibodies were used: rat MAb 8D3, directed against mouse TfR (1:250; AbD Serotec), and rabbit monoclonal anti-laminin (1:250; Sigma–Aldrich). Alexa Fluor (AF) 555

donkey anti-goat IgG, AF488 or AF555 donkey anti-rabbit IgG and AF488 donkey anti-rat IgG (1:250; Life Technologies) were used as secondary antibodies.

2.4. Image acquisition and processing

Images were taken with a fluorescence laser microscope (BX41, Olympus, Germany) and stored in tif format. All images for each set of experiments were acquired using the same microscope, laser and software settings. Some images for fine colocalization analysis were obtained using a confocal scanning laser microscope (TCS/SP2, Leica Microsystems). Image treatment and analysis were performed using the Image J program (National Institute of Health, USA). Three-dimensional modeling of the blood vessels from the images obtained from the confocal scanning laser microscope was performed using Imaris version 2.7 (Bitplane AG Zürich, Switzerland). For FRET studies, we used a confocal scanner laser microscope (Leica TCS-SP5).

2.5. 8D3 antibody–Fab' fragment IC formation

For the formation of the ICs consisting of rat 8D3 IgG directed against TfR and goat Fab' fragments directed against rat IgG (Jackson IR), it had to be taken into account that, as Fab' fragments are of polyclonal origin, different Fab' molecules would attach to each 8D3. Thus, in order to obtain the maximum number of 8D3 mole-

cules with an attached cargo and the minimum amount of free Fab', solutions containing different 8D3:Fab' ratios were tested, i.e. 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32. Different brain sections were stained with the different solutions of IC as the primary antibody. AF488 donkey anti-rat IgG (Life Technologies) and AF555 donkey anti-goat were used as the secondary antibodies. Sections were observed in a fluorescence microscope and representative images were obtained (Fig. 1A). Fluorescence intensity on the images obtained for every ratio of IC was quantified using the Image J program (National Institute of Health). Arbitrary lines were traced transversally across different blood vessels. The staining profile of AF488 (directed against 8D3 antibody) and AF555 (against Fab' fragment) along each line was plotted and a horizontal background line was drawn over each profile to determine the background level. Another line was drawn at the peak of the profile, corresponding to the blood vessel, to determine the maximum intensity of fluorescence. Finally, for each profile, positive staining (PS) was defined as the maximum intensity minus the background level (Fig. 1B). As expected, PS of AF488 decreased asymptotically as the proportion of Fab' increased, while that of AF555 increased. By means of regression analysis, the AF555 PS vs. proportions of Fab'/8D3 was adjusted to a Michaelis–Menten function. This function was estimated as $Y = 79.35 * x / (1.87 + x)$ with $R = 0.945$ (Fig. 1C). A ratio of 8D3:Fab' at 1:4, with PS near to 75% of V_{max} , was determined as optimal for subsequent i.v. administration. Data were processed using the Statistica program (StatSoft Inc.).

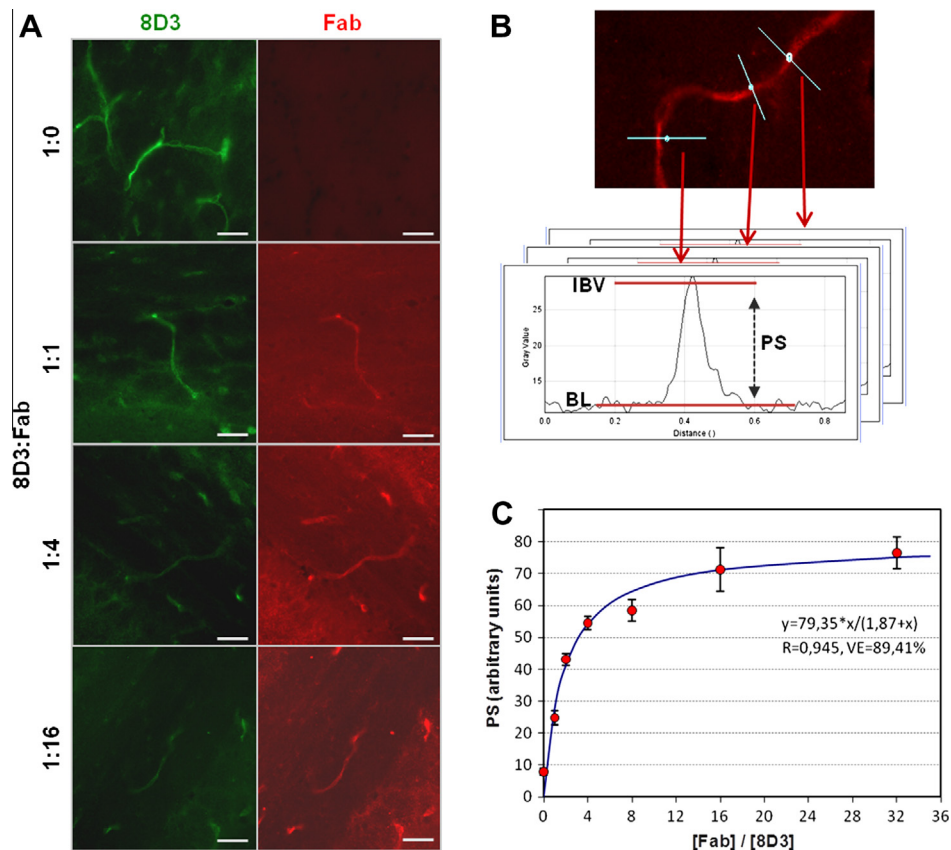


Fig. 1. Determination of the optimal 8D3:Fab' ratio for IC formation. (A) Representative immunostaining performed using different proportions of 8D3:Fab' (1:0, 1:1, 1:4 and 1:16) on mouse brain. Secondary AF488 anti-rat IgG (green colour) was used to detect 8D3 while secondary AF555 anti-goat IgG (red colour) was used to label Fab'. Images of 1:2, 1:8 and 1:32 proportions are not shown. (B) Method used to quantify fluorescence intensity. Arbitrary lines were traced transversally across different blood vessels. The fluorescence intensity profile along each line was plotted in the red and green channels. A horizontal background-line was drawn over each profile at the background level (BL). Another line was traced over the peak of the profile to determine the intensity of the fluorescence on the blood vessel (IBV). Positive staining (PS) was calculated as IBV–BL. (C) Graph of the Michaelis–Menten regression of the PS values of the red channel in function of Fab' :8D3 proportion. A 1:4 ratio was determined as optimal for subsequent intravenous administration. Scale bars: 50 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2.6. FRET studies

FRET studies are based on the presence of donor and acceptor molecules that can transfer energy between each other when separated by less than 10 nm. The donor molecule absorbs light at a frequency that temporarily places that molecule into a higher energetic electronic state. The proximity of one fluorescent acceptor molecule results in the nonradiative transfer of energy from the donor to the acceptor molecule by a dipole-induced dipole interaction. The acceptor molecule can now decay radiatively at its characteristic fluorescence emission wavelength (Cardullo, 2007).

As ICs are formed by 8D3 rat IgG and goat anti-rat IgG Fab' fragments, they can simultaneously be stained with AF488 donkey anti-rat IgG and AF555 donkey anti-goat IgG. Such staining can be used to study the maintenance and stability of the IC in the wall of the blood vessels via FRET. We used AF488 as the donor and AF555 as the acceptor molecules. Microscope images of AF555 emission and AF488 emission (each AF directly stimulated with their excitation frequency) were taken before and after bleaching AF555. When AF555 is bleached it is incapable of accepting energy transfer, and thus donor emission, when directly stimulated, must be increased with respect to the initial conditions. Thus, by quantifying this increase, an indication of the number of molecules implicated in the energy transfer can be obtained.

In order to determine the magnitude of bleaching and efficiency of energy transfer in the region of interest (ROI), we used the following equations:

$$B = 100 * (A1 - A2)/A1$$

$$E = 100 * (D2 - D1)/D1$$

where B is the magnitude of bleaching and E is the efficiency of energy transfer (both expressed as %), $D1$ and $D2$ are the mean intensity of green emission (associated with the emission of AF488) in the ROI before and after bleaching, and $A1$ and $A2$ are the mean intensity of red emission (associated with AF555) in the ROI before and after bleaching. Bleaching must exceed 80% to be acceptable for the FRET study.

2.7. Statistics

Statistical analyzes were performed by means of ANOVA, using STATISTICA for Windows (StatSoft Inc.). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. 8D3 antibody reactivity on mouse brain

The first experiment in this work aimed to test the reactivity of the 8D3 antibody on cryostat sections of mouse brain. An immunohistochemical procedure was applied using 8D3 as the primary antibody. As expected, the staining allowed the visualization of the brain blood capillaries of regions such as cortex, hippocampus and thalamus, where the BBB is present and the TfR is localized in the endothelial cells, but did not allow to visualize the vessels included in the choroid plexus, in which the capillaries are fenestrated and endothelial cells do not present the TfR. A representative image of the hippocampus can be observed in Fig. 2A.

3.2. Detection of 8D3 in brain capillaries after i.v. administration in mice

After checking that 8D3 was capable of binding TfR when applying it directly to brain slices using an immunohistochemical procedure,

we tested whether this antibody was detected in brain capillaries 20 min after i.v. administration of 8D3. Thus, brain sections of treated animals were incubated with a fluorescence-labeled secondary antibody directed against 8D3. In some cases, sections were first incubated with an anti-laminin antibody and subsequently with different secondary fluorescence-labeled antibodies against 8D3 and the anti-laminin antibody. As laminin is a major component of the basal lamina of blood vessels, laminin staining allows the blood vessels to be delimited.

The results showed that, in the same regions observed by direct immunohistochemistry, the brain capillaries contained the 8D3 antibody (see hippocampal sections in Fig. 2B1 and C1). They were stained with only the secondary antibody directed against 8D3, indicating that intravenously administered 8D3 antibody reaches and attaches to the endothelial cells of the brain vessels. It should be noted the granular pattern of 8D3 staining (Fig. 2C1 inset), which contrasted with the fine and smooth staining of the laminin (Fig. 2C2 inset) and suggest some endocytic process of the 8D3 antibody. However, within 20 min of recirculation, the 8D3 antibody was apparently unable to reach the cerebral parenchyma and seemed to remain in the endothelial cells.

The blood vessel shown in Fig. 2C was also scanned by confocal microscopy and the 3D reconstruction of the vessel was performed from the resulting sequence of images. Fig. 2C4 and C5 show the blood vessel from above and below, respectively, revealing that the section only contains the upper half of the longitudinal vessel. When visualized from above (Fig. 2C4), only the laminin staining can be observed in the vessel. The laminin staining surrounds the 8D3 staining, thus preventing its visualization. When the vessel is visualized from below (Fig. 2C5), the 8D3 staining can be observed, internally covering the laminin.

Thus, in this approach, the 8D3 antibody seems to remain in the endothelial cells that constitute the wall of the blood vessels. However, although in this model the 8D3 staining appears as a continuous layer, it actually presents a granular or vesicular pattern. It is possible to obtain a pattern similar to the granular one of 8D3 by changing the tuning parameters in the 3D model (Fig. 2C7–C9). In this case, it seems that some 8D3 staining is observed in the cerebral parenchyma, outside the laminin-delimited region. However, this staining is not present in the individual images and seems to be an artifact caused by the background staining rather than the result of 8D3 extravasation. In any case, the 3D modeling allows attempts to describe the observations but does not seem to be a good predictive tool.

3.3. Detection of 8D3–Fab' IC in brain capillaries after i.v. administration in mice

After observing that the intravenously administered 8D3 antibody can be localized in the wall of the brain blood vessels, we proceeded with the i.v. administration of an IC of 8D3:Fab', in a 1:4 ratio. The recirculation time of the IC prior to sacrifice of the animals was 2.5 h or 24 h, as 20 min seemed not enough to allow the antibody to cross BBB, and two mice were sacrificed for each time-point.

The staining performed using fluorescence-labeled secondary antibodies against 8D3 or Fab' fragments on these brain slices allowed observation of the presence of 8D3 and Fab' in the wall of hippocampal blood vessels. In animals with a 2.5 h recirculation time, a clear granular pattern was observed for 8D3 and for its Fab' cargo (Fig. 3A1 and A2, respectively), as well as high colocalization between the two stains (Fig. 3A3), indicating that the two components of the IC are mostly united or at least located in the same compartment. The combination of 8D3 or Fab' staining with that of laminin (Fig. 3B and C, respectively) demonstrated once again

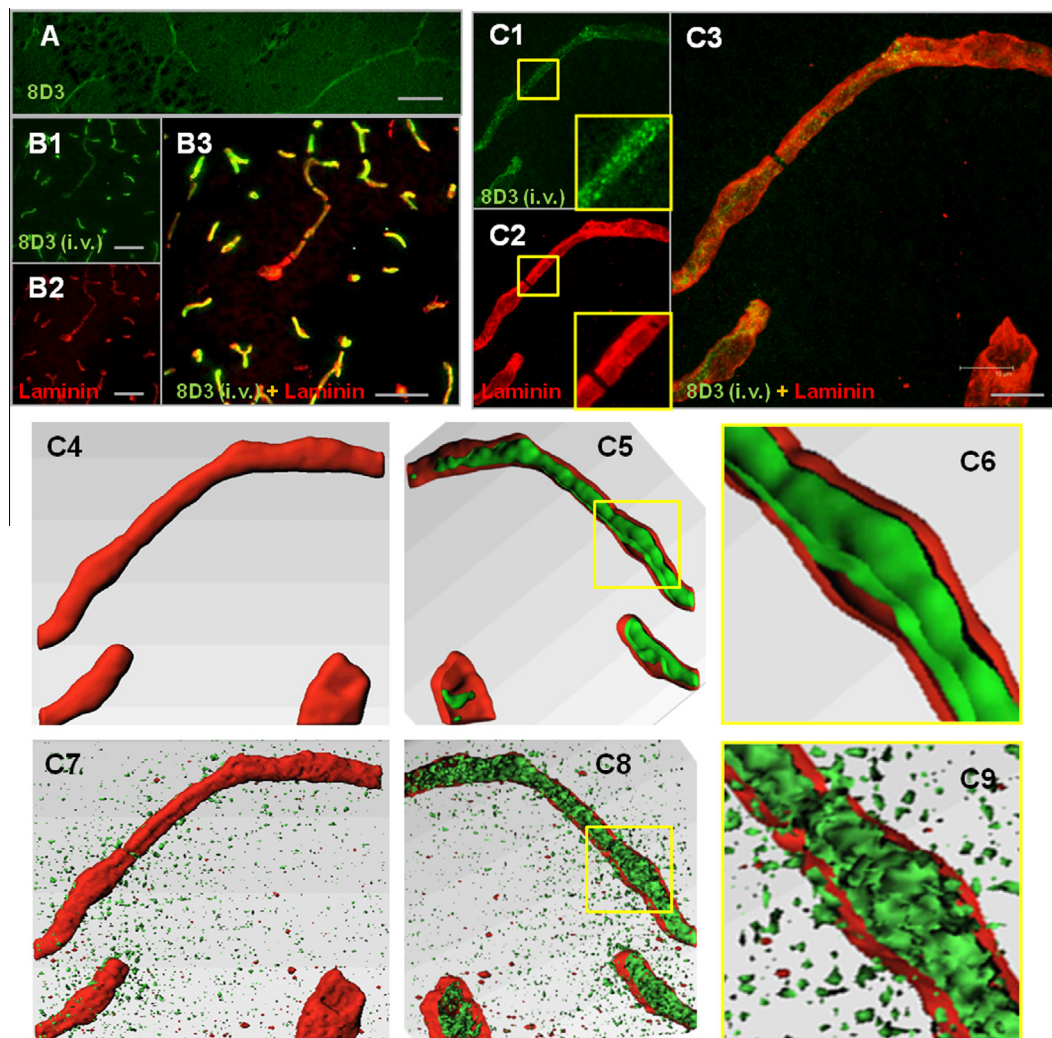


Fig. 2. (A) Immunohistochemical labeling of mouse brain sections with the primary 8D3 MAb targeting murine TfR and the secondary AF488 anti-rat IgG (green colour). (B and C) Brain sections from a representative mouse which received the 8D3 antibody intravenously. The sections were stained with the AF488 anti-rat IgG to detect the administered 8D3 (green colour) and with an anti-laminin antibody as a primary and AF555 as a secondary antibody (red colour) to detect the basal lamina of brain capillaries. After intravenous administration of 8D3, the antibody could be found in brain capillaries but not in parenchyma. The granular pattern of the 8D3 staining (C1 inset) contrasts with the uniform staining of the laminin (C2 inset). C4–C6 and C7–C9 show images of two different 3D reconstructions of the vessel shown in C3. See text for more details. Scale bars: 10 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that both 8D3 and Fab' cargo seemed to be located inside the region delimited by laminin.

Fig. 4 shows representative images of the 8D3 and Fab' fragments from a blood capillary of the hippocampus of four animals, two for each recirculation time. No differences are apparent between 2.5 and 24 h of recirculation. At both time-points, staining showed a granular pattern and high colocalization between the 8D3 and Fab' staining.

In control animals, which were given an i.v. dose of IC formed from rat IgG (not directed against TfR) and Fab', also in a 1:4 ratio, neither IgG nor Fab' staining was observed in brain sections, thus indicating that the IC is not retained in the endothelial cells if it does not include an antibody directed against TfR (data not shown).

3.4. Study of the stability of the IC by FRET

In order to study the maintenance and stability of the IC in the wall of the blood vessels, a FRET study was performed. For each animal, five blood vessels were analyzed. For each blood vessel,

the ROI was defined and the emission intensity of the donor and the acceptor when directly stimulated was obtained before and after bleaching the acceptor. Fig. 5A illustrates the process performed for one blood capillary.

For each vessel the magnitude of bleaching was calculated and also the efficiency of energy transfer. In all cases the bleaching exceeded 85% and was considered optimal for this study. Fig. 5B shows the mean of the efficiency of energy transfer for the analyzed blood vessels for each animal. An ANOVA was performed, defining 'Efficiency of energy transfer' as the dependent variable and 'Time of recirculation' and 'Animal' as fixed and random factors respectively. The ANOVA indicated that 'Animal' had no effect on efficiency ($F_{2,15} = 1.995$; $p > 0.170$), while 'Time of recirculation' had a significant effect ($F_{1,2} = 22.37$; $p < 0.05$), with efficiency of energy transfer being higher in animals that were sacrificed 2.5 h after IC administration than in animals sacrificed 24 h later. Thus, the components of the IC after 2.5 h of recirculation are significantly nearer than after 24 h. The efficiency mean values were 11.75% (± 0.51) for the first group and 6.43% (± 0.67) for the second one.

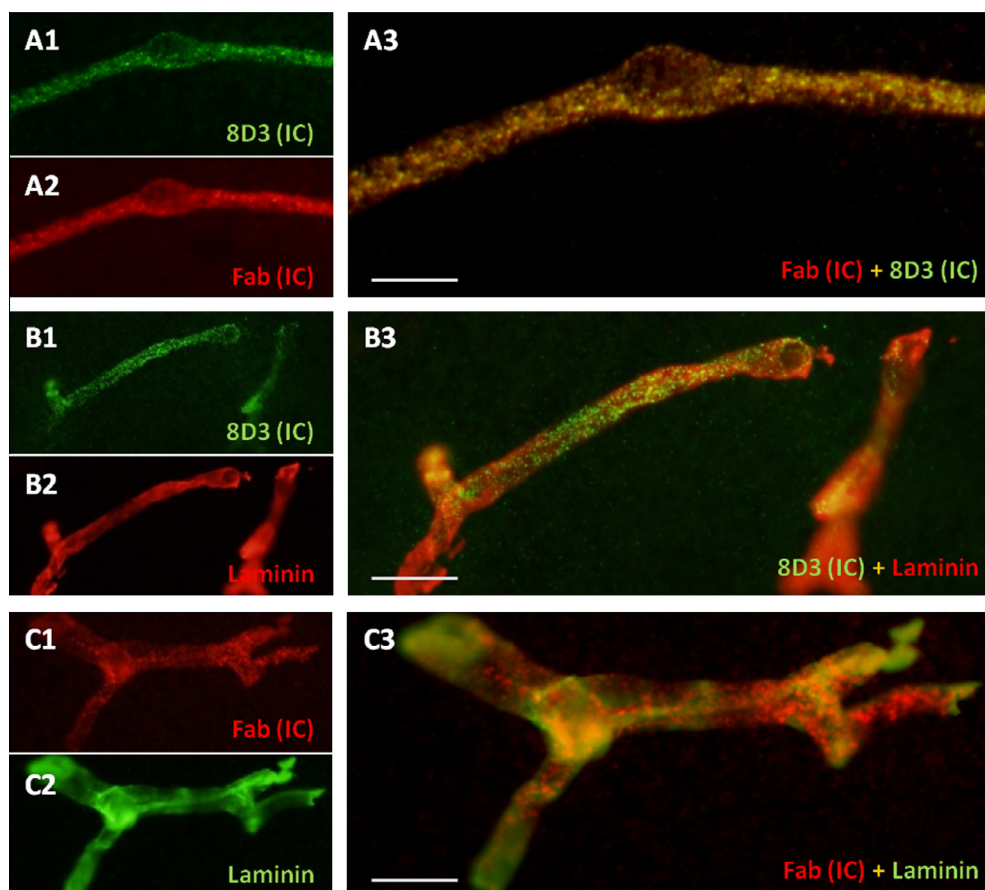


Fig. 3. Localization of the components of the IC (8D3:Fab' 1:4) in brain capillaries of the hippocampus after 2.5 h of recirculation. (A) Localization of the 8D3 antibody with a secondary AF488 anti-rat IgG (green colour) and of Fab' components with a secondary AF555 anti-goat IgG antibody (red colour). High colocalization (yellow colour) of 8D3 and Fab' can be observed, and both components exhibit a granular pattern. (B and C) Simultaneous staining of laminin, detected with a secondary AF488 or AF555 anti-rabbit IgG, and 8D3 or Fab' components. 8D3 and Fab' seem to be localized inside the basal lamina stained with laminin. Scale bars: 10 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.5. Detection of 8D3^{FITC} and 8D3-Fab'^{FITC} in brain capillaries after *i.v.* administration in mice

When 8D3^{FITC} was intravenously administered and mice were sacrificed after 2.5 h of recirculation, it was possible to directly visualize the FITC fluorescence in the cerebral tissue using a fluorescence or a confocal microscope, and no immunostaining was needed.

The results once again showed the presence of 8D3 in the wall of the blood vessels, with a marked vesicular appearance. When this was combined with a staining with an antibody directed against laminin, it was apparent that the fluorescence did not seem to cross the region defined by laminin (data not shown), thus indicating that 8D3^{FITC} or FITC remain in the vascular wall.

When the same protocol was applied using 8D3-Fab'^{FITC}, we observed. A high signal amplification with respect to 8D3^{FITC} and this again illustrated that the fluorescence was confined to the region delimited by laminin (Fig. 6). We do not know whether in this case the components of 8D3-Fab'^{FITC} remained together or whether separation had occurred, but in any case we can confirm that there was no fluorescence due to FITC in the cerebral parenchyma and that it remained confined to the walls of capillary blood vessels.

4. Discussion

Some MABs directed against receptors involved in receptor-mediated transcytosis may act as a Trojan horse and transport

across the BBB any attached cargo that could be useful in the treatment of neurological and neurodegenerative diseases. The 8D3 MAB is a candidate Trojan horse, as it is directed against TfR, which is present in the BCECs and is implicated in iron transcytosis across the BBB. In the present work we first verified the ability of the 8D3 MAB to label BCECs. Thereafter, we studied the ability of the 8D3 MAB to bind the receptor when administered intravenously alone or with a Fab' cargo. Finally, we studied their capacity to cross the BBB via transcytosis.

Using several approaches, our results indicate that 8D3 is capable of binding mouse TfR when applied to brain slices. It also binds mouse TfR after intravenous administration, and is also capable of reaching the inside of the endothelial cell, both when administered alone or with a cargo. However, it does not seem to leave the endothelial cell and reach the cerebral parenchyma.

Firstly, the rat MAB 8D3 is capable of binding mouse TfR when applied directly to brain slices and after intravenous administration in mice. These results are consistent with those of Moos (1996) and Kissel et al. (1998), who characterized the presence of the TfR in different mouse tissues using the 8D3 MAB. Furthermore, Paris-Robidas et al. (2011) made a first approach administering fluorolabeled 8D3 and Ri7 anti-TfR antibodies to mice and demonstrated that the antibodies were able to attach to the TfR by measuring fluorescence in brain homogenates. In addition to BCECs, TfRs have also been found on the plasma membrane of neurons (Jefferies et al., 1984; Giometto et al., 1990; Moos 1996) and on reactive astrocytes Orita et al., 1996, but in this work, the 8D3 antibody was only found on BCECs. This is consistent with another

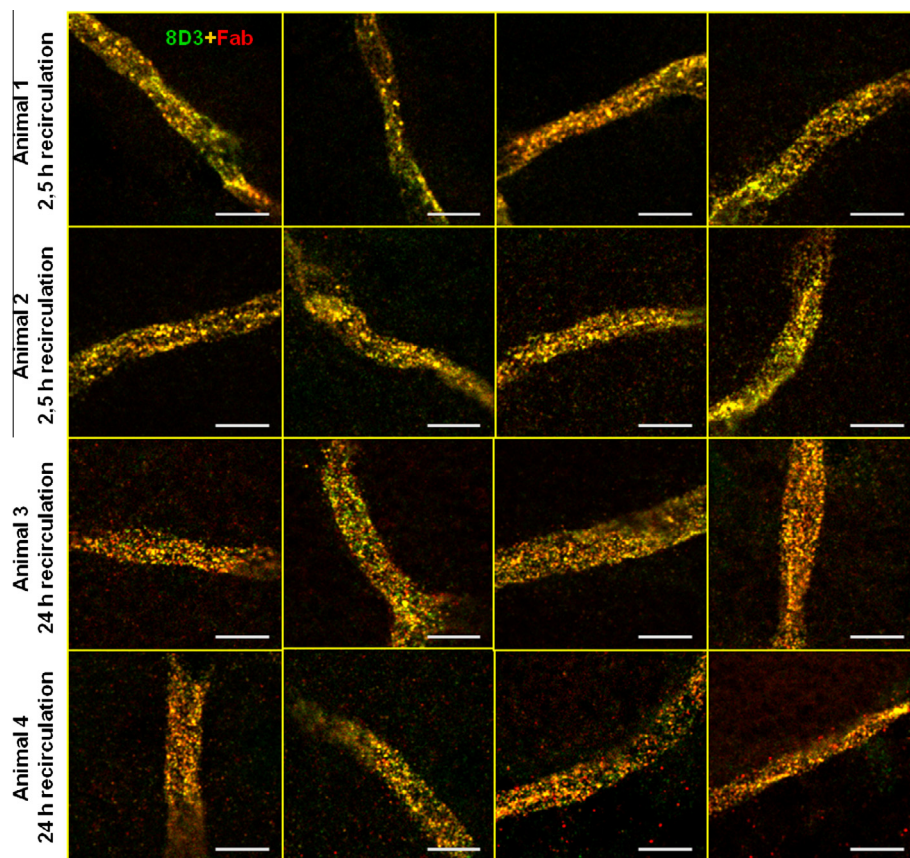


Fig. 4. Images of the double 8D3 and Fab' staining of the IC in brain capillary vessels after 2.5 h (upper images) or 24 h of recirculation (lower images) in administered mice. 8D3 was stained with a secondary AF488 anti-rat IgG (green colour) and Fab' components were detected with a secondary AF555 anti-goat IgG antibody (red colour). At 24 h of recirculation, the colocalization of 8D3 and Fab' (yellow colour) seem to be similar to that observed after 2.5 h of recirculation. Scale bars: 5 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

study in which Ri7 and 8D3 anti-mouse TfR MAbs were used (Paris-Robidas et al., 2011), and studies in rats using the OX26 antibody, directed against rat TfR (Moos and Morgan, 2001; Gosk et al., 2004).

One of the main controversies respect to anti-TfR antibodies is their ability to cross BBB. Some studies have reported the arrival of anti-TfR antibodies in the cerebral parenchyma using indirect techniques. Capillary-depletion experiments conducted by Friden et al. (1991) showed a time-dependent migration of the anti-transferrin receptor OX-26 from capillaries to brain parenchyma. Also using this method, Lee and colleagues reported that 8D3 MAb undergoes receptor-mediated transcytosis (Lee et al., 2000). However, in our experiments the intravenously administered 8D3 antibody seemed to remain at the endothelial level without crossing the BBB. When a 3D reconstruction of the simultaneous staining of 8D3 and laminin was performed in some hippocampal blood vessels, it was apparent that laminin, a basement membrane component, surrounded the region in which the 8D3 antibody was present. This interpretation is further supported by the fact that the vesicular pattern of 8D3 staining observed in the immunohistochemical experiments suggests an endocytic process in which 8D3 and TfR are internalized in the endothelial cells but do not reach the brain parenchyma or the basement membrane. These results support other studies that have not been able to provide evidence of brain uptake of anti-TfR antibodies further than the endothelial cells (Moos and Morgan, 2001; Gosk et al., 2004; Paris-Robidas et al., 2011). However, the possibility that an undetectable amount of the MAb crossed the endothelial cells and reached the brain parenchyma cannot be ruled out.

On the other hand, it has been hypothesized that the Tf-TfR complex undergoes endocytosis and releases the iron into the acidic environment of the endosome, after which the TfR is recycled back to the luminal membrane of the endothelial cells (Moos et al., 2007). Thus, it is possible that the 8D3-TfR complex is retained at the endothelial level.

Another approach conducted here involved intravenously administered ICs formed by the 8D3 antibody and Fab' fragments. We used this strategy as the utilization of antibodies against transcytosis receptors for the purpose of crossing BBB implies a cargo attached to the antibody and allows a relatively reliable simulation of a conjugated vector in order to study the fate of each component of the IC. The first step was to study the optimal ratio of 8D3/Fab' to administer, as to our knowledge there have been no previous studies using this kind of IC. According to the Michaelis-Menten adjustment, a 1:4 ratio ensured a sufficient number of attached molecules and a low number of free Fab' fragments. At both time points of recirculation of the IC, i.e., 2.5 and 24 h, the IC reached the endothelial cells but did not seem to reach the basal lamina. The staining of both components of the IC showed a granular pattern along the wall of the brain capillaries and, remarkably, there was a high colocalization between 8D3 and Fab' stainings. The absence of staining in the wall of the blood vessels when a control IC comprising mouse IgG not directed against TfR and Fab' fragments was administered to mice confirmed that specific binding to the mouse TfR was required (data not shown).

The results obtained from FRET studies, which allowed indirect measurement of the stability of the IC, indicated that after 2.5 h of recirculation there were more Fab' fragments near the 8D3

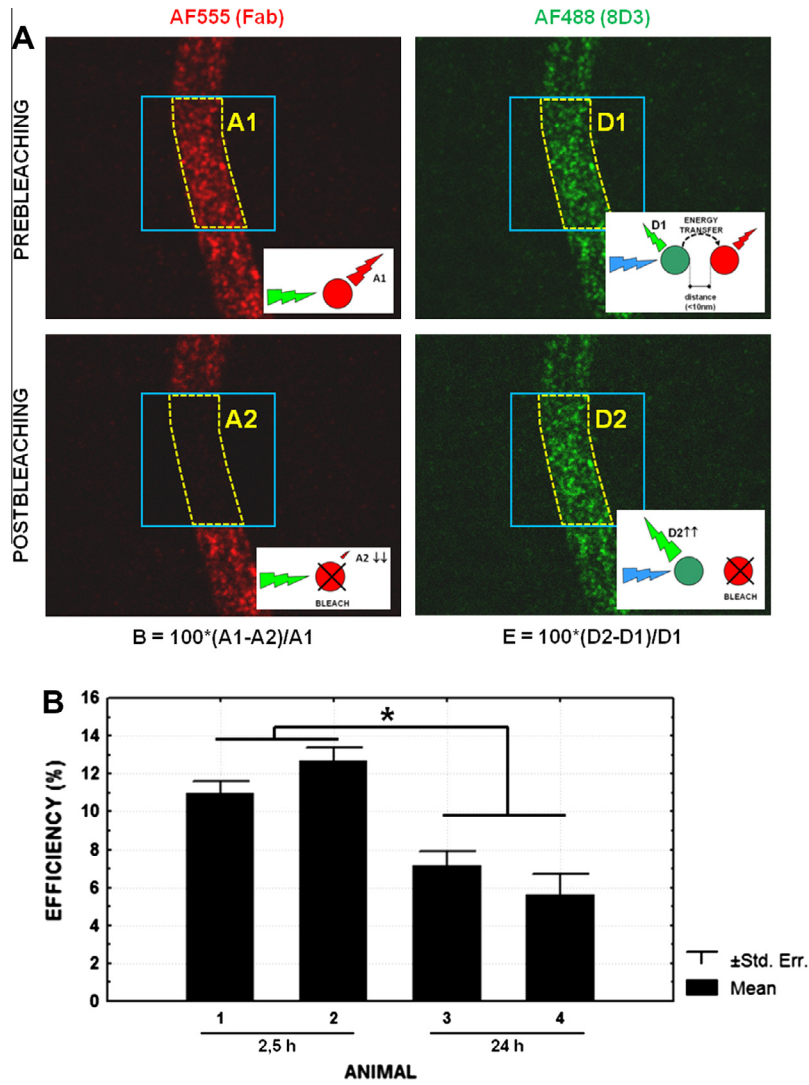


Fig. 5. Study of the stability of the IC by FRET. (A) Process performed for one blood capillary using the FRET technique. The % bleaching and the % efficiency were calculated (see text for details). (B) Efficiency values for the analyzed blood vessels (mean + SEM). Statistics showed that the components of the IC after 2.5 h of recirculation were significantly closer to each other than after 24 h ($p < 0.05$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

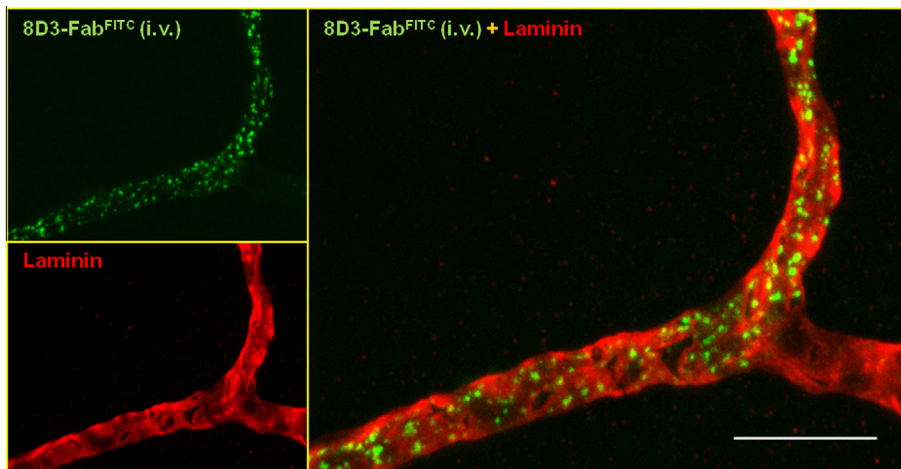


Fig. 6. Localization of intravenously administered 8D3-Fab^{FITC} (green colour) and immunohistochemical staining with a primary antibody against laminin and a secondary AF555 anti-rabbit IgG (red colour) in brain capillaries of the hippocampus. The fluorescence of the administered IC is confined to the region delimited by laminin. Scale bar: 10 μm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

antibodies than after 24 h of recirculation, thus suggesting some kind of processing at the endothelial cells. It is possible that the Fab' fragment can separate from the MAb inside the endothelial cells, but the absence of Fab' staining in the basement membrane seems to indicate that in any case the Fab' fragment does not cross the endothelial cells.

Directly FITC-labeled 8D3 and an IC formed from FITC-Fab' and 8D3 were also i.v. administered to mice, with 2.5 h of recirculation time. Both strategies allowed visualization of FITC staining in the cerebral tissue with no need for immunostaining. Again, marked vesicular staining was observed in the wall of the blood vessels, and particles did not cross the vascular wall. The only difference was that the administration of directly labeled IC led to a higher immunofluorescent signal in vessels than FITC-8D3 alone, due to the presence of several fluorescent Fab' fragments on each 8D3 molecule.

The use of molecular Trojan horses to cross the BBB may be an excellent tool with which to help intravenously administered drugs reach the cerebral parenchyma. Moreover, it is assumed that they act without disrupting the BBB. Such disruption may be toxic to the brain and is associated with chronic neuropathological changes, cerebral vasculopathy and seizures (Neuwelt and Rapoport, 1984; Salahuddin et al., 1988; Pardridge et al., 2007). Several studies have tried to transport biological factors such as vasoactive intestinal peptide (VIP), enzymes or growth factors using molecular Trojan horses, and some positive biological effects have been observed (Wu and Pardridge, 1999; Zhang and Pardridge, 2005; Song et al., 2002). A study that reported the use of 8D3 conjugated to β -galactosidase described an increase in the activity of this enzyme in the brain, but immunohistochemical analysis showed that the localization of the enzyme was limited to the intraendothelial compartment. In contrast, the capillary depletion method showed that more than 90% of the conjugated enzyme crossed the BBB and entered the brain parenchyma (Zhang and Pardridge, 2005). Therefore, although a positive effect has been demonstrated, the mechanism by which the molecule passes across the BBB, whether it is disrupted or intact, and the fate of the MAb and the β -galactosidase, remains unclear.

5. Conclusion

In this study we demonstrate that intravenously administered 8D3, alone or with a cargo, is capable of reaching the endothelial cells of brain capillaries. However, it seems that neither the cargo nor the antibody cross the BBB and reach the brain parenchyma. The decrease in proximity between 8D3 and its cargo at the longest time-point studied suggests that some process takes place over time inside the endothelial cells that requires further study.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grants BFU/2009-08352 and BFU/2010-22149) and by the 'Generalitat de Catalunya' (2009/SGR853). This work is also included in the Nano-trans-brain project (CIBER-BBN). The authors thank M. Calvo, from the *Servei de Microscòpia Òptica Avançada* of the *Universitat de Barcelona*, for her help in the FRET studies.

References

Begley, D.J., 1996. The blood–brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *J. Pharm. Pharmacol.* 48, 136–146.
 Bickel, U., Kang, Y.S., Yoshikawa, T., Pardridge, W.M., 1994. In vivo demonstration of subcellular localization of anti-transferrin receptor monoclonal antibody–colloidal gold conjugate in brain capillary endothelium. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1493–1497.

Bradbury, M.W.B., 1997. Transport of iron in the blood–brain–cerebrospinal fluid system. *J. Neurochem.* 69, 443–454.
 Cardullo, R.A., 2007. Theoretical principles and practical considerations for fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods Cell. Biol.* 81, 479–494.
 de Boer, A.G., van der Standt, I.C.J., Gaillard, P.J., 2003. The role of drug transporters at the blood–brain barrier. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 629–656.
 de Boer, A.G., Gaillard, P.J., 2007. Drug targeting to the brain. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 323–355.
 Friden, P.M., Walus, L.R., Musso, G.F., Taylor, M.A., Malfroy, B., Starzyk, R.M., 1991. Anti-transferrin receptor antibody and antibody–drug conjugates cross the blood–brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 4771–4775.
 Giometto, B., Bozza, F., Argentiero, V., Gallo, P., Pagni, S., Piccinno, M.G., Tavolato, B., 1990. Transferrin receptors in rat central nervous system. An immunocytochemical study. *J. Neurol. Sci.* 98, 81–90.
 Gosk, S., Vermehren, C., Storm, G., Moos, T., 2004. Targeting anti-transferrin receptor antibody (OX26) and OX26-conjugated liposomes to brain capillary endothelial cells using in situ perfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 1193–1204.
 Jefferies, W.A., Brandon, M.R., Hunt, S.V., Williams, A.F., Gatter, K.C., Mason, D.Y., 1984. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* 312, 162–163.
 Jones, A.R., Shusta, E.V., 2007. Blood–brain barrier transport of therapeutics via receptor–mediation. *Pharm. Res.* 24, 1759–1771.
 Ke, Y., Qian, Z.M., 2007. Brain iron metabolism: neurobiology and neurochemistry. *Prog. Neurobiol.* 83, 149–173.
 Kissel, K., Hamm, S., Schulz, M., 1998. Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood–tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody. *Histochem. Cell Biol.* 110, 63–72.
 Lee, H.J., Engelhardt, B., Lesley, J., Bickel, U., Pardridge, W.M., 2000. Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood–brain barrier in mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 1048–1052.
 Moos, T., 1996. Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *J. Comput. Neurol.* 375, 675–692.
 Moos, T., Morgan, E.H., 1998. Evidence for low molecular weight, non-transferrin-bound iron in rat brain and cerebrospinal fluid. *J. Neurosci. Res.* 54, 486–494.
 Moos, T., Morgan, E.H., 2000. Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol. Neurobiol.* 20, 77–95.
 Moos, T., Morgan, E.H., 2001. Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood–brain barrier in the rat. *J. Neurochem.* 79, 119–129.
 Moos, T., Rosengren Nielsen, T., Skjørringe, T., Morgan, E.H., 2007. *J. Neurochem.* 103, 1730–1740.
 Neuwelt, E.A., Rapoport, S.I., 1984. Modification of the blood–brain barrier in the chemotherapy of malignant brain tumors. *Fed. Proc.* 43, 214–219.
 Orita, T., Akimura, T., Nishizaki, T., Kamiryo, T., Ikeyama, Y., Aoki, H., Ito, H., 1990. Transferrin receptors in injured brain. *Acta Neuropathol.* 79, 686–688.
 Pardridge, W.M., 1998. CNS drug design based on principles of blood–brain barrier transport. *J. Neurochem.* 70, 1781–1792.
 Pardridge, W.M., 2005. The blood–brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2, 3–14.
 Pardridge, W.M., 2007. Drug targeting to the brain. *Pharm. Res.* 9, 1733–1744.
 Paris-Robidas, S., Emond, V., Tremblay, C., Soulet, D., Calon, F., 2011. In vivo labeling of brain capillary endothelial cells after intravenous injection of monoclonal antibodies targeting the transferrin receptor. *Mol. Pharmacol.* 80, 32–39.
 Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed. Academic Press, London.
 Qian, Z.M., Tang, P.L., Wang, Q., 1997. Iron crosses the endosomal membrane by a carrier-mediated process. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67, 1–15.
 Salahuddin, T.S., Johansson, B.B., Kalimo, H., Olsson, Y., 1988. Structural changes in the rat brain after carotid infusions of hyperosmolar solutions: a light microscopic and immunohistochemical study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 14, 467–482.
 Scherrmann, J.M., 2002. Drug delivery to brain via the blood–brain barrier. *Vascul. Pharmacol.* 38, 349–354.
 Shi, N., Pardridge, W.M., 2000. Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7567–7572.
 Song, B.W., Vinters, H.V., Wu, D., Pardridge, W.M., 2002. Enhanced neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor in regional brain ischemia after conjugation to a blood–brain barrier delivery vector. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 605–610.
 Terasaki, T., Ohtsuki, S., 2005. Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood–brain barrier: an overview of biology and methodology. *NeuroRx* 2, 63–72.
 Wu, D., Pardridge, W.M., 1999. Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 254–259.
 Zhang, Y., Pardridge, W.M., 2005. Delivery of β -galactosidase to mouse brain via the blood–brain barrier transferrin receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 1075–1081.
 Zhang, Y., Calon, F., Zhu, C., Boado, R.J., Pardridge, W.M., 2003. Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism. *Hum. Gene Ther.* 14, 1–12.

2. ARTÍCULO 2

**TRAFFICKING OF GOLD NANOPARTICLES COATED WITH THE 8D3
ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODY AT THE MOUSE
BLOOD-BRAIN BARRIER**

Itsaso Cabezón, Gemma Manich, Raquel Martín-Venegas, Antoni Camins,
Carme Pelegrí, Jordi Vilaplana

Molecular Pharmaceutics 2015, 12, 4137-4145

DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00597

RESUMEN

Objetivos: Determinar, mediante técnicas de microscopía electrónica, la viabilidad del anticuerpo 8D3 como *Caballo de Troya* molecular para transportar sustancias a través de la BHE. Asimismo, estudiar la localización subcelular y los procesos intracelulares (endocíticos/transcitóticos) que sigue el anticuerpo 8D3 conjugado a nanopartículas de oro (AuNPs) en la BHE tras su administración *in vivo* en ratón y dejándolo durante diferentes tiempos. Además, mediante un análisis cuantitativo, establecer un patrón de tráfico intracelular tiempo-dependiente, y por último, se pretende caracterizar las vesículas que acumulan AuNPs mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Material y métodos: Se recubrieron nanopartículas de oro (AuNPs) de 20 nm de diámetro con el anticuerpo 8D3 mediante unión covalente, a una proporción AuNP:8D3 de 1:30 aproximadamente. En este trabajo, las AuNPs no sólo permiten una directa visualización del conjugado, evitando así inespecificidades en la inmunodetección, sino que también actúan como carga a vehicular. El tamaño y el potencial Z del conjugado 8D3-AuNP también fueron determinados haciendo un análisis por dispersión de luz dinámica (*Dynamic Light Scattering, DLS*).

El conjugado 8D3-AuNP fue administrado vía i.v. en ratones ICR-CD1 machos de 3-5 meses de edad, los cuales fueron divididos en 4 grupos, cada uno con un tiempo de recirculación diferente (10 min, 30 min, 2.5 h, 24 h). Una vez pasado el tiempo de recirculación correspondiente, los animales fueron anestesiados y perfundidos con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1% vía intracardíaca. Tras su extracción, los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 1 mm de grosor, y se seleccionaron y diseccionaron áreas del hipocampo y córtex que posteriormente fueron procesadas hasta obtener los cortes ultrafinos finales de 50-70 nm de grosor. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión para la observación de los cortes y se obtuvieron imágenes de las regiones de interés (*regions of interest, ROIs*) (p. ej. capilares cerebrales con presencia de AuNPs). Para medir en las imágenes el tamaño de las vesículas y del conjugado 8D3-AuNP, se utilizó el programa de análisis y tratamiento de imágenes ImageJ.

Paralelamente, se procesaron varias muestras pertenecientes al último tiempo de recirculación siguiendo un distinto procedimiento con el fin de caracterizar mediante inmunohistoquímica las vesículas intraendoteliales que acumulan las AuNPs. El proceso inmunohistoquímico se llevó a cabo utilizando el marcador lisosomal anti-LAMP1 como anticuerpo primario.

En el análisis de las imágenes, se determinó el porcentaje de AuNPs observadas en cada localización (membrana luminal, pozos de clatrina, en vesículas dentro de las CECC y

membrana basal) y en función del tiempo de recirculación. El patrón de localización vesicular fue a su vez subdividido en función del número de AuNPs que contenían las vesículas. A partir de los datos obtenidos y utilizando el programa STATISTICA para Windows, se creó un *3D surface plot* para representar gráficamente el porcentaje de las AuNPs en función de su localización y tiempo de recirculación. Esta modelización permitió determinar el patrón de distribución tiempo-dependiente de las AuNPs.

Resultados: El análisis observacional de las imágenes obtenidas permitió estudiar la localización de los conjugados 8D3-AuNP a nivel intracelular y a los diferentes tiempos de recirculación. Además, el análisis cuantitativo realizado con los datos obtenidos permitió establecer y caracterizar un patrón tiempo-dependiente de internalización endocítica y procesamiento endosomal del conjugado 8D3-AuNP.

El conjugado 8D3-AuNP es internalizado en vesículas de manera individual a través del TfR y mediante un proceso de endocitosis dependiente de clatrina. Estas vesículas pueden seguir después dos rutas endosomales diferentes. La mayoría de ellas entran en un proceso endosomal de fusión, reorganización y maduración vesicular, en el que las AuNPs terminan acumulándose en endosomas tardíos, cuerpos multivesiculares o lisosomas. Un pequeño porcentaje de las vesículas, sin embargo, consigue escapar de esta ruta y fusionarse con la membrana abluminal, de modo que algunas AuNPs completan la transcitosis alcanzando la lámina basal. En ningún caso se observan AuNPs en el parénquima cerebral. Esto sugiere que el anticuerpo 8D3 que recubre las AuNPs sigue unido al TfR, de manera que las AuNPs no pueden desprenderse de la membrana celular y quedan retenidas en la lámina basal.

La mayoría de las vesículas que contenían AuNPs a las 24 h de recirculación no colocalizaron con el marcaje lisosomal del anticuerpo anti-LAMP1, de modo que las AuNPs se acumulan mayoritariamente en vesículas de naturaleza no-lisosomal, como pueden ser endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares. Dentro de estas estructuras, especialmente en aquellas que contenían un gran número de AuNPs, algunas AuNPs parecen quedar sueltas en el espacio vesicular, mientras que otras parecen seguir unidas a la membrana endocítica, lo que sugiere una disociación entre anticuerpo y receptor, o entre anticuerpo y AuNP.

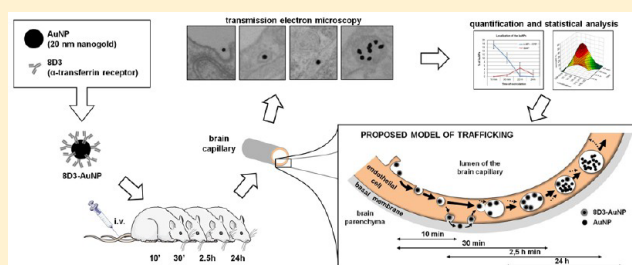
Conclusiones: La mayoría de las AuNPs conjugadas con el anticuerpo 8D3, una vez internalizadas, siguen una ruta de procesamiento endosomal mediante la cual acaban acumulándose mayoritariamente en vesículas de carácter no-lisosomal. Un pequeño porcentaje de las AuNPs observadas consiguen completar la transcitosis, aunque no consiguen disociarse de la membrana luminal, y por tanto, no acceden al parénquima cerebral más allá de la lámina basal del endotelio.

Trafficking of Gold Nanoparticles Coated with the 8D3 Anti-Transferrin Receptor Antibody at the Mouse Blood–Brain Barrier

Itsaso Cabezón,^{†,‡} Gemma Manich,[†] Raquel Martín-Venegas,[†] Antoni Camins,^{‡,§,||} Carme Pelegrí,^{†,||,⊥} and Jordi Vilaplana^{*,†,||,⊥}[†]Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain[‡]Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain[§]Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain^{||}CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, 28031 Madrid, Spain

ABSTRACT: Receptor-mediated transcytosis has been widely studied as a possible strategy to transport neurotherapeutics across the blood–brain barrier (BBB). Monoclonal antibodies directed against the transferrin receptor (TfR) have been proposed as potential carrier candidates. A better understanding of the mechanisms involved in their cellular uptake and intracellular trafficking is required and could critically contribute to the improvement of delivery methods. Accordingly, we studied here the trafficking of gold nanoparticles (AuNPs) coated with the 8D3 anti-transferrin receptor antibody at the mouse BBB. 8D3-AuNPs were intravenously administered to mice and allowed to recirculate for a range of times, from 10 min to 24 h, before brain extraction and analysis by transmission electron microscope techniques. Our results indicated a TfR-mediated and clathrin-dependent internalization process by which 8D3–AuNPs internalize individually in vesicles. These vesicles then follow at least two different routes. On one hand, most vesicles enter intracellular processes of vesicular fusion and rearrangement in which the AuNPs end up accumulating in late endosomes, multivesicular bodies or lysosomes, which present a high AuNP content. On the other hand, a small percentage of the vesicles follow a different route in which they fuse with the abluminal membrane and open to the basal membrane. In these cases, the 8D3–AuNPs remain attached to the abluminal membrane, which suggests an endosomal escape, but not dissociation from TfR. Altogether, although receptor-mediated transport continues to be one of the most promising strategies to overcome the BBB, different optimization approaches need to be developed for efficient drug delivery.

KEYWORDS: blood–brain barrier, receptor-mediated transport, transferrin receptor, monoclonal antibodies, electron microscopy, drug delivery



INTRODUCTION

The blood–brain barrier (BBB) is a well-coordinated and highly selective barrier that only allows lipophilic molecules under 400–600 Da of molecular mass to cross it.^{1,2} Moreover, efflux transport systems present in the endothelial cells of the BBB export some of these small drugs back to the blood. Due to its restrictive properties, the passage of molecules across the BBB still remains a pharmaceutical challenge. Numerous strategies have been proposed to transport therapeutic agents from the blood into the brain, including receptor-mediated transcytosis across the endothelial cells of the brain capillaries.^{2,3} The transferrin receptor (TfR), which is abundant in the brain capillaries,³ has been studied extensively. Some monoclonal antibodies (MAbs) directed against mouse or rat TfR have been shown to be useful tools for studying the tissue distribution of TfR and TfR-mediated transcytosis across the BBB in these rodents, and have been proposed as possible carriers or molecular *Trojan horses* to transport substances across the BBB.^{4–10} Some of these studies have concluded that

these antibodies accumulate in the brain capillary endothelial cells (BCECs) but do not cross the BBB,^{9,11–14} while other studies, most of which have used the capillary depletion method or indirect outcome measures such as protein expression or enzymatic activity, have concluded that MAbs and/or their cargo are transported across the BBB.^{4,8,10,15–17} It has also been suggested that these MAbs target nanoparticles to the BBB for the subsequent release of their encapsulated content.^{16,18–21} Some recent studies^{22,23} have shown that the modification of antibodies' affinity in different ways enhances their transcytosis. However, the intracellular mechanisms that these antibodies or constructs undergo inside BCECs remain unclear.

In the present work we coated gold nanoparticles (AuNPs) with the 8D3 antibody, which is directed against the mouse TfR

Received: July 31, 2015

Revised: September 29, 2015

Accepted: October 5, 2015

Published: October 5, 2015

and has been proposed as a possible molecular Trojan horse to carry pharmacological substances across the BBB. AuNPs not only can be directly observed by TEM, which prevents immunodetection inspecificities, but also can be considered as the cargo to be transported by the 8D3. Using transmission electron microscope (TEM) techniques, we studied the passage of AuNPs across the BBB and their dynamics inside BCECs after *in vivo* administration in mice.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Animals. Male ICR-CD1 mice (three to five months old) were used for the study. They were kept in standard conditions in terms of temperature ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) and light–dark cycles (12:12 h, 300 lx/0 lx) and had access to food and water *ad libitum* until the day of the experiment. All experimental procedures were reviewed and approved by the University of Barcelona Animal Experimentation Ethics Committee (DAAM 7505).

Formation and Characterization of the 8D3–AuNP Conjugates. To form the 8D3–AuNP conjugates, the anti-TfR mAb 8D3 (AbD Serotec, U.K.) was covalently attached to AuNPs measuring 20 nm in diameter using the InnoCoat GOLD (20 nm, 20 OD) Covalent Conjugation Kit (Innova Biosciences, Cambridge, U.K.). Thereafter, the buffer was exchanged to phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 by four centrifugations of 20 min each at 9000g, discarding the supernatant and resuspending the pellet with 1200 μL of PBS until the last centrifugation, where the pellet was resuspended with a final volume of 700 μL of PBS. Finally, the conjugate size and the zeta potential were measured with a Malvern Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments Ltd., Malvern, U.K.). The dynamic light scattering (DLS) analysis provided a Z-average diameter of the conjugate of 46.78 (± 0.13) nm and a polydispersity index (PDI) of 0.209. The Z-potential was -11.2 (± 0.69) mV. The 8D3:AuNP ratio for the conjugates was approximately of 30:1, according to the estimations from Innova Biosciences.

Administration of the 8D3–AuNP Conjugates and Brain Obtention. Mice were anesthetized with isoflurane, and a bolus of 300 μL of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) containing the 8D3–AuNP conjugate at a concentration of 430 μg of 8D3/mL was intravenously injected into the caudal vein. Animals were distributed into four different groups, with each group containing three to four animals. One group of animals was sacrificed after 10 min of recirculation, while the other groups were sacrificed after 30 min, 2.5 h, or 24 h. Once the corresponding time had passed, animals were anesthetized with 80 mg/kg of sodium pentobarbital by an intraperitoneal injection, the thoracic cavity was opened, and an intracardiac gravity-dependent perfusion of 50 mL of PBS followed by 50 mL of paraformaldehyde (PF, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 4% and glutaraldehyde at 0.1% in phosphate buffer 0.1 M was performed. Brains were then removed and stored in the same solution. The same procedures were followed for control animals, but an IgG antibody not directed against mouse TfR (Sigma-Aldrich) was used instead of 8D3. Thus, the control animals received IgG–AuNP instead of 8D3–AuNP.

Brain Sample Processing for TEM. Coronal brain sections 1 mm thick were obtained using a vibratome. The hippocampal and cortical areas were then selected, dissected, and postfixed overnight in PF (Sigma-Aldrich) at 4% and glutaraldehyde at 0.1% in phosphate buffer 0.1 M. The fixative was then substituted for PF at 2%, and tissue samples were

stored in this solution for 3 days. Samples were then washed in PB 0.1 M and treated with 2% osmium tetroxide (OsO_4) containing 0.8% potassium ferrocyanide for 1 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Samples were washed and gradually dehydrated in acetone before being progressively embedded in Epon resin. The blocks polymerized at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h. Semithin sections (1 μm thick) were obtained, and the relevant regions were localized after a methylene blue staining procedure. Ultrathin sections (50–70 nm thick) were obtained using a Leica Ultracut UC6 Ultramicrotome (Leica Microsystems), and the sections were then picked up onto 200 copper mesh grids and poststained with uranyl acetate and lead citrate. Ultrathin sections were examined using a JEM-1010 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) operated at an accelerating voltage of 80 kV. Images were obtained using a CCD Megaview $1k \times 1k$ camera and Analysis 3.2 image acquisition software.

Image Analysis and Treatment. The 8D3–AuNPs and the intracellular vesicles were measured from TEM images using the ImageJ program (National Institutes of Health, Bethesda, MD, US). Results were expressed as the mean value (\pm standard error). To measure vesicle size, the contour of the vesicle was manually traced with the “freehand selection” tool in the ImageJ program, and the Feret diameter (the longest distance between any two points along the selection boundary, also known as the maximum caliper) was determined. In some cases TEM images have been colored by using the ImageJ program in order to improve the visualization.

Data Analysis. 3D surface plots were performed using STATISTICA for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, US). The surface was fitted to the XYZ coordinate data in accordance with the distance-weighted least-squares smoothing procedure, in which the influence of individual points decreases with the horizontal distance from the respective points on the surface.

Brain Sample Processing for TEM Immunostaining. For vesicular immunostaining, samples were fixed and postfixed in the same way as those used for the ultrastructure studies, as described above. Samples were then washed in PB 0.1 M with glycine 0.15 M, gradually infused in glycerol (10%, 20%, 30%) for cryoprotection, frozen in liquid propane at $-188\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Leica EM CPC, Leica Microsystems), and stored in liquid nitrogen at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the freeze substitution process was carried out. Freeze substitution was performed in an Automatic Freeze Substitution System (AFS; Leica Microsystems) with acetone containing 0.5% uranyl acetate for 3 days at $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. On the fourth day, the temperature was slowly raised by $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ per hour to $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Samples were then rinsed in acetone, and infiltrated and embedded in Lowicryl HM20. The blocks polymerized for 24 h at $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 48 h at $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ with ultraviolet light. Ultrathin sections were obtained using a Leica Ultracut UC6 Ultramicrotome (Leica Microsystems) and placed on 200 nickel mesh grids.

Vesicular Immunostaining for TEM. For the immunolabeling process, sections were incubated at room temperature on drops of glycine 50 mM in PBS 10 mM for 5 min, washed, and blocked on drops of 5% BSA for 20 min. Incubation of the primary antibody was performed with the lysosomal marker rabbit anti-LAMP1 IgG (1/5, Abcam, Cambridge, U.K.) in 1% BSA in PBS for 2 h. After five washes of 5 min each on drops of 0.25% Tween 20 in PBS, sections were incubated for 1 h with a secondary antibody anti-rabbit IgG coupled to 12 nm diameter colloidal gold particles (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) using a 1:30 dilution in 1% BSA in PBS.

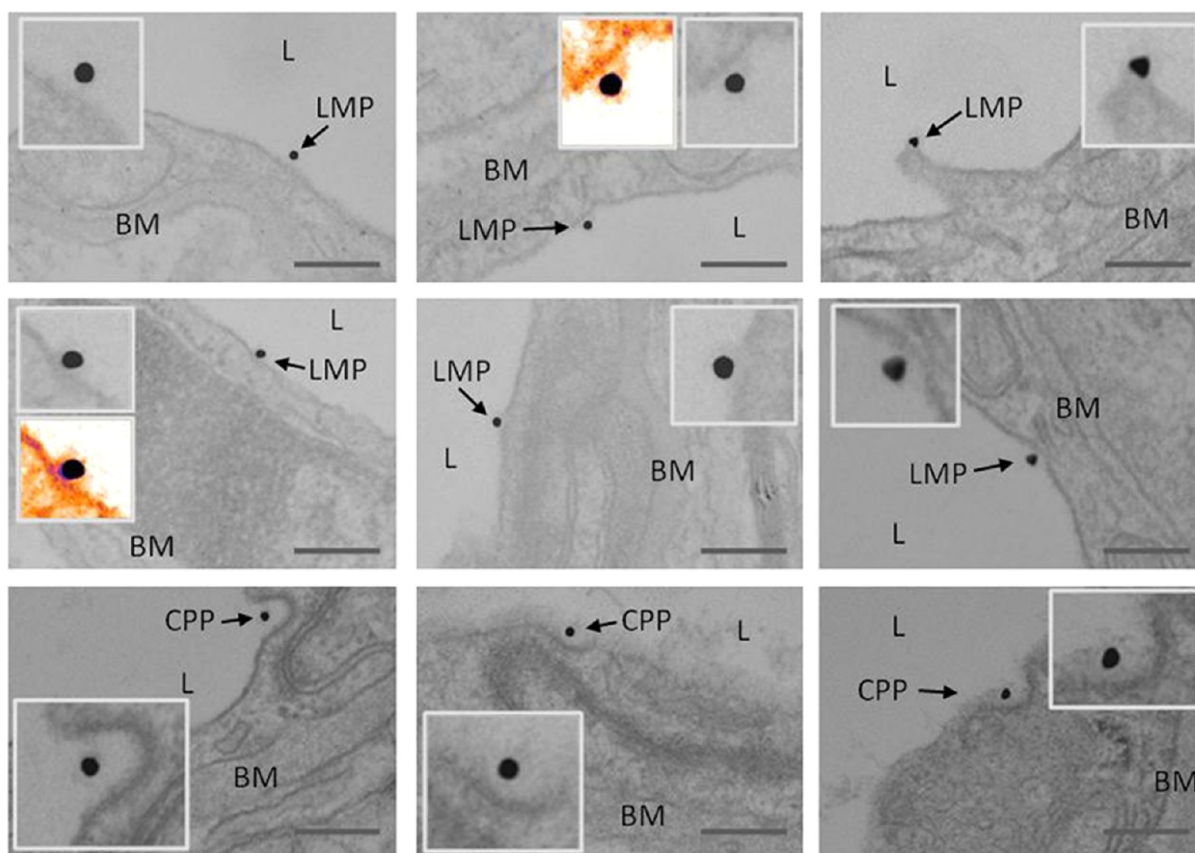


Figure 1. Representative images of luminal membrane particles (LMP) and clathrin-coated pits particles (CPP). L: lumen of the brain capillary. BM: basal membrane. Insets: magnifications of the regions containing the 8D3–AuNP. Note that in all cases there is a gap between the AuNP and the luminal membrane of the endothelial cell. This gap corresponds to the coating of 8D3, which can be slightly appreciated. Selected insets have been treated and colored to highlight the coating of 8D3. Scale bar: 200 nm.

This was followed by five washes of 5 min each on drops of PBS, 5 min of incubation on a drop with glutaraldehyde 1% in PBS, 10 washes with distilled water, and air-drying. As a control for the nonspecific binding of the colloidal gold-conjugated antibody, the primary polyclonal antibody was omitted. Sections were stained with 2% uranyl acetate in methanol and lead citrate, and observed in a JEM-1010 electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) operating at 80 kV. Images were obtained using a CCD Megaview $1k \times 1k$ camera and Analysis 3.2 image acquisition software.

RESULTS

Localization of AuNPs in Brain Samples. Observation by TEM of the hippocampus and cortex from animals that had previously been administered with the 8D3–AuNP conjugate shows the presence of gold particles in these brain structures in all cases, regardless of whether they were sacrificed at 10 min, 30 min, 2.5 h, or 24 h after administration. However, no AuNPs were observed in the brains of the control animals, which had been administered with intravenous IgG–AuNP conjugate. This finding allowed us to confirm that the presence of AuNPs in the brains of the different animal groups that had received 8D3–AuNP depended on the presence of the 8D3 antibody.

A thorough analysis of the samples from the animals in the different 8D3–AuNP groups made it possible to observe different AuNP localization patterns that predominated at different points in time. First, these different patterns will be described, and then, the relationship between these patterns

and the conjugate recirculation time will be statistically analyzed. It should be noted that these patterns did not present any differences with respect to the cortical or hippocampal origin of the analyzed region.

Some 8D3–AuNPs were located inside the blood capillaries, attached to the luminal membrane of the endothelial cell that forms the vessel wall. We have called this localization pattern LMP (luminal membrane particle). Representative images can be observed in Figure 1. In these cases the AuNPs were always observed at some distance of the luminal membrane. This distance, determined by imageJ software, was of 16.18 (± 1.76) nm. This gap is due to the coating of 8D3, which can be slightly appreciated in some images. This thickness is similar to that deduced from the DLS determinations. As it has been indicated, the size of the 8D3–AuNPs measured by DLS is about 46.78 nm, 20 nm being the diameter of the AuNP and thus estimating the 8D3 coating at about 13.39 nm thick.

Other individual 8D3–AuNPs were found in clathrin-coated pits of the luminal membrane of the BCECs. No clathrin-coated pit containing two or more AuNPs was observed. As before, the AuNPs were surrounded by a halo and were located approximately at 16 nm from the wall of the pit. We refer to this localization pattern as CPP (clathrin-coated pit particles). Representative images can be observed in Figure 1.

In other cases, AuNPs were observed inside vesicles in the BCECs. Some vesicles had more than one AuNP, and in two cases, as many as 23 AuNPs were observed in a single vesicle. This localization pattern is called V#, where # is the number of

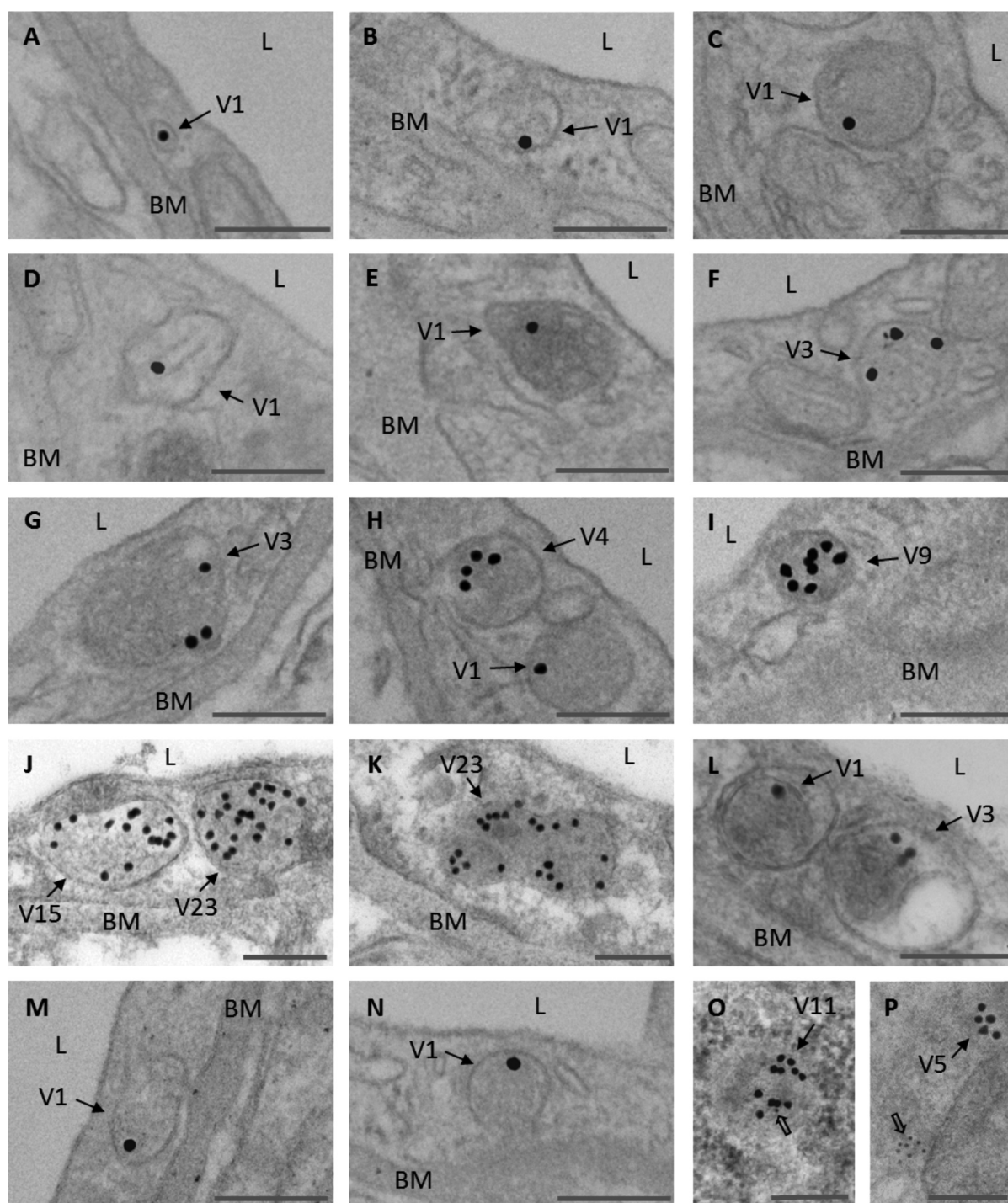


Figure 2. Representative images of AuNPs incorporated into the endothelial cells of the brain capillaries. V#: vesicle containing # AuNPs. (A–C, F–H) 8D3–AuNP attached to the vesicular membrane. (D, E, I–K) AuNPs that have lost connectivity to the vesicular membrane. (L) sorting of vesicles containing AuNPs. (M, N) Fusion of V1 particles to the abluminal membrane. (O, P) Brain sample immunostaining with the lysosomal marker anti-LAMP1 IgG antibody (empty arrows). V1 in C: lysosome. V1 in E: multivesicular body. L: lumen of the brain capillary. BM: basal membrane. Scale bars: 200 nm.

AuNPs inside the vesicle. Thus, the V1 pattern shows individual 8D3–AuNPs placed in vesicles inside the BCECs. When observed by TEM, some of these 8D3–AuNP-containing vesicles presented a circular or elliptical form and others had irregular shapes, which would indicate that the vesicles could be spherical in some cases but undefined in others. Sometimes, the vesicles seemed to merge together. Moreover, they varied greatly in size, with the Feret diameter ranging from 80 to 400

nm. Some of these vesicles could be identified as multivesicular bodies and others as lysosomes. The localization of the vesicles inside the endothelial cell varied: some were in areas near the luminal membrane, and others were at times near the abluminal side. In some cases, the 8D3–AuNPs inside the vesicles appeared to be attached to the vesicle membrane and were therefore in the peripheral zone of the vesicle, with the AuNP about 16 nm from the vesicular membrane. In other vesicles,

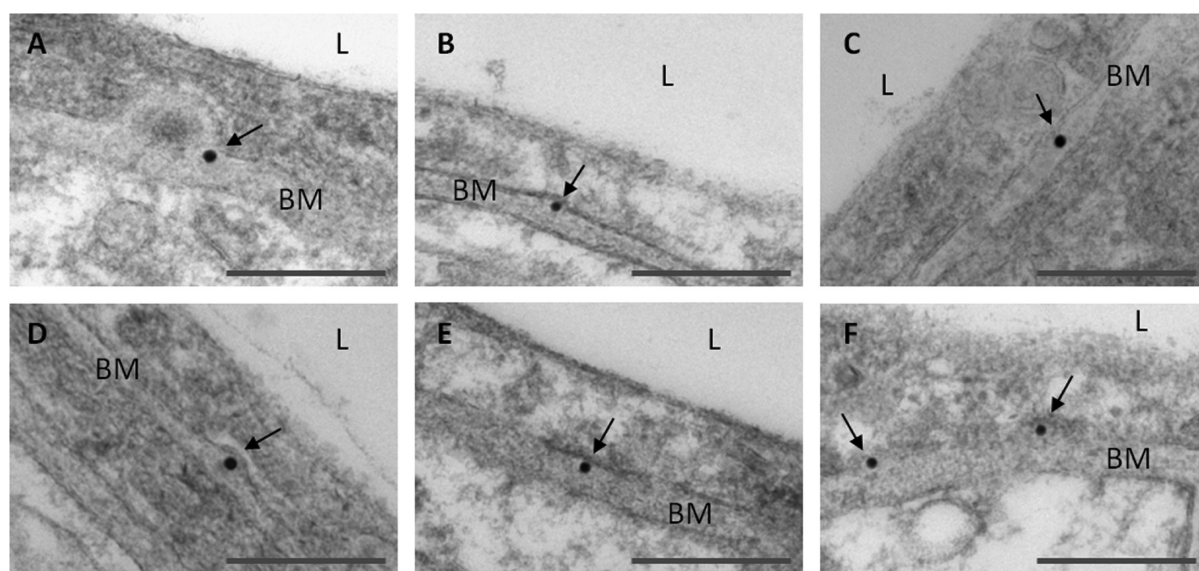


Figure 3. Representative images of basal membrane particles (BMP, arrows). L: lumen of the brain capillary. BM: basal membrane. In panel A, the origin of BMP from the fusion of V1 vesicle to the abluminal membrane is suggested. Scale bar: 300 nm.

Table 1. Distribution of the Observed AuNPs, Depending on the Location and the Time of Circulation^a

	no. (percentage) of AuNPs in each localization							
	10 min		30 min		2.5 h		24 h	
LMP	12	(12.2)	11	(7.4)	1	(0.2)	0	(0)
CPP	5	(5.1)	4	(2.7)	0	(0)	0	(0)
V1	42	(42.9)	50	(33.5)	82	(20.1)	19	(11.6)
V2	14	(14.3)	14	(9.4)	26	(6.3)	14	(8.6)
V3	21	(21.4)	24	(16.1)	30	(7.3)	15	(9.2)
V4	4	(4.1)	12	(8.1)	36	(8.8)	8	(4.9)
V5	0	(0)	10	(6.7)	30	(7.3)	0	(0)
V6	0	(0)	6	(4)	0	(0)	6	(3.7)
V7	0	(0)	0	(0)	21	(5.1)	7	(4.3)
V8	0	(0)	8	(5.4)	16	(3.9)	0	(0)
V9	0	(0)	9	(6)	54	(13.2)	27	(16.6)
V10	0	(0)	0	(0)	0	(0)	20	(12.3)
V11	0	(0)	0	(0)	11	(2.7)	22	(13.5)
V12	0	(0)	0	(0)	12	(2.9)	0	(0)
V13	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
V14	0	(0)	0	(0)	14	(3.4)	0	(0)
V15	0	(0)	0	(0)	15	(3.7)	0	(0)
V20	0	(0)	0	(0)	20	(4.9)	0	(0)
V23	0	(0)	0	(0)	23	(5.6)	23	(14.1)
BMP	0	(0)	1	(0.7)	19	(4.6)	2	(1.2)
total AuNPs	98	(100)	149	(100)	410	(100)	163	(100)
CA ^b	78		93		105		78	
total AuNPs/CA ^b	1.26		1.6		3.9		2.09	

^aThe total number of AuNPs observed and the number of analyzed capillaries are indicated for each time of recirculation. V# omitted: vesicles not found. ^bCA, number of capillaries analyzed.

however, especially in those with a higher AuNP content, these particles were distributed randomly throughout the vesicle interior, which would indicate that the interaction between 8D3–AuNPs and the vesicle membrane had been lost. All of these localization patterns are summarized in Figure 2.

Some gold particles were found in the basal membrane of the endothelium of the capillary vessels (BMP pattern). As exemplified in Figure 3, in these cases the particles were found in the area bordering the abluminal membrane of the

BCEC, which would suggest that the link with the abluminal membrane of the endothelial cell was maintained. These particles found in the basal membrane were observed individually, never in groups, and may have ended up there as a result of the fusion of V1 vesicles with the abluminal membrane (representative images of this fusion can be observed in Figures 2 and 3). It should be noted that, whatever the recirculation time, no gold particles were found beyond the basal membrane of the capillary vessels.

Quantitative Analysis of the Distribution of AuNPs with Respect to the Recirculation Time. Table 1 shows the distribution of the observed AuNPs according to the location and the recirculation time. The number of capillaries analyzed and the total number of AuNPs observed are indicated for each recirculation time. At 10 min recirculation, a total of 78 capillary sections had been analyzed and a total of 98 AuNPs had been observed, with an average of 1.26 AuNPs obtained per capillary analyzed. At the other recirculation times, i.e., 30 min, 2.5 h, and 24 h, an average of 1.60, 3.90, and 2.09 AuNPs were observed, respectively. At 10 min recirculation, the AuNPs were found in LMP, CPP, and vesicles with a low AuNP content (from V1 to V4). At 30 min recirculation, the localization of the AuNPs extended to V9, and one AuNP was found in BMP. At 2.5 h recirculation, there was a greater variety of locations, from particles located in LMP to those in V23, and the greatest number of particles in BMP was found at this time, i.e., 19 in total. At 24 h recirculation, no particles were found in LMP or CPP, and only two particles were found in BMP. In terms of the percentage of particles found in each location, at 10 min 12.2% were found in LMP and 5.1% in CPP, and therefore 17.3% of the observed particles had not yet internalized in the BCECs. At 30 min, these percentages had decreased to 7.4% and 2.7%, respectively (10.1% in total). At 2.5 and 24 h, no particles were found in LMP or CPP, with the exception of 0.2% found in LMP at 2.5 h. Regarding the particles found in BMP and particles that had reached the basal membrane, no particle was found at 10 min recirculation, while 0.7% of the particles were found in this location at 30 min. At 2.5 h, 4.6% of the particles were found in BMP, and at 24 h this figure was 1.2%. These data are shown in Figure 4.

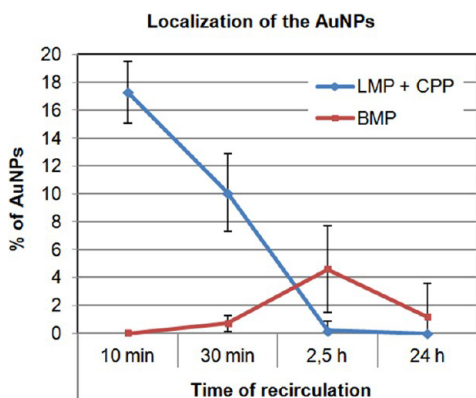


Figure 4. Percentage of AuNPs on the luminal surface (LMP + CPP) and basal membrane (BMP) for each recirculation time. Mean values and standard errors are shown.

In order to show the evolution over time of AuNP localization in the different vesicle types, a 3D graph of the percentage of particles according to their localization and recirculation time was obtained by adjusting the data using the *distance-weighted least-squares* procedure (Figure 5). As can be observed, the particles in LMP and CPP and the vesicles with a low number of AuNPs dominated at short recirculation times, and the number of AuNPs per vesicle increased gradually with time. At 2.5 and 24 h recirculation, therefore, the vesicles with a high AuNP content predominated.

Characterization of 8D3–AuNP-Containing Vesicles.

To further characterize the intracellular trafficking of 8D3–AuNPs in BCECs, and in order to elucidate the fate of these

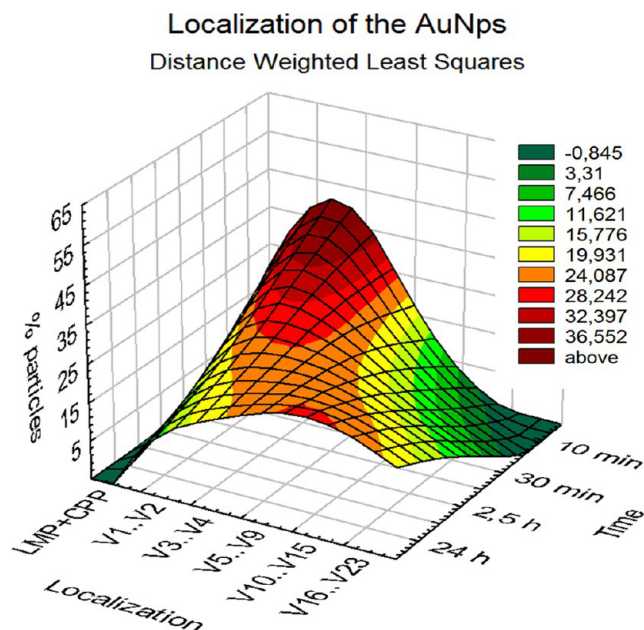


Figure 5. 3D contour graph obtained by adjusting with distance-weighted least-squares the percentage of particles to the localization and the recirculation time.

particles inside these cells, a vesicular immunostaining procedure was performed using the lysosomal marker anti-LAMP1 IgG antibody (Figures 2O and 2P) in 24 h brain samples. In these brain samples, 32 capillary sections were analyzed and 21 vesicles containing 8D3–AuNPs were observed. Only three of these vesicles (14.3%) colocalized with LAMP1 immunostaining, and were therefore considered lysosomes. Thus, most AuNPs found in the vesicles seemed to be localized in nonlysosomal vesicles like multivesicular bodies and late endosomes.

DISCUSSION

The results obtained from the analysis of AuNP localization at the various recirculation times made it possible to establish a time-dependent trafficking pattern in the AuNPs coated with the 8D3 anti-TfR antibody across the mouse BBB. This trafficking pattern, which is summarized in Figure 6 and is explained below, includes a TfR-mediated and clathrin-dependent endocytosis process of 8D3–AuNPs. Through this endocytosis process, 8D3–AuNPs internalize individually and lead to V1 vesicles. These V1 vesicles then follow at least two different endocytic routes. Most enter an intracellular process

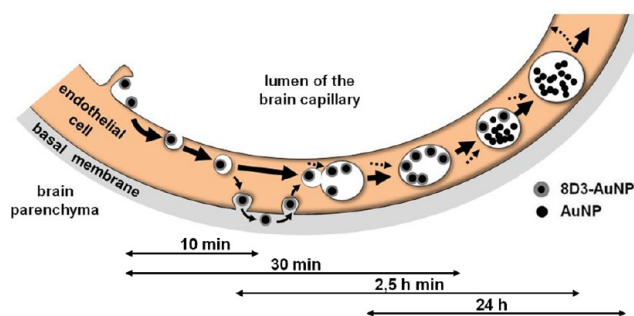


Figure 6. Deduced trafficking of the 8D3–AuNPs across the mouse BBB.

of vesicular fusion and rearrangement that ends up moving the AuNPs to late endosomes, multivesicular bodies, or lysosomes, which then present a high AuNP content. A small percentage of V1 vesicles follow a different route whereby they fuse with the abluminal membrane, open up to the basal membrane, and result in BMP particles, which temporarily remain attached in this position until their possible reinternalization.

The first aspect of this trafficking pattern, the TfR-mediated and clathrin-dependent endocytosis process, is explained by the lack of AuNP internalization when the complex consists of IgG-AuNP instead of 8D3-AuNP, which would indicate that the 8D3 antibody directed against the TfR is necessary for internalization. Moreover, the images corresponding to LMP and CPP show that the 8D3 coating of the 8D3-AuNPs is in contact with the luminal membrane of the BCECs, which probably indicates a link between 8D3 and the TfR. The fact that the internalization process is performed by clathrin-coated pits is entirely consistent with previous studies on TfR and iron transport across the endothelial cells of the BBB.^{24,25} Such internalization by clathrin-coated pits explains why 8D3-AuNPs enter individually; endocytic clathrin-coated vesicles are remarkably uniform in size, and measure about 100 nm in diameter,^{26,27} while 8D3-AuNPs measure about 60 nm in diameter. Therefore, the vesicles resulting from AuNP entry will be type V1.

Vesicles with a higher AuNP content might therefore be formed from the fusion and sorting of V1 vesicles with other vesicles, and the temporary adjustment of the AuNP location in the different vesicle types supports this idea. As has been shown, the number of AuNPs per vesicle increases gradually with time. Moreover, some of these vesicles that contain more than one AuNP are multivesicular bodies and lysosomes, which would indicate that they have been formed from the sorting and fusion of different vesicular structures. The low percentage of colocalization between LAMP1-positive vesicles and AuNP-containing vesicles suggests that AuNPs are collected in late endosomes or multivesicular bodies devoid of any degradative capability.

Moreover, the idea that the BMP particles come from type V1 particles that have fused with the abluminal membrane is based on some images that suggest this to be the case, and on the fact that these BMP particles are always found individually in the basal membrane and never in groups, and are always linked to the abluminal membrane of the endothelial cell. This suggests that the 8D3-AuNP complex is still attached to the TfR and that the vesicle has not undergone the other endosomal maturation and sorting process before reaching the abluminal membrane. If BMP particles had come from vesicles with a high AuNP content, some would have been found in groups. Moreover, since in some cases these AuNPs lose the 8D3 coating and are therefore not linked to the vesicular membrane, they might have been found far from the abluminal membrane and/or even beyond the limit of the basal membrane. As mentioned above, no AuNPs were found beyond the basal membrane.

The fact that AuNP presence was not observed beyond the basal membrane and that the percentage of AuNPs in the basal membrane at 24 h recirculation was lower than that observed at 2.5 h may indicate that these AuNPs, which reach the basal membrane attached to the abluminal membrane, are not released to the parenchyma but return inside BCECs, possibly in vesicles that join internal processes of vesicular fusion and rearrangement.

Finally, the fact that the total number of AuNPs with respect to the number of capillaries analyzed at 24 h recirculation seemed to decrease suggests that some of these vesicles with high AuNP levels, which lose the 8D3 coating and are no longer linked to the vesicular membrane, could open up to the capillary bloodstream again and release the AuNP content there.

Given the controversy regarding the possible use of TfR for transporting substances across the BBB, the present study provides new information that may clarify some questions that are yet to be answered concerning the dynamics and intracellular mechanisms followed by AuNPs when coated with the 8D3 antibody. The results suggest that the 8D3 antibody may be useful for transporting substances (AuNPs in this case) toward the endothelial cells that constitute brain capillary walls. At the recirculation times tested, the highest number of AuNPs inside BCECs was found at 2.5 h, although the levels were elevated even after 24 h. Only a small percentage of particles accessed the basal membrane (the maximum value observed was 4.6% of the particles at 2.5 h of recirculation), but they did not enter the brain parenchyma.

These results contradict previous studies that found a high level of efficiency in the transport of the anti-TfR mAb and/or its cargo across the BBB.^{8,20,28} Despite differences in the experimental design or construct architecture, the contradictory conclusions are probably due to the indirect detection techniques used in those studies. Radioactivity measurements to calculate both the construct's blood clearance and the construct's entry into brain parenchyma could wrongly suggest that the construct has been successfully transcytosed: radioactivity in blood may decrease and radioactivity levels in brain homogenates may increase when the construct is internalized inside the BCECs without reaching the brain parenchyma. This fact might also explain the results obtained from enzymatic activity measurements.¹⁰ The capillary depletion method may result in misleading interpretations, since it is very difficult to achieve a careful and accurate separation and depletion of brain capillaries.^{8,9}

In other studies, the pharmacological effects of the attached cargo have been used to test whether the effects of a substance improve when it is conjugated to the mAb.^{29,30} Although promising results were presented some time ago, this is also an indirect technique, and the intracellular mechanisms by which the pharmacological substance reaches the brain parenchyma remain unclear. In other cases, where targeted nanocarriers have been used to encapsulate the pharmacological substance, it is possible that, after the internalization of the construct, the nanocarrier releases the encapsulated cargo to the brain parenchyma.^{16,18,19}

None of these indirect techniques is reliable enough to study the passage of molecules across the BBB, and the use of direct visual techniques is necessary to ensure the efficiency of molecular Trojan horses, and to fully understand the intracellular mechanisms they use to transport substances across the BBB.

Gold nanoparticles have been used in many studies to monitor the different brain targeting ligands and analyze their capacity to cross the BBB.^{11,31-35} Moreover, AuNPs have been proposed as useful diagnosis and drug delivery tools by improving their size, shape, and physicochemical properties.³⁶⁻³⁸ Electron microscopy techniques allow us to accurately monitor the way these AuNPs behave intracellularly in the endothelial cells of brain blood vessels, when coated with

different ligands such as endogenous ligands, peptides, or MAbs. To date, few *in vivo* studies have monitored AuNPs coated with compounds that recognize the TfR at a subcellular level.^{11,34,35} Using the OX26 anti-ratTfR antibody, Bickel et al. showed similar results of 5 nm AuNP localization beyond the abluminal membrane, but not further in brain parenchyma. Prades et al. used a TfR targeting peptide to vehiculate the AuNPs across the BBB, whereas Wiley et al. used the transferrin itself as the TfR targeting ligand. In both cases AuNPs succeeded in crossing the BBB and reaching the brain parenchyma. However, the AuNPs found in brain parenchyma by Prades et al. only accounted for 0.07% of the AuNPs in the injected doses, and a thorough observational analysis is necessary to elucidate the mechanisms by which these AuNPs transcytose to the brain parenchyma, and whether this is due to receptor-mediated transport (RMT). In the case of Wiley et al., a quantitative analysis of the images obtained was performed. By varying the AuNP particle size and the Tf amount per AuNP (avidity), significant differences in the amount of AuNPs that reached the brain parenchyma were observed. AuNPs with the highest avidity were bound to the BBB, but demonstrated reduced accumulation in brain parenchyma with respect to AuNPs with lower avidity.

In the present study, most AuNPs remained inside the BCECs and only a small percentage of the AuNPs reached the basal membrane, probably as a result of different endosomal sorting. Moreover, this small percentage did not reach the brain parenchyma, probably due to the strong bond between the 8D3 and the TfR. This result is consistent with other studies in which the 8D3 and RI7 anti-TfR antibodies were colocalized with basal membrane markers.^{13,17}

Nevertheless, it should not be considered impossible for the cargo to reach the brain parenchyma once it has reached the basal membrane if the linkage between the Trojan horse and the transported cargo had properties that permitted the cargo to dissociate from the carrier.

A range of optimization studies is required to improve this RMT-based strategy for crossing the BBB. As mentioned above, targeted nanocarriers with encapsulated drugs are a promising strategy that requires further study, since the encapsulated drug may be released from the internalized complex and transcytosis of the drug might be completed on its own. Second, as mentioned above, different mAb–cargo linkage strategies should also be studied to identify a linkage that, once inside the BCEC, lets the cargo dissociate from the mAb and thus prevents endosomal sorting of the mAb and promotes endosomal escape. The acid-sensitive hydrazone bond could be postulated as a linkage candidate, since endosomal acidification could contribute to the linkage breakdown.³⁹ However, endosomal escape does not indicate escape to the brain parenchyma, so further studies are required. Another idea that is being explored by several research groups and is showing promising results relies on the hypothesis that decreasing the affinity of the mAb for the receptor facilitates transcellular transport and prevents sequestration by BCECs. Different approaches have been proposed to achieve this: Bien-Ly and colleagues²² have recently designed low-affinity bispecific antibodies, while Niewoehner and co-workers²³ have proposed a monovalent shuttle format (single Fab fragment of an anti-TfR mAb) as a more efficient tool to complete the transcytosis of the cargo.

Thus, RMT-based drug delivery continues to be one of the most promising strategies to overcome the BBB, although

further studies on the intracellular mechanisms and improvements in the construct design are needed.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. Tel: (+34) 93 4024505. Fax: (+34) 93 4035901. E-mail: vilaplana@ub.edu.

Author Contributions

[†]C.P. and J.V. contributed equally to this study.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by grants BFU2010-22149 from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación* and BFU2013-47382-P from the Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad*, and the Centros de Investigación Biomédica en Red (CIBER) at the Instituto de Salud Carlos III. We also would like to thank the Generalitat de Catalunya for funding the research group (2009/SGR00853 and 2014SGR525). I. Cabezón was supported by an APIF fellowship from the *Universitat de Barcelona*. We thank Dr. Carmen López from the Servei de Microscòpia Electrònica (Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona) for her help with the microscopy services, Dr. Carles Enrich for his assistance in the interpretation of the transmission electron microscopy images, and Dr. M^a Luísa García and Amanda Cano for their assistance in the DLS analysis.

ABBREVIATIONS USED

TfR, transferrin receptor; BBB, blood–brain barrier; AuNP, gold nanoparticle; mAb, monoclonal antibody; BCEC, brain capillary endothelial cell; TEM, transmission electron microscope; PBS, phosphate-buffered saline; PF, paraformaldehyde; LMP, luminal membrane particle; CPP, clathrin-coated pit particle; BMP, basal membrane particle; RMT, receptor-mediated transport

REFERENCES

- (1) Pardridge, W. M. CNS drug design based on principles of blood–brain barrier transport. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 1781–1792.
- (2) De Boer, A. G.; Gaillard, P. J. Drug targeting to the brain. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 323–355.
- (3) Scherrmann, J. M. Drug delivery to brain via the blood–brain barrier. *Vasc. Pharmacol.* **2002**, *38*, 349–354.
- (4) Jefferies, W. A.; Brandon, M. R.; Hunt, S. V.; Williams, A. F.; Gatter, K. C.; Mason, D. Y. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* **1984**, *312*, 162–163.
- (5) Friden, P. M.; Walus, L. R.; Musso, G. F.; Taylor, M. A.; Malfroy, B.; Starzyk, R. M. Anti-transferrin receptor antibody and antibody–drug conjugates cross the blood–brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 4771–4775.
- (6) Moos, T. Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **1996**, *375*, 675–692.
- (7) Kissel, K.; Hamm, S.; Schulz, M. Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood–tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody. *Histochem. Cell Biol.* **1998**, *110*, 63–72.
- (8) Lee, H. J.; Engelhardt, B.; Lesley, J.; Bickel, U.; Pardridge, W. M. Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies

through blood–brain barrier in mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 1048–1052.

(9) Moos, T.; Morgan, E. H. Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood–brain barrier in the rat. *J. Neurochem.* **2001**, *79*, 119–129.

(10) Zhang, Y.; Pardridge, W. M. Delivery of β -galactosidase to mouse brain via the blood–brain barrier transferrin receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 1075–1081.

(11) Bickel, U.; Kang, Y. S.; Yoshikawa, T.; Pardridge, W. M. *In vivo* demonstration of subcellular localization of anti-transferrin receptor monoclonal antibody-colloidal gold conjugate in brain capillary endothelium. *J. Histochem. Cytochem.* **1994**, *42*, 1493–1497.

(12) Gosk, S.; Vermehren, C.; Storm, G.; Moos, T. Targeting anti-transferrin receptor antibody (OX26) and OX26-conjugated liposomes to brain capillary endothelial cells using *in situ* perfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2004**, *24*, 1193–1204.

(13) Paris-Robidas, S.; Emond, V.; Tremblay, C.; Soulet, D.; Calon, F. *In vivo* labeling of brain capillary endothelial cells after intravenous injection of monoclonal antibodies targeting the transferrin receptor. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 32–39.

(14) Manich, G.; Cabezón, I.; Del Valle, J.; Duran-Vilaregut, J.; Camins, A.; Pallàs, M.; Pelegrí, C.; Vilaplana, J. Study of the transcytosis of an anti-transferrin receptor antibody with a Fab' cargo across the blood–brain barrier in mice. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49*, 556–564.

(15) Shi, N.; Pardridge, W. M. Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 7567–7572.

(16) Zhang, Y.; Calon, F.; Zhu, C.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M. Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism. *Hum. Gene Ther.* **2003**, *14*, 1–12.

(17) Alata, W.; Paris-Robidas, S.; Emond, V.; Bourasset, F.; Calon, F. Brain uptake of a fluorescent vector targeting the transferrin receptor: a novel application of *in situ* brain perfusion. *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11*, 243–253.

(18) Pang, Z.; Lu, W.; Gao, H.; Hu, K.; Chen, J.; Zhang, C.; Gao, X.; Jiang, X.; Zhu, C. Preparation and brain delivery property of biodegradable polymersomes conjugated with OX26. *J. Controlled Release* **2008**, *128*, 120–127.

(19) Ulbrich, K.; Hekmatara, T.; Herbert, E.; Kreuter, J. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood–brain barrier (BBB). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 251–256.

(20) Papademetriou, I. T.; Garnacho, C.; Schuchman, E. H.; Muro, S. *In vivo* performance of polymer nanocarriers dually-targeted to epitopes of the same or different receptors. *Biomaterials* **2013**, *34*, 3459–3466.

(21) Loureiro, J. A.; Gomes, B.; Fricker, G.; Cardoso, I.; Ribeiro, C. A.; Gaitero, C.; Coelho, M. A. N.; do Carmo Pereira, M.; Rocha, S. Dual ligand immunoliposomes for drug delivery to the brain. *Colloids Surf, B* **2015**, *134*, 213–219.

(22) Bien-Ly, N.; Yu, Y. J.; Bumbaca, D.; Elstrott, J.; Boswell, C. A.; Zhang, Y.; Luk, Y.; Dennis, M. S.; Weimer, R. M.; Chung, I.; Watts, R. I. Transferrin receptor (TfR) trafficking determines brain uptake of TfR antibody affinity variants. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 233–244.

(23) Niewoehner, J.; Bohrmann, B.; Collin, L.; Urich, E.; Sade, H.; Maier, P.; Rueger, P.; Stracke, J. O.; Lau, W.; Tissot, A. C.; Loetscher, H.; Ghosh, A.; Freskgård, P. O. Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* **2014**, *81*, 49–60.

(24) Roberts, R. L.; Fine, R. E.; Sandra, A. Receptor-mediated endocytosis of transferrin at the blood–brain barrier. *J. Cell Sci.* **1993**, *104*, 521–532.

(25) Visser, C. C.; Voorwinden, L. H.; Crommelin, D. J.; Danhof, M.; De Boer, A. G. Characterization of the transferrin receptor on brain capillary endothelial cells. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 761–769.

(26) Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2873–2896.

(27) Traub, L. M. Regarding the amazing choreography of clathrin coats. *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1001037.

(28) Penichet, M. L.; Kang, Y. S.; Pardridge, W. M.; Morrison, S. L.; Shin, S. U. An Antibody-Avidin Fusion Protein Specific for the Transferrin Receptor Serves as a Delivery Vehicle for Effective Brain Targeting: Initial Applications in Anti-HIV Antisense Drug Delivery to the Brain. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 4421–4426.

(29) Bickel, U.; Yoshikawa, T.; Landaw, E. M.; Faull, K. F.; Pardridge, W. M. Pharmacologic effects *in vivo* in brain by vector-mediated peptide drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 2618–2622.

(30) Wu, D.; Pardridge, W. M. Central nervous system pharmacologic effect in conscious rats after intravenous injection of a biotinylated vasoactive intestinal peptide analog coupled to a blood–brain barrier drug delivery system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279*, 77–83.

(31) Harding, c.; Heuser, J.; Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **1983**, *97*, 329–339.

(32) Van Gelder, W.; Cleton-Soeteman, M. I.; Huijskes-Heins, M. I.; Van Run, P. R.; Van Eijk, H. G. Transcytosis of 6.6-nm gold-labeled transferrin: an ultrastructural study in cultured porcine blood–brain barrier endothelial cells. *Brain Res.* **1997**, *746*, 105–116.

(33) Candela, P.; Gosselet, F.; Miller, F.; Buee-Scherrer, V.; Torpier, G.; Cecchelli, R.; Fenart, L. Physiological pathway for low-density lipoproteins across the blood–brain barrier: transcytosis through brain capillary endothelial cells *in vitro*. *Endothelium* **2008**, *15*, 254–264.

(34) Prades, R.; Guerrero, s.; Araya, E.; Molina, c.; Salas, E.; Zurita, E.; Selva, J.; Egea, G.; López-Iglesias, C.; Teixidó, M.; Kogan, M. J.; Giralt, E. Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7194–7205.

(35) Wiley, D. T.; Webster, P.; Gale, A.; Davis, M. E. Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 8662–8667.

(36) Weintraub, K. Biomedicine: The new gold standard. *Nature* **2013**, *495*, 14–16.

(37) Cheng, Y.; Dai, Q.; Morshed, R. A.; Fan, X.; Wegscheid, M. L.; Wainwright, D. A.; Han, Y.; Zhang, L.; Auffinger, B.; Tobias, A. L.; Rincón, E.; Thaci, B.; Ahmed, A. U.; Warnke, P. C.; He, C.; Lesniak, M. S. Blood–brain barrier permeable gold nanoparticles: an efficient delivery platform for enhanced malignant glioma therapy and imaging. *Small* **2014**, *10*, 5137–5150.

(38) Shilo, M.; Motiei, M.; Hana, P.; Popovtzer, R. Transport of nanoparticles through the blood–brain barrier for imaging and therapeutic applications. *Nanoscale* **2014**, *6*, 2146–2152.

(39) Kratz, F.; Beyer, U.; Roth, T.; Tarasova, N.; Collery, P.; Lechenault, F.; Cazabat, A.; Schumacher, P.; Unger, C.; Falken, U. Transferrin conjugates of doxorubicin: synthesis, characterization, cellular uptake, and *in vitro* efficacy. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 338–346.

3. ARTÍCULO 3

**SERIAL BLOCK-FACE SCANNING ELECTRON MICROSCOPY
APPLIED TO STUDY THE TRAFFICKING OF 8D3-COATED GOLD
NANOPARTICLES AT THE BLOOD-BRAIN BARRIER**

Itsaso Cabezón, Elisabet Augé, Manel Bosch, Alison J. Beckett, Ian A. Prior,
Carme Pelegrí, Jordi Vilaplana

Histochemistry and Cell Biology

DOI: 10.1007/s00418-017-1553-9

RESUMEN

Objetivos: Determinar si la técnica SBF-SEM (*Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy*) es aplicable y resulta adecuada para el estudio de transcitosis de moléculas a través de la BHE. Realizar reconstrucciones 3D de segmentos de BHE y de las vesículas endocíticas que contienen el conjugado 8D3-AuNP para poder tener así una visión más realista y proporcionar información adicional acerca de dichas vesículas y el procesamiento endosomal llevado a cabo por las CECC.


Material y métodos: Se recubrieron AuNPs de 20 nm de diámetro con el anticuerpo 8D3 mediante unión covalente, a una proporción AuNP:8D3 de 1:30 aproximadamente. El conjugado 8D3-AuNP fue administrado vía i.v. en ratones ICR-CD1 machos de 3-5 meses de edad, y transcurridas 2.5 h de recirculación, los animales fueron anestesiados y perfundidos con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0'1% vía intracardíaca. Tras su extracción, los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 1 mm de grosor, y se seleccionaron y diseccionaron áreas del hipocampo y córtex que posteriormente fueron procesadas para SBF-SEM. Se utilizó el sistema Gatan 3View instalado en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 250 FEG para obtener las imágenes seriadas de las ROIs (p. ej. capilares cerebrales con presencia de AuNPs). Se llevaron a cabo reconstrucciones 3D de las estructuras de interés (componentes celulares de la UNV y vesículas endocíticas de las CECC) utilizando el programa Imaris.

Resultados: Primeramente se realizaron reconstrucciones 3D de segmentos de BHE (reconstrucción de los diferentes componentes celulares de la UNV: CECC, pericitos, terminaciones astrocíticas, etc.) a partir de bloques de imágenes seriadas obtenidas a una magnificación de entre 10,000 x y 25,000 x, previa optimización de los ajustes de configuración del sistema SBF-SEM. Estas condiciones permitieron obtener fracciones relativamente grandes de BHE y monitorizar segmentos transversales completos de la misma a lo largo del eje Z. Este nivel de magnificación sin embargo no era suficiente para visualizar las AuNPs, y la carga eléctrica generada en el tejido debido a la presencia de resina de inclusión pura en el lumen del capilar provocaba de manera progresiva el deterioro de la muestra. De manera subsiguiente se obtuvieron series de imágenes de segmentos de CECC a un mayor nivel de magnificación (>30,000 x), previa optimización de los ajustes de configuración, y evitando incluir todo el lumen del capilar en la ROI. Esto nos permitió realizar reconstrucciones 3D de las vesículas endocíticas que contienen AuNPs. Aunque las AuNPs eran visibles, debido a su pequeño tamaño, era imposible representarlas en 3D. Aplicando un método novedoso y con ayuda del programa de ordenador Fiji fue posible reemplazar las AuNPs por esferas 3D de tamaño similar y en las coordenadas exactas dentro del volumen de tejido, pudiendo así representar tridimensionalmente todas

nuestras estructuras de interés. La reconstrucción tridimensional de las vesículas reveló una gran complejidad de estas en cuanto a estructura, llegando a alcanzar más de 1 μ m de longitud: muchas de las vesículas consideradas esféricas o elipsoidales en los análisis bidimensionales, forman en realidad parte de estas redes complejas, y como consecuencia, el número de AuNPs por vesícula será considerablemente mayor a lo previamente concluido. En cuanto al patrón de localización y procesamiento endosomal de las AuNPs, el análisis 3D reafirma los resultados obtenidos en el análisis 2D.

Conclusiones: La aplicación de la técnica SBF-SEM en el estudio del anticuerpo 8D3 aporta información adicional principalmente en torno a la morfología de las estructuras endosomales implicadas en el procesamiento de este mAb, y en combinación con otras técnicas avanzadas de microscopía electrónica podría ser útil y novedosa para el estudio del transporte de sustancias a través de la BHE. La conjugación de AuNPs a fármacos o *carriers* resulta una buena estrategia para monitorizar estas sustancias de la manera más precisa que se conoce actualmente.

Serial block-face scanning electron microscopy applied to study the trafficking of 8D3-coated gold nanoparticles at the blood–brain barrier

Itsaso Cabezón^{1,2,3} · Elisabet Augé^{1,3} · Manel Bosch⁴ · Alison J. Beckett⁵ · Ian A. Prior⁵ · Carme Pelegrí^{1,3,6} · Jordi Vilaplana^{1,3,6} 

Accepted: 17 February 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract Due to the physical and physiological properties of the blood–brain barrier (BBB), the transport of neurotherapeutics from blood to brain is still a pharmaceutical challenge. We previously conducted a series of experiments to explore the potential of the anti-transferrin receptor 8D3 monoclonal antibody (mAb) to transport neurotherapeutics across the BBB. In that study, gold nanoparticles (AuNPs) were coated with the 8D3 antibody and administered intravenously to mice. Transmission electron microscopy was used and a two-dimensional (2D) image analysis was performed to detect the AuNPs in the brain capillary

endothelial cells (BCECs) and brain parenchyma. In the present work, we determined that serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) is a useful tool to study the transcytosis of these AuNPs across the BBB in three dimensions and we, therefore, applied it to gain more knowledge of their transcellular trafficking. The resulting 3D reconstructions provided additional information on the endocytic vesicles containing AuNPs and the endosomal processing that occurs inside BCECs. The passage from 2D to 3D analysis reinforced the trafficking model proposed in the 2D study, and revealed that the vesicles containing AuNPs are significantly larger and more complex than described in our 2D study. We also discuss tradeoffs of using this technique for our application, and conclude that together with other volume electron microscopy imaging

C. Pelegrí and J. Vilaplana contributed equally to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:[10.1007/s00418-017-1553-9](https://doi.org/10.1007/s00418-017-1553-9)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jordi Vilaplana
vilaplana@ub.edu

Itsaso Cabezón
itsaso.cabezon@ub.edu

Elisabet Augé
eauge@ub.edu

Manel Bosch
mbosch@ccit.ub.edu

Alison J. Beckett
A.J.Beckett@liverpool.ac.uk

Ian A. Prior
iprior@liverpool.ac.uk

Carme Pelegrí
carmepelegrí@ub.edu

² Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴ Unitat de Microscòpia Òptica Avançada, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB), Barcelona, Spain

⁵ Division of Cellular and Molecular Physiology, Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, Liverpool, UK

⁶ CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Madrid, Spain

¹ Secció de Fisiologia, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain

techniques, SBF-SEM is a powerful approach that is worth of considering for studies of drug transport across the BBB.

Keywords Blood-brain barrier · Receptor-mediated transport · Transferrin receptor · Monoclonal antibodies · SBF-SEM · 3D electron microscopy · Drug delivery

Abbreviations

BBB	Blood-brain barrier
TfR	Transferrin receptor
mAb	Monoclonal antibody
AuNP	Gold nanoparticle
TEM	Transmission electron microscopy
2D	Two-dimensional
3D	Three-dimensional
SBF-SEM	Serial block-face scanning electron microscopy
BCEC	Brain capillary endothelial cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PF	p-Formaldehyde

Introduction

The blood–brain barrier (BBB) is a well-coordinated and highly selective barrier that severely limits brain uptake and hence the therapeutic potential of pharmacologically active compounds following intravenous administration (Abbott et al. 2010; de Boer and Gaillard 2007; Pardridge 1998; Tamsamani et al. 2001). Receptor-mediated transcytosis in brain capillary endothelial cells (BCECs) has been extensively studied as a possible strategy to transport such compounds across the BBB. Moreover, monoclonal antibodies (mAbs) directed against some of those receptors present in the luminal membrane of BCECs have been proposed as carriers of these substances (Lajoie and Shusta 2015; Manich et al. 2013). Some of these mAbs are those directed against the transferrin receptor (TfR), which have been widely studied in rodents. Some of the studies, principally those using the capillary depletion method or indirect outcome measures to determine brain uptake, conclude that mAbs and/or their cargo are transported across the BBB, while other studies conclude that these mAbs do not complete transcytosis and accumulate inside BCECs (Alata et al. 2014; Gosk et al. 2004; Lee et al. 2000; Manich et al. 2013; Moos and Morgan 2001; Paris-Robidas et al. 2011; Zhang and Pardridge 2005; Zhang et al. 2003). Thus, the success and usefulness of this strategy remain controversial and the intracellular mechanisms by which these mAbs undergo inside or across BCECs are still unknown (Fresgård and Ulrich 2016). Gaining knowledge of these mechanisms would help to ascertain the possible use of mAbs as molecular Trojan Horses.

We recently conducted a series of experiments to provide insight at a subcellular level into the endocytic/transcytotic mechanisms involved in the processing of these mAbs (Cabezón et al. 2015). In these studies, we coated gold nanoparticles (AuNPs) with the 8D3 antibody directed against the mouse TfR. After *in vivo* administration of the 8D3-AuNP conjugates, and using transmission electron microscopy (TEM), we observed a time-dependent internalization and trafficking pattern (Fig. 1). The 8D3-AuNP conjugates were individually internalized within BCECs through clathrin-dependent endocytosis. Thereafter, most of the endocytic vesicles followed an intracellular process of vesicular fusion and rearrangement that ended up moving the AuNPs to late endosomes, multivesicular bodies or lysosomes, which then presented a high AuNP content. A small percentage of the endocytic vesicles containing just one AuNP followed a different route whereby they fused with the abluminal membrane and opened up to the basal lamina. This latter route suggests endosomal escape and complete transcytosis, but the 8D3 remains attached to the TfR, and thus the 8D3-AuNP conjugates remain in this location, possibly until their reinternalization, without reaching the brain parenchyma beyond the basal lamina.

All these results provided relevant information at an ultrastructural level concerning the dynamics of the AuNP cargo when transported by the possible molecular Trojan Horse 8D3. However, the study was limited by the use of two-dimensional (2D) image analysis. A three-dimensional (3D) structural study could provide significantly more insight into the transport of molecules across the BBB, and more knowledge concerning the trafficking of the AuNPs.

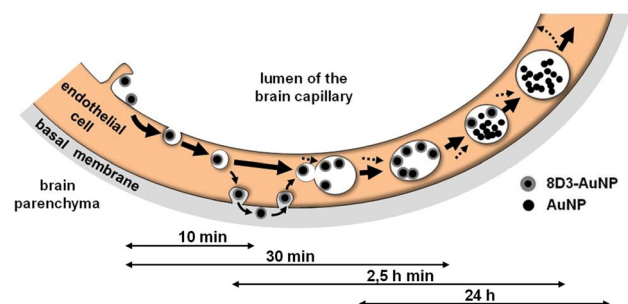


Fig. 1 Deduced trafficking of 8D3-AuNPs across the mouse BBB (from Cabezón et al. 2015). The 8D3-AuNPs internalize individually within BCECs via TfR-mediated and clathrin-dependent process. These vesicles then follow at least two different routes. On one hand, most vesicles enter intracellular processes of vesicular fusion and rearrangement in which the AuNPs end up accumulated inside vesicles with a high AuNPs content. On the other hand, a small percentage of the vesicles follow a different route in which they fuse with the abluminal membrane and open to the basal membrane. In these cases, the 8D3-AuNPs remain attached to the abluminal membrane, which suggests an endosomal escape, but not dissociation from the TfR

Serial block-face (SBF) imaging is a recently devised approach using scanning electron microscopy (SEM) to acquire serial images and reconstruct large tissue regions in 3D (Ohno et al. 2015). In SBF-SEM, surface areas of the embedded tissue blocks are serially cut and removed with the built-in diamond knife in the SEM chamber between the cycles of SEM imaging. Because the consecutive areas of tissue of the specimens are imaged with surface milling, this method generates largely pre-aligned images, which speeds up 3D reconstruction of the target structures. The method has been extensively used to explore the connectivity of the neuronal network, but only rarely to study the structure of the BBB, and no SBF-SEM data exist on the transport of molecules across this barrier.

The objective of the present work is to determine whether SBF-SEM is a useful tool to study the transcytosis of molecules across the BBB, and their accurate localization both inside BCECs and within other cellular structures of the brain parenchyma. To this end, we coated AuNPs with 8D3 mAb, we administered the resultant 8D3-AuNP conjugates intravenously to mice, and 2.5 h after administration, we processed the mouse brain for SBF-SEM. We specifically aimed to establish and optimize the configuration for performing 3D reconstructions of brain regions containing BBB segments and characterize the vesicles containing AuNPs. If the technique is shown to be appropriate, we will complement our previous 2D studies with detailed 3D reconstructions of BBB segments as well as vesicles containing AuNPs situated within BCECs. This will provide additional information regarding these endocytic vesicles and the endosomal processing that occurs inside BCECs.

Materials and methods

Animals

Male ICR-CD1 mice (4 months old) were used for the study. They were kept in standard conditions of temperature (22 ± 2 °C) and light–dark cycles (12:12 h, 300 lx/0 lx) and had access to food and water *ad libitum* until the day of the experiment. All experimental procedures were reviewed and approved by the University of Barcelona Animal Experimentation Ethics Committee (DAAM 7505).

Formation of the 8D3-AuNP conjugates

8D3-AuNP conjugates were formed as described in Cabezón et al. (2015). Briefly, the anti-TfR 8D3 mAb (AbD Serotec, UK) was covalently attached to AuNPs measuring 20 nm in diameter using the InnovaCoat GOLD Covalent Conjugation Kit (Innova Biosciences, Cambridge, UK).

Then, the buffer was changed to phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, via four centrifugations of 20 min each at 9000g, discarding the supernatant and resuspending the pellet in 1200 μ L of PBS until the last centrifugation, when the pellet was resuspended in PBS to a final volume of 700 μ L.

Administration of the 8D3-AuNP conjugates and brain obtention

The mice were anesthetized with isoflurane, and a bolus of 300 μ L of PBS, pH 7.2, containing the 8D3-AuNP conjugate at a concentration of 430 μ g of 8D3/mL was intravenously injected into the caudal vein. After 2.5 h of recirculation, the animals were anesthetized with 80 mg/kg of sodium pentobarbital by an intraperitoneal injection, the thoracic cavity was opened, and an intracardiac gravity-dependent perfusion of 50 mL of PBS followed by 50 mL of paraformaldehyde (PF, Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) at 4% and glutaraldehyde at 0.1% in phosphate buffer 0.1 M was performed. The brains were then removed and kept in the same solution.

Brain sample processing for SBF-SEM

Coronal brain sections 1 mm thick were obtained using a vibratome. The hippocampal and cortical areas were then selected, dissected, and post-fixed overnight in PF at 4% and glutaraldehyde at 0.1% in phosphate buffer 0.1 M. The fixative was then substituted for PF at 2%, and tissue samples were stored in this solution for 3 days at 4 °C. Samples were then prepared for SBF-SEM, based on the Deerinck et al. (2010) protocol. The samples were washed in PB 0.1 M and post-fixed with reduced osmium (2% osmium tetroxide (OsO_4) containing 1.5% potassium ferrocyanide) for 1 h at room temperature. Sequentially, the samples were placed in 1% thiocarbonylhydrazide solution in ddH₂O for 20 min, stained with 2% OsO_4 in ddH₂O for 30 min at room temperature, and incubated in 1% aqueous uranyl acetate (UA) overnight at 4 °C. Between each of the preceding steps, the samples were washed five times, for 3 min each time, with ddH₂O. All the stains were filtered through a 0.22 μ m filter, immediately before use.

After overnight incubation, the samples were washed again with ddH₂O five times for 3 min each time, and *en bloc* Walton's lead aspartate staining was performed for 30 min at 60 °C. To prepare the lead aspartate solution, first, 0.399 g of L-aspartic acid (Sigma–Aldrich) was dissolved in 100 mL ddH₂O, and the solution was adjusted to pH 3.8 with 1 N KOH. Then, 0.066 g of lead nitrate was dissolved in 10 ml of the aspartic acid stock solution, and the pH was adjusted to 5.5 using 1 N KOH.

The tissue was then washed with ddH₂O five times for three minutes each time, and dehydrated through a graded ethanol series (30, 50, 70, and 90%, for 10 min, twice each), followed by 100% propylene oxide (for 10 min twice) at room temperature. The samples were then infiltrated with TAAB Hard Premix resin at ratios of 1:1, 2:1 and 3:1 with the resin: 100% propylene oxide, 30 min per incubation. Finally, the samples were incubated in 100% resin for 2×30 min, before embedding in a mold with 100% fresh resin. The samples were cured for 48 h at 60 °C.

Each embedded sample was mounted on an aluminum pin and trimmed to a block face of 0.4×0.4 mm² using a Leica EM UC6 UltraMicrotome (Leica Microsystems). To minimize the charging of the specimen, the samples were silver-painted and sputter-coated (Quorum Technologies, UK) with a thin layer (10 nm) of gold palladium.

Serial block-face scanning electron microscopy

The stained blocks were imaged using a Gatan 3View serial block-face imaging system (Gatan, Pleasanton, CA) installed on a FEI Quanta 250 FEG scanning electron microscope (FEI Company, Hillsboro, OR). The SEM was operated in low vacuum. Image stacks were collected using different setting parameters, depending on the level of magnification. These parameters are detailed in the “[Results](#)” section.

Image processing and analysis

The resulting datasets were assembled into volume files and aligned using Digital Micrograph (Gatan UK, Abingdon, UK). 3D reconstruction of the desired structures was performed in image stacks using Imaris 8.0.2 and Imaris 7.2 software (Bitplane). The structures deemed of interest to determine the location of the AuNPs, such as the cellular components of the neurovascular unit (i.e., BCECs, basal membrane, tight junctions, pericytes and astrocytes) and the intracellular endocytic vesicles of the BCECs, among others, were reconstructed in 3D by manually tracing the area in each plane and surface-rendering next. To obtain the 3D representation of the AuNPs, Fiji software (Schindelin et al. 2012) was used following the strategy indicated in the “[Results](#)” section.

Results

In an initial attempt to perform a 3D reconstruction of the BBB and to observe the localization of the AuNPs, capillary segments from different brain samples were fully 3D rendered using low-magnification image stacks (10,000–25,000×). Images were acquired from regions

of interest (ROI) of approximately 30,000 nm³. It must be pointed that the presence of bare resin in the lumen of the capillary, which causes electrical charging of the sample and, therefore, produces tissue deterioration and even breakage, restricts the possibility of obtaining long series of images. At this level of magnification, we used an incident electron beam with an energy of 2.3–2.4 kV and spot size 3, and a chamber pressure of 50 pa was applied to scan across the samples at a pixel dwell time of 60 μs. As capillaries are not straight and vertical structures, but twisted, and bifurcate within the brain parenchyma, it is difficult to acquire long capillary segments inside the available field of view. However, these conditions permitted us to monitor and acquire images of some transversal capillary segments along the *z* axis. These allowed us to identify the cellular elements that form the neurovascular unit and to reconstruct them in 3D. Online Resources 1 and 2 contain the images corresponding to two different stacks obtained at low-magnification. In Online Resource 1, the magnification is 14,900× and the voxel size is 16×16×100 nm. Some representative serial images from this stack can be observed in images A1 to C1 in Fig. 2. In the same figure, images A2 to C2 indicate the structures selected from A1 to C1 to perform the 3D reconstruction. In this stack, the rendered structures were two adjacent BCECs attached by a tight junction, a pericyte and two different astrocytic endfeet. After the 3D reconstruction, the structures can be visualized from different perspectives, as can be observed in Online Resource 3. Some frames from this video are presented as images D1 to D3 in Fig. 2. In Online Resource 2, the magnification is 11,130× and the voxel size 22.1×22.1×70 nm. In this case, the rendered structures were a BCEC and a pericyte, and their respective nuclei, and all of them can be visualized from different perspectives on Online Resource 4. Figure 3 shows some images from the stack, some selected structures in these images and some frames from Online Resource 4. Although this level of magnification permits visualization of the neurovascular unit and even the vesicles inside the BCECs (Fig. 3, C1 inset), the AuNPs cannot be clearly visualized: on one hand, due to the low resolution in the *x–y* plane and on the other hand, due to the backscattered electron signal.

Due to these technical problems, a second attempt with higher magnification imaging of capillary segments was considered to achieve sufficient resolution to visualize the AuNPs. Thus, we acquired higher magnification images (>30,000×) from ROIs of approximately 3000 nm³. We used an incident electron beam with an energy of 3.5 kV and spot size 3, and a chamber pressure of 50 pa was applied to scan across the samples at a pixel dwell time of 60 μs. At this magnification level, BCECs and the basal membrane of the endothelium can be observed, as well as both the vesicles inside the BCECs and the

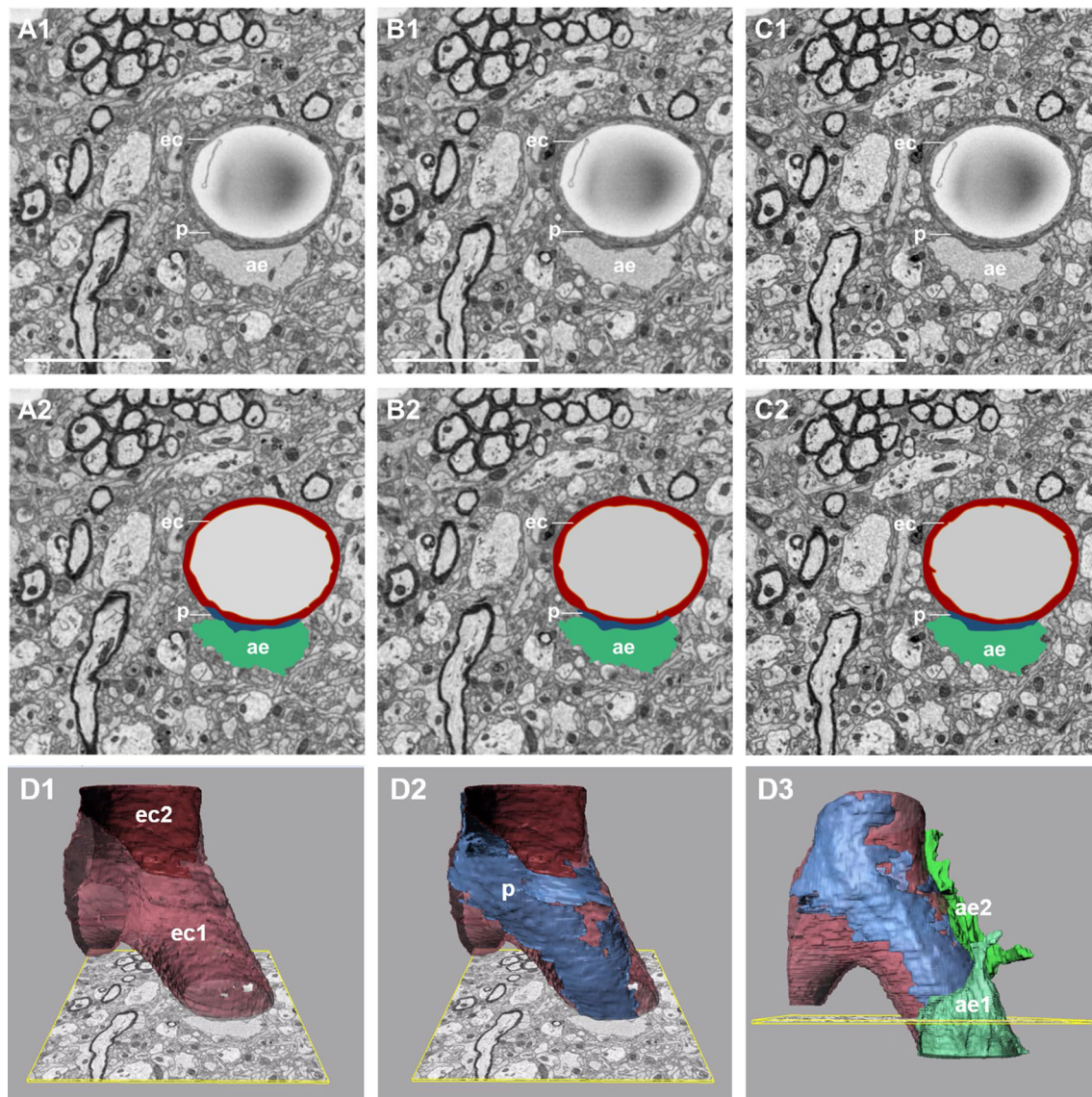


Fig. 2 (A1–C1) Three selected serial images from an SBF-SEM low-magnification image stack. The complete sequence of images can be visualized in Online Resource 1. (A2–C2) Colored areas represent some of the structures that were selected and manually traced in A1–C1, respectively, for the later 3D reconstruction. The selection process was performed on all the serial images in the stack. The resulting 3D reconstruction of the capillary segment containing the different cellular elements that form the neurovascular unit can be observed in the video contained in Online Resource 3. (D1–D3) Three snapshots

of the Online Resource 3 video showing the 3D reconstruction: (D1) Two adjacent endothelial cells (ec1 and ec2) can be observed. Image B1 is superimposed on the reconstruction. (D2) A pericyte rendering is added to the reconstruction. (D3) The complete 3D reconstruction of the BBB segment, which includes the renderings of the two adjacent endothelial cells, the pericyte and two astrocytic endfeet (ae1 and ae2). *ec* endothelial cell, *p* pericyte, *ae* astrocytic endfeet. Scale bar 5 μ m

AuNPs contained in them. Figure 4 is an example of these images: A1–A6 are selected serial images from an SBF-SEM high-magnification image stack (35,850 \times ; voxel size is 4.8 \times 4.8 \times 100 nm). Insets from images A3 and A6 are magnified in B3 and B6, respectively, to illustrate some vesicles. In C3 and C6, the brightness and contrast of these insets were modified to enhance visualization of the AuNPs contained in the vesicles. The sequential images in the stack

allowed us to reconstruct in 3D structures such as the basal membrane or the vesicles located inside the BCEC, by manually tracing the area in consecutive planes. However, this strategy cannot be used with AuNPs, because they are located in one or another section, but never in more than one section, so it is impossible to reconstruct these particles in 3D by manually tracing the area across consecutive planes. Thus, a copy of the stack was preprocessed using

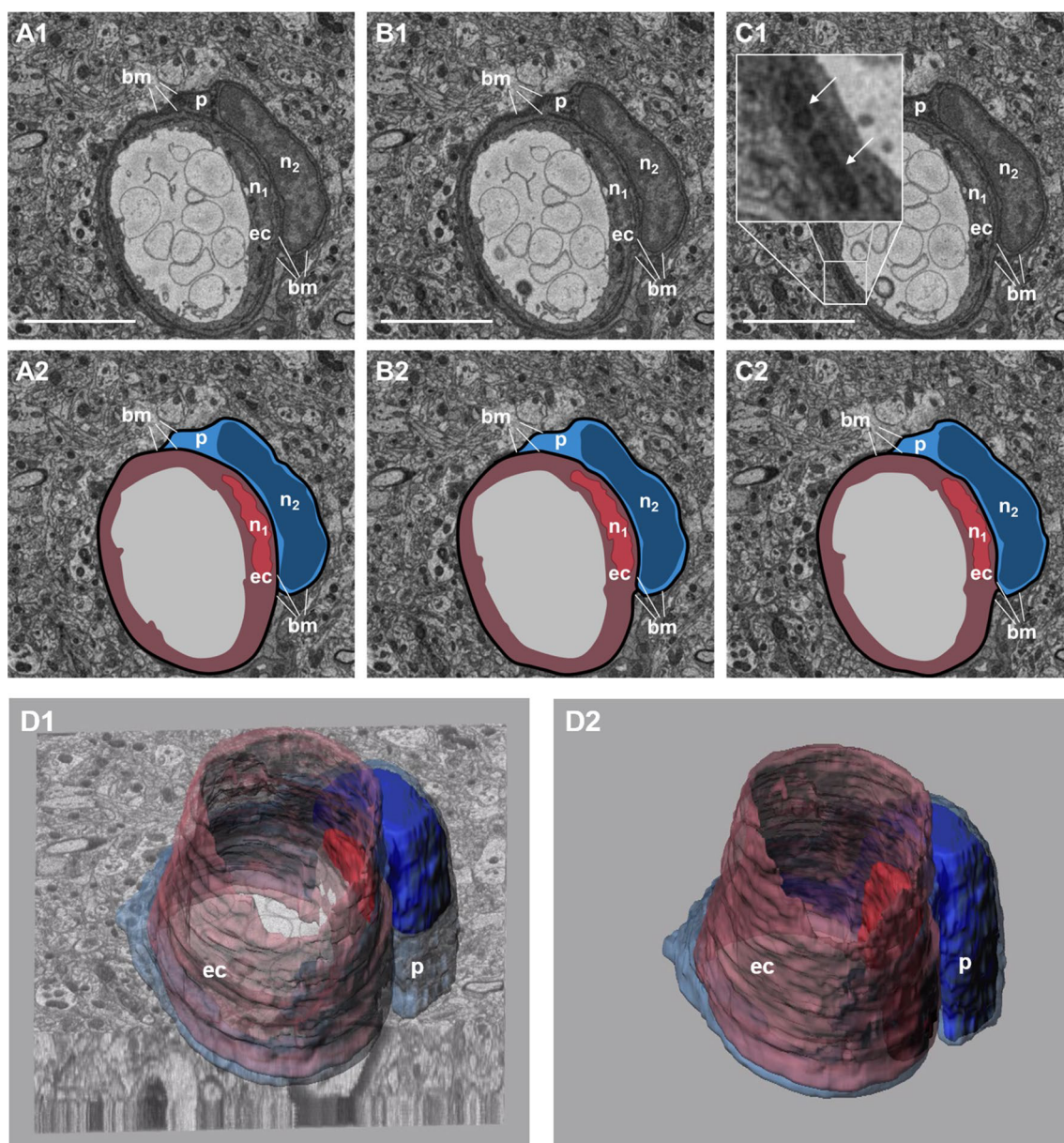


Fig. 3 (A1–C1) Three selected serial images from an SBF-SEM low-magnification image stack. The complete sequence of images can be visualized in Online Resource 2. (A2–C2) Colored areas represent the structures that were selected and manually traced in A1–C1, respectively, for later 3D reconstruction: an endothelial cell, a pericyte and their respective nuclei. The selection process was performed on all the serial images in the stack. The resulting 3D recon-

struction can be observed in the video contained in Online Resource 4. (D1–D2) Two snapshots of the video showing the 3D reconstruction. In D1, part of the tissue volume is represented to contextualize the 3D reconstruction of the capillary segment. *ec* endothelial cell, *n1* endothelial cell nucleus, *p* pericyte, *n2* pericyte nucleus, *bm* basal membrane. Scale bar 5 μ m

the Fiji software to later replace the AuNPs in each section by 3D spheres of similar size (20 nm diameter) in Imaris. Since the AuNPs are the darkest structures in these images, they could be segmented with the Fiji software using a low threshold value. An example of the AuNPs segmentation can be observed in Fig. 4, images D3 and D6, which correspond to the regions shown in B3 and B6, respectively. It must be pointed that in some individual cases, the darkness

of the vesicle hinders visualization of the AuNPs, and thus some AuNPs may be missing from the 3D reconstruction. After segmentation, the resulting binary particles were split using a watershed to allow individual reconstruction. The final binary stack of images was loaded into Imaris as an additional channel of the original stack and the AuNPs were rendered as spheres in the final 3D reconstruction. Thus, this level of magnification and this strategy allowed

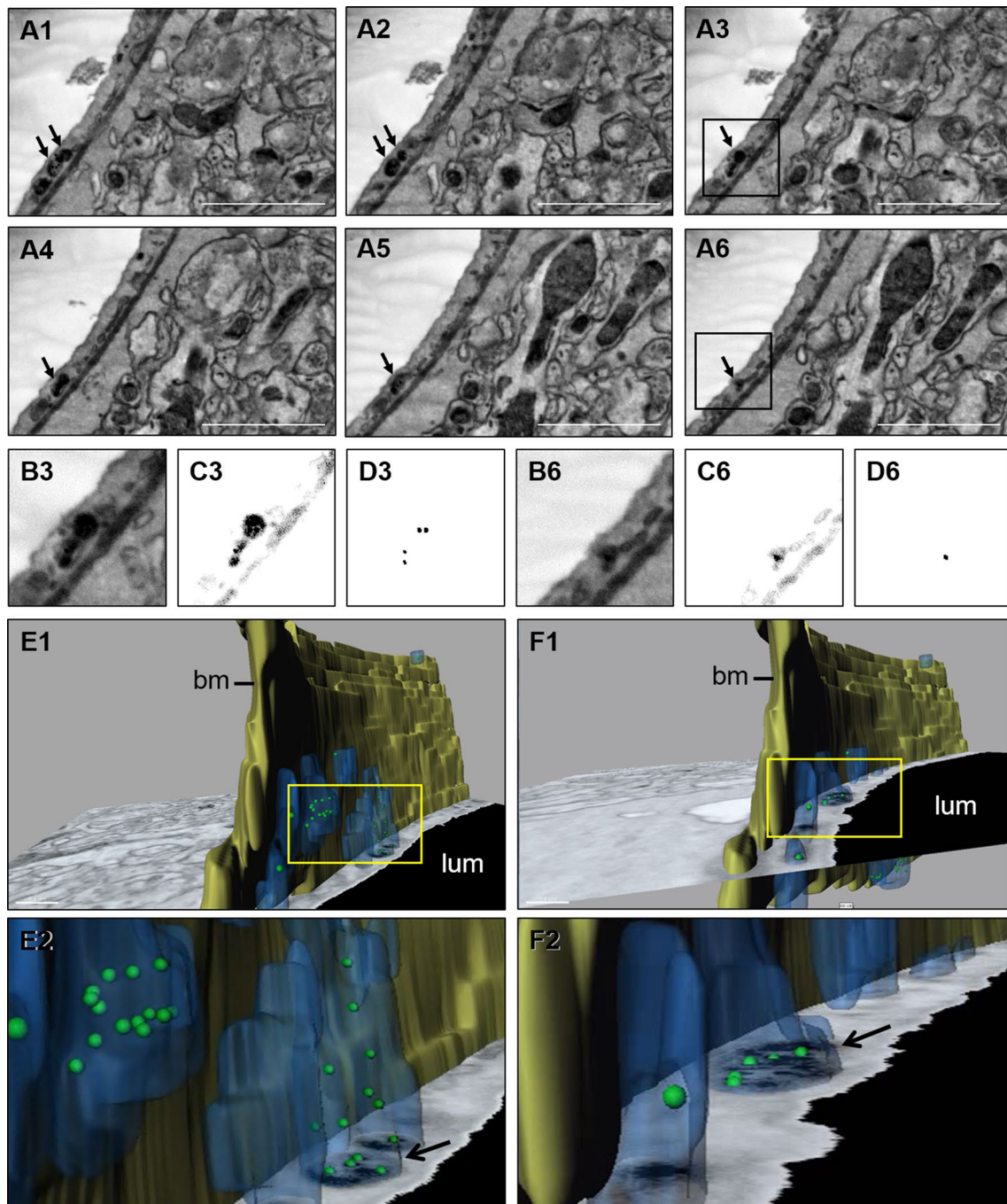


Fig. 4 (A1–A6) Six selected serial images from an SBF-SEM high-magnification image stack. *Arrows* indicate vesicles containing AuNPs. (B3 and B6) Original *insets* from A3 and A6, respectively. (C3 and C6) *Insets* from A3 and A6, respectively, in which the brightness and contrast has been modified to enhance visualization of the AuNPs. (D3 and D6) Images corresponding, respectively, to the *insets* from A3 and A6 that were obtained after applying the process of binarization, which permits us to localize the AuNPs. (E1 and F1) Representative images of the 3D reconstruction of the SBF-SEM

high-magnification image stack that contains images A1–A6. AuNPs are represented as green spheres. *Blue regions* are the endothelial vesicles. *bm* basal membrane, *lum* lumen of the capillary. An animation of this reconstruction can be observed in Online Resource 5. (E2 and F2) *Insets* from E1 and F1, respectively. The *arrow* in E2 indicates AuNPs that are irregularly distributed inside the vesicle, while the *arrow* in F2 indicates AuNPs with a peripheral distribution. *Scale bar* 2 μ m

for reliable 3D reconstructions in which the structures of the BBB, such as the BCECs, their basal membrane, and the vesicles located in the BCECs, as well as the precise location of the AuNPs could be visualized simultaneously. To facilitate the visualization of the vesicles and the AuNPs, we previously removed the region corresponding to the lumen using the Fiji software. Representative images of the 3D reconstruction from the SBF-SEM high-magnification image stack that contains sections A1–A6 can be observed in Fig. 4, images E1 and F1. An animation of this reconstruction can be observed in Online Resource 5. In the reconstructions performed at high-level magnification, we observed that all AuNPs found (we found a total of 96 AuNPs in the different samples analyzed) were located inside endocytic vesicles in the BCECs. No AuNPs were found on the luminal side of the BCEC or in the basal membrane of the endothelium. Regarding the distribution of the AuNPs inside the vesicles, in some cases they were randomly distributed (Fig. 4, image E2), while in others they appeared in the marginal region of the vesicle, near the membrane (Fig. 4, image F2). With respect to the shape of the vesicles, the 3D reconstruction allowed us to observe that although some of the vesicles containing 8D3-AuNP conjugates present a spherical or ellipsoidal form, they are often branched structures with irregular shapes, which sometimes even seem to merge with each other forming a complex endosomal network. As can be observed in Fig. 4, some vesicles that show a spherical or ellipsoidal shape in a 2D plane can be considered part of a complex and irregular structure when subsequent sections are analyzed as a whole 3D structure.

Discussion

As stated above, our first goal in this work was to establish and optimize the imaging conditions and configuration settings of the SBF-SEM to apply this technique to BBB sections, and to study the transport of AuNPs coated with an anti-TfR mAb.

The main problem with the use of this technique for our application was the charging of the samples. To decrease this charging, we used intensive osmium reactions and *en bloc* staining with heavy metals before embedding the samples, as well as sputter coating. However, the presence of bare resin in the lumen of the capillaries, the need for higher-magnification images, the use of higher voltages and the longer dwell times used to enhance both the signal-to-noise ratio and visualization of the AuNPs, caused charging and damage to the samples, hampering the serial imaging process. These observations are in agreement with previous work (Nguyen et al. 2016; Ohno et al. 2015) and currently, efforts are being made to overcome this problem, which is

particularly prominent in SBF-SEM imaging. Nguyen et al. showed that increasing conductivity using carbon-based conductive resins significantly reduces the charging of the samples during SBF-SEM imaging, and improves the resolution of the images by facilitating their cutting (Nguyen et al. 2016).

Meanwhile, the small size of the AuNPs (20 nm) was the major limiting factor as well as the key challenge when trying to visualize and render the particles in 3D. Low-magnification imaging was relatively easy, as the lower resolution of the images required a lower accelerating voltage, and thus there was less charging in tissue. As shown in Figs. 2 and 3, this level of magnification permits acquiring images of a large field of view and monitoring of relatively long capillary segments (more than 10 μm long), and results appropriate for the identification and 3D reconstruction of cellular elements and some subcellular elements as nuclei. However, this resolution was too low for clear identification of the AuNPs. This led us to increase the level of magnification and re-establish the setting parameters. A higher accelerating voltage permitted high-magnification image acquisition with sufficient resolution for AuNP visualization, as exemplified in Fig. 4. These conditions dramatically increased the charging of the tissue, but permitted us to acquire serial images (a maximum of 50 images in each stack) that are sufficient to study the AuNPs trafficking.

Thus, adjusting the balance among the different variables listed above (voltage, level of magnification, dwell time, chamber pressure and image size) and working under very specific conditions (as detailed in the "Results" section), allowed us to overcome this charging problem. We thus achieved the goal of reconstructing BBB segments and vesicles containing AuNPs in 3D, as well as precisely localizing the AuNPs within the cellular structures. As it was impossible to reconstruct the AuNPs in 3D by manually tracing the area in consecutive planes, we applied an innovative method in which we replaced the AuNPs by 3D spheres of a similar size at the exact same coordinates inside the tissue volume. In this way, we were able to visualize the AuNPs as 3D spheres inside the 3D tissue reconstructions.

A further consideration is that although theoretically the in-chamber ultramicrotome can cut sections as thin as 20–30 nm, we found that due to the presence of bare resin in the lumen of the capillaries and the ensuing charging, it was impossible to cut sections thinner than 70 nm. Consequently, information was lost when parts of the sample that did not contribute to the image were cut away. This led us to address that some information was lost along the *z* axis. Although this loss of information does not seem to influence the rendering of subcellular elements such as the vesicles, it may affect the visualization of some AuNPs. We, therefore, need to bear in mind that there might be

more AuNPs than those observed. There is an alternative SEM-based volume imaging method, in which tissue can be removed by milling the sample surface with a focused ion beam (FIB) (Briggman and Bock 2012; Kremer et al. 2015). Both methods are based on the principle of block-face imaging, in which the surface of a plastic embedded block of cells or tissue is imaged and then sectioned and reimaged (Kremer et al. 2015). However, the FIB-SEM technique offers a higher z-resolution of 5 nm and allows imaging at the isotropic voxel (Briggman and Bock 2012; Kremer et al. 2015). This technique is probably best suited for AuNP localization and 3D rendering, as it currently provides the highest 3D resolution, but it is limited to small volumes, whereas SBF-SEM can handle much larger volumes. Moreover, ion beam milling is much slower than sectioning with a diamond-knife, and the need for milling consistency also restricts the available field of view (to as little as $20 \mu\text{m}^2$) (Peddie and Collinson 2014). As discussed by Briggman and Bock, there is currently no one best volume EM imaging method (Briggman and Bock 2012): each method involves tradeoffs in size, resolution and completeness. Thus, a combination of both techniques would be the best choice, as they can complement each other. In any case, we can conclude that, although we probably did not visualize all the AuNPs during the process, the techniques and strategies used in the present work provide information on the transport or trafficking of AuNPs coated with an anti-TfR mAb on the BBB.

After obtaining the high-magnification images, the subsequent 3D analysis of the vesicles containing AuNPs yielded considerable information on the size and shape of these vesicles and the organization of the endosomal network inside BCECs. It also allowed us to complement our previous 2D TEM studies with regard to how AuNPs coated with the anti-TfR 8D3 antibody are processed in BCECs (Cabezón et al. 2015).

In our previous work, we postulated that vesicles that contain AuNPs were generally spherical or ellipsoidal vesicles of different sizes. However, the passage from 2D to 3D has revealed that these vesicles, at least those that contain a high number of AuNPs, are not large spherical or ellipsoidal vesicles but complex vesicular networks of up to $1 \mu\text{m}$ in size, and maybe even larger. So we can now assume that many of the supposedly spherical or ellipsoidal vesicles we analyzed in a 2D plane are in fact part of these complex networks; thus, the number of AuNPs per vesicle may be significantly higher than we concluded in our previous 2D study. In the present study, we administered the AuNPs coated with 8D3 intravenously and analyzed vesicles in BCECs by killing the animals 2.5 h after the intravenous administration. The fact that we observed high numbers of AuNPs in the complex networks suggests that endosomal sorting occurs relatively quickly. In our previous 2D study,

and after 2.5 h of recirculation, 95% of the AuNPs were observed inside endocytic vesicles of the BCECs; 4.6% of the AuNPs were located in the basal membrane of the endothelium, attached to the abluminal membrane of the BCEC; and just 0.2% of AuNPs were found located in the lumen of the capillary, attached to the luminal membrane of the cell or being internalized via clathrin-coated pits. In the present work, all the AuNPs were found inside endocytic vesicles, in agreement with the most frequent localization pattern observed in the previous study. In any case, pooling the information obtained from both the present and the previous study, we can conclude that AuNPs individually internalize inside BCECs via clathrin-dependent endocytosis. In the main route, the resulting endocytic vesicles fuse with early endosomes and enter the endosomal network, where vesicular fusion, maturation, sorting and rearrangement occur. It must be pointed that, in the case of the endosomal route of transferrin internalized via TfR, the resulting sorting endosomes may become acidified by ATP-dependent proton-pumps before their maturation into late endosomes. With this acidification, some receptors (TfR) and ligands (transferrin) dissociate and are recycled for another round of delivery (Hillaireau and Couvreur 2009). This pattern matches the AuNP localization observed in our previous 2D study. There, some of the AuNPs were observed attached to the vesicle membrane, whereas others seemed to be dissociated from the membrane, and possibly from the TfR. In the present 3D study, we observed similar patterns: while in some cases the AuNPs are randomly distributed inside the vesicle, in some others they seem to be in a peripheral disposition and thus probably attached to the vesicle membrane. In any case, in this route, the AuNPs end up accumulated in these complex vesicular networks, whose nature remains to be clarified.

Observing the vesicular network (Fig. 4, images E1 and F1), it can be seen that AuNPs accumulate in certain regions, whereas extended areas in other regions of the vesicular network are completely free of AuNPs. The presence of clusters of AuNPs inside the vesicular network may reflect the localization of the subdomains of the complex network, which could be useful to describe the trafficking of the AuNPs. To identify and characterize the different subdomains of the vesicular networks, utilization of SBF-SEM together with TEM (conventional or combined with immunostaining) would be a promising strategy, worthy of consideration in future studies. Moreover, it would be interesting to study earlier and later time points than the 2.5 h used in the present study, such as the 10 min or 24 h time points analyzed in our previous 2D study. In any case, although most of the vesicles follow this main route, in our previous 2D study we observed that some AuNPs reached the basal lamina of the endothelium, remaining attached to the basolateral membrane of the BCEC. In the present

study no AuNPs were found in the basal membrane of the capillaries, probably due to the small number of them that complete transcytosis and the limited number of capillary images that we have been able to analyze in this study. Be that as it may, in the previous study we observed no AuNPs far away from the basal membrane, i.e., in the brain parenchyma.

In summary, SBF-SEM imaging and 3D reconstruction of vesicles containing AuNPs provide complementary information on their morphology and reinforce the 8D3-AuNP trafficking model proposed in our previous study. Combining this technique with other volume EM imaging techniques is worth of considering for studies of drug transport across the BBB. The attachment of AuNPs to drugs or carriers could be a good strategy to monitor these substances in the most precise and accurate manner currently available.

Acknowledgements This study was funded by the Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad* via Grant BFU2013-47382-P, and by the *Centros de Investigación Biomédica en Red (CIBER)* at the Instituto de Salud Carlos III. We also would like to thank the *Generalitat de Catalunya* for funding the research group (2014SGR525). I. Cabezón and E. Augé were supported by an APIF fellowship from the *Universitat de Barcelona*.

References

- Abbott NJ, Patabendige A A K, Dolman D E M, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 36:437–449
- Alata W, Paris-Robidas S, Emond V, Bourasset F, Calon F (2014) Brain uptake of a fluorescent vector targeting the transferrin receptor: a novel application of in situ brain perfusion. *Mol Pharmacol* 11:243–253
- Briggman KL, Bock DD (2012) Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction. *Curr Opin Neurobiol* 22:154–161
- Cabezón I, Manich G, Martín-Venegas R, Camins A, Pelegrí C, Vilaplana J (2015) Trafficking of gold nanoparticles coated with the 8D3 anti-transferrin receptor antibody at the mouse blood-brain barrier. *Mol. Pharmaceutics* 12:4137–4145
- de Boer AG, Gaillard PJ (2007) Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:323–355
- Deerinck T J, Bushong E, Thor A, Ellisman M H (2010) NCMIR methods for 3D EM: a new protocol for preparation of biological specimens for serial block face scanning electron microscopy. *Microscopy* 6–8
- Freskgård PO, Urich E (2016) Antibody therapies in CNS diseases. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.03.014
- Gosk S, Vermehren C, Storm G, Moss T (2004) Targeting anti-transferrin receptor antibody (OX26) and OX26-conjugated liposomes to brain capillary endothelial cells in situ perfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:1193–1204
- Hillaireau H, Couvreur P (2009) Nanocarriers' entry into the cell. *Cell Mol Life Sci* 66:2873–2896
- Kremer A, Lippens S, Bartunkova S et al (2015) Developing 3D SEM in a broad biological context. *J Microsc* 259:80–96
- Lajoie JM, Shusta EV (2015) Targeting receptor-mediated transport for delivery of biologics across the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55:613–631
- Lee HJ, Engelhardt B, Lesley J, Bickel U, Pardridge WM (2000) Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood-brain barrier in mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 292:1048–1052
- Manich G, Cabezón I, Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J (2013) Study of the transcytosis of an anti-transferrin receptor antibody with a Fab' cargo across the blood-brain barrier in mice. *Eur J Pharm Sci* 49:556–564
- Moos T, Morgan EH (2001) Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood-brain barrier in the rat. *J Neurochem* 79:119–129
- Nguyen H B, Thai T Q, Saitoh S, Wu B, Saitoh Y, Shimo S, Fujitani H, Otake H, Ohno N (2016) Conductive resins improve charging and resolution of acquired images in electron microscopic volume imaging. *Sci Rep*. doi:10.1038/srep23721
- Ohno N, Katoh M, Saitoh Y, Saitoh S, Ohno S (2015) Three-dimensional volume imaging with electron microscopy toward connectome. *Microscopy* 64:17–26
- Pardridge WM (1998) CNS drug design based on the principles of blood-brain barrier transport. *J Neurochem* 70:1781–1792
- Paris-Robidas S, Emond V, Tremblay C, Soulet D, Calon F (2011) In vivo labeling of brain capillary endothelial cells after intravenous injection of monoclonal antibodies targeting the transferrin receptor. *Mol Pharmacol* 80:32–39
- Peddie CJ, Collinson LM (2014) Exploring the third dimension: Volume electron microscopy comes of age. *Micron* 61:9–19
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682
- Temsamani J, Rousselle C, Rees AR, Scherrmann JM (2001) Vector-mediated drug delivery to the brain. *Expert Opin Biol Ther* 1:773–782
- Zhang Y, Pardridge WM (2005) Delivery of β -galactosidase to mouse brain via the blood-brain barrier transferrin receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1075–1081
- Zhang Y, Calon F, Zhu C, Boado RJ, Pardridge WM (2003) Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism. *Hum Gene Ther* 14:1–12

IV. DISCUSIÓN

La BHE es una barrera altamente eficiente, cuya función principal es mantener la homeostasis del cerebro regulando el transporte de compuestos endógenos y exógenos entre la sangre y el encéfalo. Permite la entrada selectiva de nutrientes e impide el paso de organismos nocivos o sustancias no deseadas (de Boer y Gaillard, 2007; Correale y Villa, 2009; Chen y Liu, 2012). Su naturaleza restrictiva, sin embargo, resulta un gran obstáculo a la hora de tratar muchas enfermedades del SNC, ya que la mayoría de fármacos potenciales no pueden atravesar la BHE y ejercer su efecto (de Boer y Gaillard, 2007). Aproximadamente un 98% de las moléculas de pequeño tamaño (< 500 Da), y casi el 100% de las moléculas de gran tamaño (> 1000 Da), como las biomacromoléculas terapéuticas (p. ej. proteínas recombinantes o los ácidos nucleicos utilizados en terapia génica), no atraviesan la BHE (Pardridge, 2005b; Gaillard *et al.*, 2005; Hillarieau y Couvreur, 2009; Gabathuler, 2010).

Durante las últimas décadas se ha hecho un esfuerzo importante en estudiar y desarrollar diversas estrategias para hacer frente a este problema y poder distribuir fármacos y sustancias terapéuticas en el SNC de manera efectiva. El uso de vectores que actúan como ligandos de receptores de transcitosis presentes en las CECC es probablemente la estrategia más prometedora para el transporte de moléculas terapéuticas de pequeño y gran tamaño (Vlieghe y Khrestchatisky, 2013). Debido a que es un mecanismo fisiológico con una alta especificidad, el TMR es considerado un sistema de distribución seguro y efectivo, con gran potencial para liberar fármacos en el SNC de manera global y minimizar su distribución en órganos periféricos (Vlieghe y Khrestchatisky, 2013; Nagpal *et al.*, 2013).

Con el fin de adquirir un mayor conocimiento en torno a esta estrategia y al potencial y viabilidad del anticuerpo 8D3, dirigido contra el TfR, como vector molecular, hemos planteado en esta tesis una serie de objetivos y estudios experimentales que hemos llevado a cabo de manera secuencial.

Primeramente testamos la reactividad del 8D3 por el TfR presente en tejido cerebral de ratón. El marcaje por inmunofluorescencia del 8D3 nos permitió corroborar que este es capaz de unirse al TfR presente en las CECC cuando se incubaba directamente sobre cortes cerebrales de ratón. De este modo pudimos confirmar lo previamente concluido por Kissel *et al.* (1998) en el primer estudio llevado a cabo con el 8D3. El uso de la técnica de inmunofluorescencia nos permitió, sin embargo, obtener un marcaje más claro y nítido de los capilares sanguíneos cerebrales, en comparación con el marcaje obtenido por técnicas inmunohistoquímicas convencionales (usando 3,3-diaminobenzidina, DAB) en aquel primer estudio, donde los capilares se marcaban de manera más débil y menos precisa.

Seguidamente, con el fin de confirmar la reactividad del 8D3 por el TfR tras su administración *in vivo* y estudiar su capacidad transcitótica, administramos i.v. el anticuerpo en ratón, y lo dejamos recircular durante 20 min antes del sacrificio. El 8D3 fue

detectado a nivel de capilares sanguíneos, al igual que al ser incubado sobre corte. Este resultado nos indica que el 8D3 es capaz de reconocer y unirse al TfR presente en las CECC cuando es administrado i.v. El 8D3 presentaba un patrón de marcaje granular, a diferencia del marcaje de laminina que presentaba un aspecto más liso y uniforme. Este marcaje granular nos sugiere cierto proceso endocítico mediante el cual el 8D3 podría haber sido internalizado en las CECC. Aun así, el nivel de amplificación, la resolución y la calidad de imagen que nos permite obtener la microscopía óptica a la hora de observar cortes cerebrales de ratón no es suficiente como para poder llegar a una conclusión fehaciente. Broadwell *et al.* (1996) observaron un patrón granular similar en un estudio llevado a cabo con el mAb homólogo OX-26. A los 10 min de ser administrado i.v. el OX-26 presentaba un marcaje capilar uniforme, mientras que a partir de 1 h de recirculación el marcaje presentaba un aspecto más punteado, el cuál asociaban a la endocitosis del mAb.

Tal y como pudimos observar tanto en las imágenes 2D como en las reconstrucciones 3D realizadas de algunos capilares sanguíneos pertenecientes al hipocampo, el marcaje simultáneo con laminina delimitaba externamente el marcaje granular del 8D3, sugiriendo que este queda retenido en las CECC y no completa la transcitosis. Este resultado pone en duda por tanto la capacidad transcitótica de estos mAb, y contradice estudios previos que abogan por una eficiente transcitosis de los mismos. Estas diferencias podrían ser debidas a las diferentes técnicas utilizadas para la detección del anticuerpo. Los primeros trabajos llevados a cabo para estudiar la capacidad transcitótica de mAbs dirigidos contra el TfR, detectaron la presencia de estos anticuerpos radioactivamente marcados en homogeneizados de cerebro previamente sometidos al proceso de depleción de capilares (Friden *et al.*, 1991; Pardridge *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2000). Esta técnica se basa en la centrifugación y separación en función de la densidad del componente vascular y el resto de tejido nervioso, utilizando una solución de dextrano que separa ambos componentes. Existe sin embargo cierta controversia respecto a la fiabilidad de esta técnica, ya que la separación entre la vasculatura y el homogeneizado cerebral no es total (Friden *et al.*, 1991), y puede que el aumento de radioactividad en el homogeneizado se deba por tanto al anticuerpo adherido a la fracción capilar no separada. Además, puede que se dé cierta redistribución del compuesto tras el proceso de centrifugación. Moos y Morgan (2001) llevaron a cabo un estudio similar, y observaron que sólo un 6-9% del OX-26 alcanzaba el parénquima cerebral, mientras que la mayoría de anticuerpo se acumulaba en las CECC. La presencia de ese pequeño porcentaje en el cerebro lo atribuyeron a un transporte bifásico, en el que el OX-26 era internalizado de manera masiva y específica en las CECC, y un mínimo porcentaje era liberado de manera no-específica por algún otro mecanismo en el cerebro, poniendo en duda la transcitosis mediada por receptor del anticuerpo.

Los estudios llevados a cabo mediante técnicas microscópicas, como el realizado por Friden *et al.* (1991) con el OX-26, o el realizado por Paris-Robidas *et al.* (2011) con el RI7-217,

coinciden en que los mAbs principalmente se acumulan en las CECC, siendo nuestro resultado concordante con dicha conclusión. Aun así, debido al insuficiente nivel de amplificación de la microscopía óptica y al ruido de fondo generado por la inmunofluorescencia, no podemos descartar que una cantidad indetectable mediante esta técnica haya podido atravesar la BHE. Por otro lado, al igual que pasa con la Tf y la transcitosis del hierro, es hipotetizable que el mAb no complete la transcitosis, pero una vez internalizada la carga a transportar (el fármaco), esta sea capaz de disociarse del mAb y consiga llegar al tejido nervioso.

De manera subsiguiente, y con el fin de estudiar la capacidad del 8D3 para transportar sustancias a través de la BHE, administramos i.v. el IC formado por el 8D3 y fragmentos Fab' como carga proteica a transportar. Las razones por las que utilizamos fragmentos Fab' como carga fueron su facilidad de unión al mAb, su similitud a medicamentos biológicos dada su naturaleza proteica, y la facilidad para ser detectado mediante técnicas inmunofluorescentes. A ambos tiempos de recirculación estudiados (2.5 h y 24 h), ambos componentes fueron detectados en los capilares sanguíneos, con un patrón de marcaje granular y un alto grado de colocalización. Estos resultados indican que el 8D3 y los fragmentos Fab' permanecen unidos, o al menos en el mismo compartimento endosomal. Asimismo, ninguno de los marcajes sobrepasó el marcaje de laminina, lo que sugiere que ambos componentes quedan retenidos en las CECC. El análisis mediante FRET reveló una mayor colocalización entre los componentes del IC a las 2.5 h que a las 24 h, probablemente debido a que se esté dando algún tipo de procesamiento del IC dentro de las CECC.

Con el fin de evitar posibles inespecificidades de marcaje y obtener imágenes más nítidas a la hora de detectar nuestros componentes de interés mediante microscopía de fluorescencia, tanto el 8D3 como el IC fueron directamente conjugados a FITC (8D3^{FITC} y 8D3-Fab' ^{FITC}, respectivamente) y administrados i.v. De este modo, fue posible estudiar su localización *ex vivo* sin necesidad de inmunomarcaje. Los resultados nuevamente demostraron que tanto el 8D3 sólo como los componentes del IC quedaban retenidos en las CECC, sin sobrepasar el marcaje de laminina.

En vista de los resultados obtenidos, el siguiente paso para poder avanzar en el estudio del 8D3 era estudiar de una manera más precisa la localización del anticuerpo y esclarecer qué procesos se dan en la BHE a nivel subcelular. Se inició para ello un estudio mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), en el que se utilizaron AuNPs unidas al 8D3 para determinar con mayor precisión su localización.

Las AuNPs desempeñan un papel importante no sólo en el campo de la microscopía electrónica como componente principal del inmunomarcaje, sino también en el desarrollo preclínico de nuevas herramientas y estrategias para el diagnóstico y tratamiento de

diversas patologías del SNC (Velasco-Aguirre *et al.*, 2015). Las AuNPs han sido utilizadas en varios estudios para monitorizar diferentes ligandos y vectores moleculares, y analizar su capacidad para atravesar la BHE (Bickel *et al.*, 1994; van Gelder *et al.*, 1997; Candela *et al.*, 2008). Además, han sido postuladas como herramienta útil de diagnóstico, así como *carriers* potenciales para transportar sustancias a través de la BHE, si son funcionalizadas con algún vector molecular (Wientraub, 2013; Cheng *et al.*, 2014; Shilo *et al.*, 2014).

En la segunda fase de esta tesis diseñamos por tanto un constructo diferente, recubrimos AuNPs con el anticuerpo 8D3 con el fin de poder detectarlo por MET, pero mantuvimos el diseño experimental utilizado previamente, utilizando el mismo protocolo de administración y estudiando varios tiempos de recirculación. Mediante este diseño, las AuNPs no sólo permiten una directa visualización del conjugado por MET, evitando así inespecificidades de inmunodetección, sino que también actúan como cargo a transportar por el 8D3. La MET nos permitirá de este modo estudiar los procesos fisiológicos e intracelulares a los que son sometidas las AuNPs dentro de las CECC gracias al recubrimiento del 8D3.

El análisis mediante MET nos permitió estudiar la localización del conjugado 8D3-AuNP a nivel intracelular y a los diferentes tiempos de recirculación establecidos, y observamos que los patrones de localización predominaban de diferente manera a lo largo del tiempo. Al tiempo más corto de recirculación (10 min), las AuNPs fueron localizadas unidas al lumen del capilar, en pozos de clatrina o internalizadas en vesículas endocíticas que contenían una o pocas AuNPs en su interior. A los 30 min de recirculación, el patrón de localización de las AuNPs era semejante, aunque el porcentaje de AuNPs observadas aún sin internalizar había disminuído de 17.3% a 10.2%, y varias de las vesículas observadas contenían un mayor número de AuNPs. A los tiempos más largos de recirculación (2.5 h y 24 h), prácticamente el 100% de las AuNPs habían sido ya internalizadas en las CECC, y muchas de las vesículas contenían un mayor número de AuNPs en su interior, llegando a observar hasta 23 AuNPs en una sola vesícula. En cuanto a las AuNPs observadas en la lámina basal del endotelio, ninguna partícula fue observada a los 10 min de recirculación, y la mayoría de ellas fueron observadas a las 2.5 h, aunque el porcentaje con respecto al total de AuNPs observadas a ese tiempo seguía siendo pequeño (4.6%).

A los tiempos más cortos de recirculación (10 min y 30 min), por tanto, los patrones de localización predominantes eran el lumen del capilar, los pozos de clatrina y las vesículas endocíticas con pocas AuNPs en su interior. El número de AuNPs por vesícula aumentaba gradualmente a lo largo del tiempo, de manera que a los tiempos de recirculación más largos, las vesículas con un alto contenido de AuNPs eran el patrón de localización predominante.

El análisis cuantitativo realizado con los datos obtenidos permitió establecer y caracterizar un patrón tiempo-dependiente de internalización endocítica y procesamiento endosomal del conjugado 8D3-AuNP. Brevemente, este conjugado es internalizado en vesículas de manera individual a través del TfR y mediante un proceso de endocitosis dependiente de clatrina. La falta de internalización de AuNPs cuando estas son recubiertas por inmunoglobulinas G (IgGs) no-específicas corrobora la implicación del 8D3 y el TfR en el proceso de internalización. Además, los pozos de internalización formados al endocitar cada AuNP poseen características propias de los pozos de clatrina: un recubrimiento electrodenso alrededor de la membrana celular y un tamaño aproximado de 100 nm. Las vesículas recién endocitadas pueden seguir dos rutas endosomales diferentes. La mayoría de ellas entran en un proceso endosomal de fusión, reorganización y maduración vesicular, en el que las AuNPs terminan acumulándose en vesículas de carácter tardío, como pueden ser endosomas tardíos, cuerpos multivesiculares o lisosomas, cuya naturaleza aún está por dilucidar en trabajos futuros, aunque es poco probable que sean de naturaleza lisosomal. Un pequeño porcentaje de las vesículas endocíticas, sin embargo, consigue escapar de esta ruta y fusionarse con la membrana abluminal, de modo que algunas AuNPs, de forma individual, completan la transcitosis alcanzando la lámina basal, pero no el parénquima cerebral. Esto sugiere que el anticuerpo 8D3 que recubre las AuNPs sigue unido al TfR, de manera que las AuNPs no pueden desprenderse de la membrana celular y quedan retenidas en la lámina basal (Figura 9).

Gracias a la microscopía electrónica hemos podido monitorizar de manera precisa la dinámica intracelular que siguen las AuNPs en la BHE cuando son recubiertas por el 8D3 y administradas *in vivo*, y de este modo presentamos por primera vez evidencias directas de la capacidad de este mAb de transportar grandes cantidades de estas partículas dentro de las CECC.

Este estudio sin embargo no deja de ser un análisis de imagen bidimensional, y conlleva una serie de limitaciones que decidimos abordar llevando a cabo un estudio estructural tridimensional utilizando la técnica SBF-SEM (*Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy*). El objetivo principal de este nuevo trabajo era primeramente determinar si la técnica era aplicable y resultaba adecuada para poder realizar reconstrucciones 3D de segmentos de BHE y de las vesículas endocíticas que contienen el conjugado 8D3-AuNP, y en caso de ser así, intentar obtener información adicional así como una visión más realista del proceso observado por MET. La SBF-SEM es una técnica recientemente desarrollada que, valiéndose de un microscopio electrónico de barrido, permite obtener imágenes seriadas y reconstruir tridimensionalmente regiones tisulares relativamente grandes (Ohno *et al.*, 2015). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para explorar los mapas de conectividad neuronal, pero apenas existen estudios en torno a la BHE aplicando esta técnica, y no se conocen trabajos en torno al transporte de moléculas a través de la misma.

Se repitió el diseño experimental *in vivo* previamente utilizado para MET, aunque en este caso solo se reprodujo a 2.5 h de recirculación, ya que es a este tiempo donde mayor diversidad encontramos en cuanto al patrón de localización de las AuNPs. Se realizaron reconstrucciones 3D de los componentes principales de la UNV, como son las CECC, los pericitos o los pies astrocíticos, a partir de bloques de imágenes seriadas obtenidas a un nivel de magnificación entre 10000 x y 25000 x. Este rango de magnificación permitió la reconstrucción de segmentos relativamente largos de BHE (más de 10 μm a lo largo del eje Z), sin embargo, no era suficiente para visualizar las AuNPs, y la carga eléctrica generada en el tejido debido a la presencia de resina de inclusión en el lumen del capilar provocaba de manera progresiva el deterioro de la muestra. De manera subsiguiente, se obtuvieron series de imágenes de segmentos de CECC a un mayor nivel de magnificación (>30,000 x), previa optimización de los ajustes de configuración para ello, y evitando incluir el lumen entero del capilar en la ROI. Esto nos permitió realizar reconstrucciones 3D de las vesículas endocíticas que contienen AuNPs. A pesar de que las AuNPs eran visibles, debido a su pequeño tamaño, era imposible representarlas en 3D. Aplicando un método novedoso y con ayuda del programa de ordenador Fiji fue posible reemplazar las AuNPs por esferas 3D de tamaño similar y en las coordenadas exactas dentro del volumen de tejido, pudiendo así representar tridimensionalmente todas nuestras estructuras de interés.

La reconstrucción tridimensional de las vesículas reveló una gran complejidad de estas en cuanto a estructura, llegando a alcanzar más de 1 μm de longitud: a pesar de que algunas de estas vesículas tienen forma esférica o elipsoidal, muchas de ellas son estructuras ramificadas con formas irregulares, que a menudo parecen fusionarse entre sí formando redes endosomales complejas. Muchas de las vesículas consideradas esféricas o elipsoidales en los análisis bidimensionales, forman en realidad parte de estas redes complejas, tal y como hemos podido observar al analizar secciones subsiguientes de las estructuras 3D, y como consecuencia, el número de AuNPs por vesícula será considerablemente mayor a lo previamente concluido.

Respecto a la localización de las AuNPs, todas ellas se encontraban dentro de vesículas, en concordancia con el patrón de localización más frecuente observado a 2.5 h de recirculación en el estudio 2D previo. La distribución de las AuNPs dentro de las vesículas también se asemeja a la distribución observada en el estudio anterior a los mayores tiempos de recirculación; algunas de ellas permanecen unidas a la membrana vesicular, mientras que otras parecen estar sueltas en el espacio vesicular, lo que sugiere una pérdida de interacción entre el conjugado 8D3-AuNP y el TfR de la membrana, entre el 8D3 y la AuNP, o ambas cosas.

La aplicación de la técnica SBF-SEM nos ha proporcionado información complementaria principalmente en torno a la morfología de las estructuras endosomales implicadas en el procesamiento del 8D3, y reafirma el modelo de tráfico intracelular propuesto para el

conjugado 8D3-AuNP en nuestro estudio previo. Aun así, han de considerarse ciertas limitaciones a la hora de utilizar esta técnica; el riesgo de generar carga eléctrica y deteriorar el tejido hace que el grosor de las secciones que se van cortando no pueda ser menor de 70 nm. Esto hace que se vaya perdiendo información a lo largo del eje Z, ya que el sistema SBF-SEM solo adquiere la imagen de la superficie del corte.

Existen sin embargo otras técnicas de microscopía electrónica de volumen como la FIB-SEM (*Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy*) que podrían complementar y suplir los puntos débiles de la SBF-SEM. Esta técnica también se fundamenta en la adquisición de imágenes seriadas a lo largo del eje Z de un bloque de tejido. En este caso, sin embargo, las secciones no se cortan con una cuchilla de diamante, sino que desaparece por ablación gracias a un haz de iones focalizado. De este modo pueden adquirirse cortes mucho más finos (~5 nm) y obtener una mayor resolución en el eje Z. Sin embargo, el campo de visión y el volumen a monitorizar son más limitados (Briggman y Bock, 2012; Kremer *et al.*, 2015). Es por ello que el empleo de ambas técnicas en combinación podría considerarse a la hora de realizar estudios similares.

La información obtenida de los estudios de microscopía electrónica nos sugiere que el conjugado 8D3-AuNP sigue una ruta endosomal similar a la de la Tf (Hillarieau y Couvreur, 2009). La Tf es internalizada por un proceso endocítico dependiente de clatrina gracias a la interacción con el TfR. Las vesículas endocíticas resultantes entran en un proceso de fusión y maduración vesicular, pasando de endosomas tempranos a endosomas de clasificación y posteriormente a endosomas tardíos. Durante este proceso los endosomas se van acidificando ($\text{pH} \approx 6$) de modo que los ligandos se disocian de sus receptores y éstos son devueltos a la membrana luminal de las CECC para cumplir de nuevo su función. Este patrón concuerda con la localización de las AuNPs observada en las reconstrucciones 3D de las vesículas, donde algunas permanecen unidas a la membrana mientras que otras están sueltas en el espacio vesicular, y probablemente disociadas del TfR. Las AuNPs finalmente quedan acumuladas en estas redes vesiculares maduras, cuya naturaleza está aún por dilucidar (Figura 9).

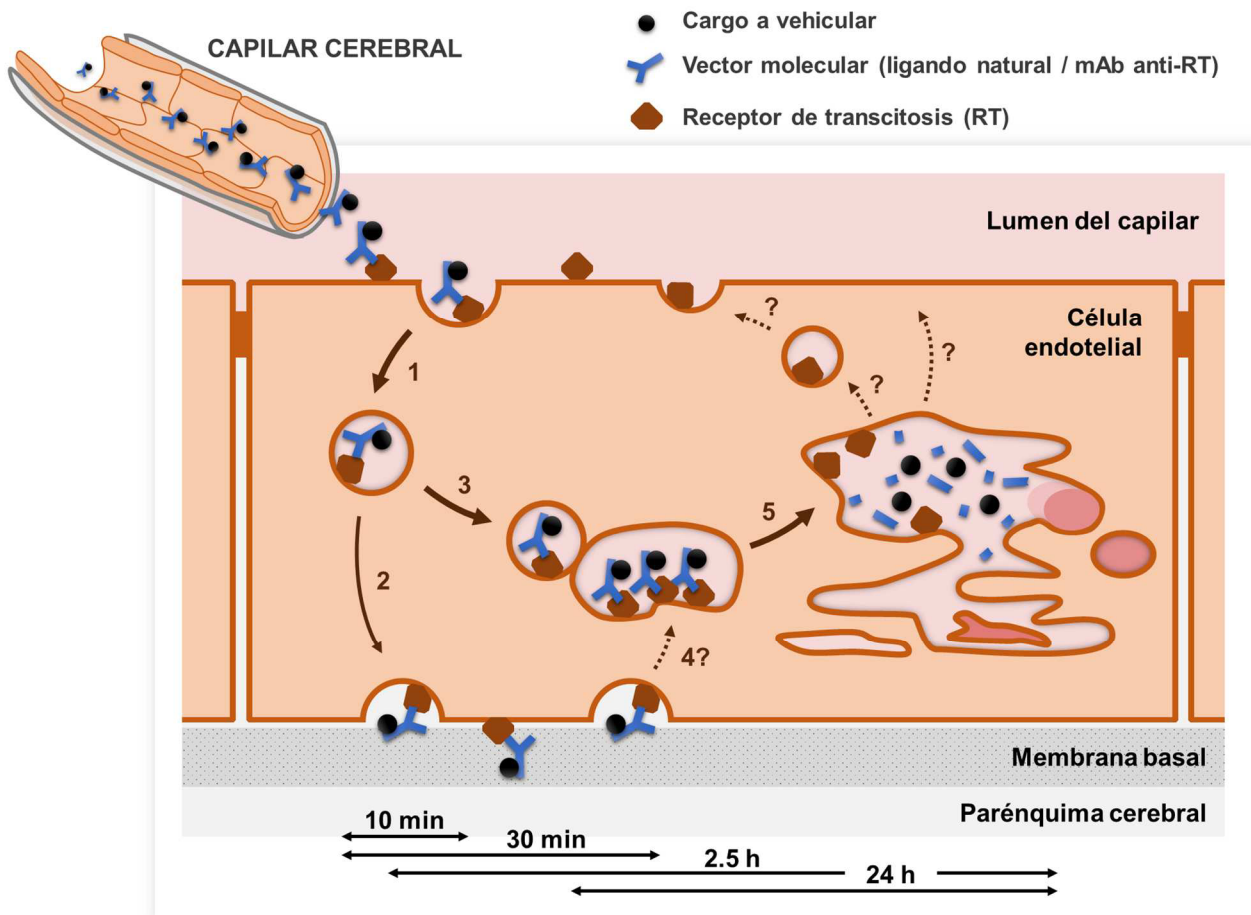


Figura 9. Modelo propuesto de internalización endocítica y procesamiento endosomal del 8D3 en la BHE. 1) endocitosis del complejo vector-cargo/receptor; 2) maduración y clasificación endosomal de las vesículas que contienen el complejo vector-cargo/receptor (vía mayoritaria); 3) exocitosis del complejo vector-cargo/receptor (vía minoritaria); 4) anclaje a la membrana basal y posible reinternalización del complejo vector-cargo/receptor; 5) acumulación del complejo vector-cargo/receptor en endosomas tardíos y procesamiento o disociación de mAb y receptor. Las barras de progresión temporal de la parte inferior indican el tiempo transcurrido desde la administración del complejo vector-cargo hasta el sacrificio del animal.

Dada la controversia ante el posible uso del TfR y mAbs dirigidos contra el mismo para el transporte de sustancias a través de la BHE, el trabajo realizado durante esta tesis pretende aportar nueva información y esclarecer preguntas aún sin resolver en torno a la dinámica y los mecanismos intracelulares implicados. Nuestros resultados demuestran que el 8D3 es capaz de dirigir el cargo a los capilares sanguíneos cerebrales e introducirlos en las CECC. Ello hace que una gran parte del cargo administrado i.v. quede en la zona cerebral en vez de dirigirse a otros órganos, y además, consigue superar la primera fase de la barrera (la membrana luminal) alcanzando el interior de las CECC. En el caso de las AuNPs vemos que la mayoría quedan acumuladas dentro de estas células, salvo contadas excepciones en las que la vesícula endocítica esquiva la ruta endosomal convencional y llega a exocitar la AuNP por la parte abluminal.

Estos resultados contradicen estudios previos a la tesis que alegan un alto nivel de eficiencia en el transporte del 8D3 y otros mAbs anti-TfR, y/o sus cargos a través de la BHE (Penichet *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Zhang y Pardridge, 2005; Zhou *et al.*, 2012). A la hora de repasar la bibliografía previa y comparar resultados es importante tener en cuenta las diferencias entre los diseños de los constructos, así como las técnicas utilizadas para estudiar el paso de las sustancias a través de la BHE.

La mayoría de los trabajos previos a esta tesis hicieron uso de técnicas de detección indirectas, como medición por radioactividad o actividad enzimática, para estudiar el transporte de sustancias (Penichet *et al.*, 1999; Zhang y Pardridge, 2005; Zhou *et al.*, 2012). Como se ha mencionado anteriormente, el uso de isótopos radioactivos como marcadores del constructo para medir parámetros farmacocinéticos como el aclaramiento plasmático o el volumen de distribución en tejido puede erróneamente sugerir que el constructo ha completado la transcitosis: el nivel de radioactividad disminuye en sangre y aumenta en el homogeneizado de cerebro habiéndose internalizado el constructo en las CECC pero sin alcanzar el parénquima cerebral (Penichet *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2012). Esta explicación puede ser igualmente aplicable a los resultados obtenidos de mediciones de actividad enzimática (Zhang y Pardridge, 2005). El método de depleción de capilares puede además dar lugar a interpretaciones equívocas, ya que es muy difícil separar completamente el componente vascular del resto de tejido nervioso (Lee *et al.*, 2000; Moss y Morgan, 2001).

En un estudio más reciente llevado a cabo por Paris-Robidas *et al.* (2016), las interpretaciones sacadas de estudios de biodistribución similares fueron completamente diferentes. Recubrieron nanocristales *Quantum Dot* (Qdots) con el anticuerpo RI7-217 e hicieron el estudio *in vivo* en ratones. En este caso, cuantificaron la cantidad de conjugado en el tejido mediante la determinación de cadmio por ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), en vez de utilizar radioactividad como en los trabajos previos. El fundamento experimental, sin embargo, fue el mismo, cuantificar el conjugado tanto en plasma como en tejido, tanto en homogeneizados de cerebro normales como en homogeneizados de cerebro sometidos a la depleción de capilares y previa perfusión de los vasos sanguíneos. Para confirmar que la depleción de capilares se había realizado de manera exitosa, utilizaron un ensayo típico que mide la actividad de la enzima γ -GT (expresada de manera específica en las CECC). Mediante este ensayo se puede determinar la cantidad de componente vascular que ha quedado en el sobrenadante supuestamente libre de capilares. Las mediciones basadas en los homogeneizados de cerebro totales mostraron una mayor retención del conjugado en la zona cerebral en comparación con el control, que se distribuía en mayores cantidades por otros órganos. Esta medición sin embargo no discrimina entre la acumulación endotelial y la penetración del conjugado en el parénquima cerebral. Las mediciones llevadas a cabo tras la depleción de capilares indicaron que el 90% de los RI7-217-Qdots quedaban retenidos en el componente vascular,

es decir, secuestrados en las CECC, mientras que solo el 10% fue detectado en el sobrenadante postcapilar. Aun así, esta proporción de RI7-217-Qdots recuperada del sobrenadante era equivalente a la proporción de Y-GT en cada fracción, lo que sugiere que la presencia de Qdots en el sobrenadante es debido a los capilares residuales que han quedado en el mismo. Estas interpretaciones de los resultados hechas de una manera más cuidadosa han dado sin duda lugar a conclusiones más fiables que afirman que el pequeño porcentaje de conjugado observado en el tejido nervioso proviene de un fallo técnico y no de una transcitosis eficiente.

Otros estudios han utilizado el efecto farmacológico o terapéutico del cargo transportado para testar si el efecto aumenta cuando la sustancia ha sido conjugada al mAb (Bickel *et al.*, 1993; Wu y Pardridge, 1996; Zhang *et al.*, 2004; Yemişci *et al.*, 2012). El efecto terapéutico puede medirse de diferentes maneras, según el fármaco estudiado; pueden medirse o bien mediante algún indicador bioquímico, marcador celular o parámetro fisiológico, o bien mediante cambios comportamentales o neurológicos, o mediante un aumento o disminución de la tasa de supervivencia. A pesar de que los resultados presentados en la mayoría de los casos son prometedores, ésta también es una técnica indirecta, por lo que los mecanismos intracelulares mediante los que el fármaco supuestamente alcanza el parénquima cerebral siguen sin estar esclarecidos.

Las diversas técnicas indirectas hasta ahora mencionadas carecen de suficiente fiabilidad a la hora de demostrar la eficiencia en el transporte de sustancias a través del TMR. Sería necesario sin duda complementar dichos estudios con técnicas microscópicas para mostrar evidencias directas de la eficiencia de los *Caballos de Troya* moleculares estudiados y obtener conocimiento sobre los mecanismos intracelulares implicados.

Las técnicas de microscopía óptica tradicionales permiten estudiar la presencia y localización (sin demasiado refinamiento y de manera aproximada) de enzimas que tienen sustratos coloreados, tales como la HRP o la β -galactosidasa (Broadwell *et al.*, 1996; Zhang y Pardridge, 2005). Estas enzimas han sido utilizadas como carga a vehicular por mAbs anti-TfR, o sus secuencias de ADN encapsuladas en liposomas funcionalizados con estos mAbs para ser transfectadas y estudiar su expresión *in situ* (Shi *et al.*, 2001). Aun así, los resultados obtenidos mediante esta técnica de detección han de interpretarse con mucha precaución ya que las enzimas endógenas pueden interferir en el proceso. La microscopía de fluorescencia ha sido la técnica de elección en estudios posteriores, ya que permite realizar marcajes simultáneos de diferentes estructuras y estudiar su colocalización (Paris-Robidas *et al.*, 2011). La resolución de esta técnica, sin embargo, tampoco es suficiente para tener una idea sólida sobre la eficiencia de los *Caballos de Troya* moleculares, y la autofluorescencia residual generada por el propio tejido dificulta además el trabajo de detección.

La MET permite detectar de manera precisa y a un nivel subcelular la localización de compuestos como las AuNPs o los Qdots en tejidos biológicos tras su administración *in vivo*. Varios estudios, la mayoría datados en los últimos 5 años, han utilizado estos compuestos como *carriers* o cargos y los han monitorizado mediante esta técnica para ver si consiguen atravesar la BHE cuando son recubiertos por ligandos endógenos, péptidos o mAbs que reconocen el TfR (Bickel *et al.*, 1994; Prades *et al.*, 2012; Wiley *et al.*, 2013; Paris-Robidas *et al.*, 2016). Bickel *et al.* (1994) estudiaron la localización subcelular del conjugado OX-26–AuNP a nivel cerebral tras su administración en ratas. Las AuNPs utilizadas eran de 5nm de diámetro, por lo que hicieron uso del método de amplificación por plata para amplificar la señal, el cual implica cierto riesgo de inespecificidad. En cualquier caso, las observaciones realizadas les llevaron a la conclusión de que la mayoría de AuNPs quedaban retenidas dentro de las CECC, mientras que unas pocas conseguían llegar a la parte abluminal de la BHE, habiendo completado la transcitosis, pero sin llegar más allá en el parénquima cerebral. Prades *et al.* (2012) utilizaron un péptido dirigido contra el TfR para vehicular las AuNPs a través de la BHE, mientras que Wiley *et al.* (2013) hicieron uso de la Tf con el mismo fin. En ambos casos observaron presencia de AuNPs en el parénquima cerebral, concluyendo en una exitosa transcitosis de las mismas. Aun así, el porcentaje de AuNPs observadas por Prades *et al.* en el tejido nervioso representaba solamente el 0'07% de las AuNPs administradas. Además, este estudio no dilucida cuál es el mecanismo mediante el que estas AuNPs alcanzan el parénquima cerebral, por lo que sería necesario un análisis observacional más exhaustivo para saber más acerca de dicho mecanismo y si éste está mediado por el TfR. En el caso de Wiley *et al.* se observó que variando el número de moléculas de Tf por AuNP (avidéz), la cantidad de AuNPs que alcanzaba el parénquima cerebral era significativamente diferente; las AuNPs con un menor número de moléculas de Tf (menor avidéz) conseguían alcanzar más fácilmente el parénquima cerebral en comparación con las AuNPs de mayor avidéz, que quedaban mayormente retenidas en las CECC. Esto probablemente se deba a que las primeras conseguían disociarse más fácilmente de los TfR y completar la transcitosis. Aun así, no presentan datos en cuanto al porcentaje o número de AuNPs observadas en el parénquima con respecto al número total de partículas administradas u observadas. Este estudio además solo estudia un tiempo de recirculación (8 h post-inyección), lo cual resulta insuficiente para dilucidar la progresión temporal de la distribución de las AuNPs así como los mecanismos implicados en el transporte a nivel de BHE.

En el estudio llevado a cabo por Paris-Robidas *et al.* (2016) y previamente mencionado en esta discusión, se realizó un análisis observacional más exhaustivo mediante MET de los conjugados RI7-217-Qdots para analizar su distribución subcelular a diferentes tiempos de recirculación. Demostraron que los Qdots, al ser recubiertos por el mAb RI7-217, eran endocitados por las CECC, y la mayoría de ellos seguían una ruta endocítica hacia cuerpos multivesiculares con una acumulación progresiva en el tiempo en dichas estructuras.

Algunos de los Qdots fueron localizados en la parte abluminal de las CECC, principalmente en la lámina basal y en zonas adyacentes del parénquima cerebral, aunque dichas observaciones fueron poco frecuentes. Tras un análisis cuantitativo llevado a cabo a partir de los datos observacionales obtenidos, estimaron que solamente un 0.1% de los Qdots administrados alcanzaba el parénquima cerebral, un porcentaje extremadamente bajo para considerarlo de uso terapéutico.

A diferencia de los estudios hechos con técnicas indirectas, la mayoría de los estudios llevados a cabo mediante técnicas microscópicas convergen en la idea de que los vectores moleculares dirigidos contra el TfR y/o sus cargos a vehicular quedan mayormente retenidos en las CECC. Los estudios realizados mediante técnicas de microscopía electrónica demuestran además que cierta cantidad de los constructos administrados, escasa en la mayoría de los casos, alcanza la parte abluminal de la BHE o el parénquima cerebral, completando la transcitosis.

Tal y como observamos en nuestro estudio mediante MET, la mayoría de AuNPs recubiertas por 8D3 se acumulan progresivamente en estructuras endosomales maduras dentro de las CECC, mientras que un pequeño porcentaje de las AuNPs observadas (2.7% del total de AuNPs observadas) completa la transcitosis y llega a la lámina basal, probablemente como resultado de haber seguido una ruta endosomal diferente. Estos resultados concuerdan con la acumulación mayoritaria de los RI7-217-Qdots en cuerpos multivesiculares observada por Paris-Robidas *et al.* (2016), siendo ambos estudios los únicos en estudiar con detenimiento y a nivel subcelular los procesos a los que son sometidos los constructos a nivel de BHE.

Partiendo de estos resultados podemos, primeramente, refutar la hipótesis de una eficiente capacidad transcitótica del 8D3, y en segundo lugar, sacar una serie de conclusiones que serán de utilidad de cara a responder ciertas preguntas y optimizar la estrategia del TMR para transportar sustancias a través de la BHE.

Normalmente, el complejo Tf-TfR evita la ruta lisosomal y el TfR es reciclado para volver de nuevo a la membrana luminal (Stahl y Barbieri, 2002; Aisen, 2004). Tal y como observamos en la caracterización inmunohistoquímica de las vesículas que contenían las AuNPs, estas vesículas no son en su mayoría de carácter lisosomal, por lo que resulta probable que estas estructuras sean cuerpos multivesiculares o endosomas tardíos que no sigan hacia la ruta lisosomal, tal y como hace el TfR con su ligando natural. Las AuNPs que logran alcanzar la lámina basal tampoco siguen la ruta hacia la degradación lisosomal, pero no consiguen ir más allá y alcanzar el parénquima cerebral.

Tanto la acumulación en endosomas de carácter tardío, como el hecho de que las AuNPs que completan la transcitosis queden ancladas a la membrana abluminal, probablemente se deba a la alta afinidad que tiene el 8D3 por el TfR, y por tanto a la incapacidad de

disociarse del mismo. Una disociación más temprana entre el mAb y el receptor, o entre el mAb y el cargo podría, por un lado, modificar el procesamiento endosomal del cargo y cambiar su destino, y por otro lado, en caso de que todo el complejo completara la transcitosis, desengancharse del mismo y alcanzar el parénquima cerebral.

Partiendo de esta premisa, por tanto, se pueden abordar diferentes aspectos de cara al diseño de los constructos. Estos aspectos son hoy en día foco de investigación y punto de partida hacia nuevas perspectivas. Por un lado, la funcionalización de *nanocarriers* con mAbs anti-TfR puede ser una prometedora estrategia, ya que una vez internalizados en las CECC pueden liberar el fármaco encapsulado y este, completar la transcitosis por su cuenta. El uso de nanopartículas pH-sensitivas resultan de gran interés de cara a una liberación programada del fármaco una vez esté dentro de estructuras endosomales (Felber *et al.*, 2010).

Existen diversos estudios donde se han utilizado mAbs anti-TfR para funcionalizar *nanocarriers* y transportar sustancias encapsuladas a través de la BHE (Shi *et al.*, 2001; Gosk *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Rivest *et al.*, 2007; Pang *et al.*, 2008; Papademetriou *et al.*, 2013; Loureiro *et al.*, 2015), y a pesar de que muchos de ellos presentan resultados interesantes, aún existe un gran desconocimiento en cuanto al mecanismo de actuación de los mismos, y son necesarios estudios más exhaustivos mediante técnicas de detección directas de cara a la optimización de esta estrategia y un futuro planteamiento para su aplicación clínica.

En segundo lugar, el tipo de unión química entre el vector y el fármaco es también un punto importante a considerar de cara a la optimización de los constructos. Independientemente de si el mAb completa la transcitosis o no, la disociación entre el vector y el cargo/fármaco podría facilitar el paso de este último al parénquima cerebral. Esta unión, sin embargo, tiene que ser lo suficientemente fuerte y estable para que el mAb consiga introducir el fármaco en las CECC. Hasta la fecha, la mayoría de estudios han utilizado uniones covalentes y robustas en el diseño de sus constructos, y han sido escasos los trabajos donde se han estudiado el uso de enlaces químicos escindibles entre vector y fármaco. Kratz *et al.* (2000) y Clark y Davis (2015) han propuesto el uso de enlaces químicos escindibles a un pH ácido, ya que la acidificación endosomal podría contribuir de manera natural a la disociación vector/fármaco y la posterior liberación de este último en el parénquima cerebral.

Otra idea que está siendo actualmente explorada por varios grupos de investigación y que resulta prometedora parte de la hipótesis de que una disminución en la afinidad del mAb por el receptor facilita el transporte transcelular del mismo y evita su acumulación en las CECC. Yu *et al.* (2011) diseñaron un anticuerpo biespecífico de baja afinidad por el TfR capaz de unirse a su vez a la enzima β -secretasa BACE1, procesadora de la proteína precursora

amiloide y potencial diana terapéutica en la enfermedad de Alzheimer. Demostraron que esta disminución de afinidad del anticuerpo por el receptor facilitaba la disociación entre los mismos y el anticuerpo lograba alcanzar el parénquima cerebral. Por otro lado, partiendo de la misma premisa, Niewoehner *et al.* (2014) diseñaron un formato monovalente, es decir, un fragmento Fab' de un anticuerpo anti-TfR, disminuyendo de esta manera la afinidad del vector por el TfR. En este estudio demostraron que la unión monovalente del Fab' al TfR facilitaba el transporte transcelular a través de la BHE, mientras que el homólogo bivalente F(ab')₂ de mayor afinidad seguía una ruta endosomal hacia la degradación lisosomal. A pesar de obtener resultados prometedores, las técnicas de inmunofluorescencia y radioactividad empleadas en ambos estudios no terminan de aportar conclusiones fehacientes, ni de esclarecer de manera precisa los mecanismos por los cuales estos constructos alcanzan más fácilmente el parénquima cerebral, por lo que siguen siendo necesarios estudios más exhaustivos para continuar con los avances.

En resumen, los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis demuestran, primeramente, que el 8D3 no completa la transcitosis salvo en un pequeño porcentaje de ocasiones. El 8D3 es capaz de internalizar sustancias de manera eficiente dentro de las CECC mediante el TfR y un proceso endocítico dependiente de clatrina. Ello hace que una gran parte del cargo administrado i.v. quede en la zona cerebral en vez de dirigirse a otros órganos, y además, consigue superar la primera fase de la barrera alcanzando el interior de las CECC. Sin embargo, una vez dentro, los constructos tienden a acumularse progresivamente en estructuras endosomales maduras de gran tamaño y complejidad. Estos resultados pueden ser mayormente explicados por la alta afinidad que tienen los mAb peptidomiméticos por sus receptores, y por su consecuente dificultad a disociarse de los mismos.

Llegados a este punto de conocimiento, podemos concluir que el uso del TMR y mAbs dirigidos contra receptores de transcitosis es una estrategia con gran potencial para transportar fármacos a través de la BHE, pero que necesita ser optimizada a nivel de investigación básica y preclínica antes de poder proponer un planteamiento clínico futuro. Para ello, será necesario realizar más estudios en torno a los mecanismos intracelulares implicados, así como estudios para optimizar el diseño de los constructos, dando siempre especial importancia a la elección de las técnicas empleadas para estudiar su transporte.

V. CONCLUSIONS

1. The 8D3 antibody is capable of recognizing and binding to the TfR present in the luminal membrane of brain capillary endothelial cells following *in vivo* administration.
2. The 8D3 antibody is internalized inside the brain capillary endothelial cells after its binding to the TfR.
3. The 8D3 antibody is able to trigger the internalization of the cargo which is conjugated to, overcoming the first obstacle in the transport across the brain capillary endothelial cells.
4. The internalized cargo can vary in size and nature, ranging from proteins like the Fab' fragments of antibodies to larger particles like AuNPs measuring 20 nm in diameter.
5. The internalization of 8D3 and its cargo is produced by a clathrin-dependent endocytosis process.
6. Most of the resulting endocytic vesicles are processed intracellularly and do not complete transcytosis.
7. These vesicles undergo a process of fusion, maturation and reorganization in which the 8D3-cargo complexes that are inside them progressively accumulate in endosomal networks of great complexity.
8. During the processing of these vesicles the interaction between TfR, 8D3 and/or cargo is lost.
9. A small percentage of the endocytic vesicles containing the 8D3-cargo complex, however, complete transcytosis.
10. The 8D3-cargo complexes that complete transcytosis do not dissociate from TfR, and therefore, the cargo reaches the basal membrane but fails to go beyond it.

11. We refute the hypothesis of an efficient transcytotic capacity of the 8D3 antibody to cross the blood-brain barrier. However, the knowledge gained around the intracellular mechanisms and dynamics this mAb undergoes at the blood-brain barrier, leads us to support the idea that some optimization in its structure could lead to improve this capacity.

12. The use of the receptor-mediated transport system and mAbs directed against transcytosis receptors is a strategy with great potential for transporting drugs through the blood-brain barrier, although great improvements at the design level of the constructs are still needed to achieve total efficiency.

VI. BIBLIOGRAFÍA

A

Abbott, N. J. Comparative physiology of the blood–brain barrier. In *Physiology and Pharmacology of the blood-brain barrier*; Bradbury, M. W. B., Ed.; Springer-Verlag, Heidelberg: **1992**, pp 371-396.

Abbott, N.J.; Rönnebäck, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Neuroscience* **2006**, *7*, 41-53.

Abbott, N. J.; Patabendige, A. A. K.; Dolman, D. E. M.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *36*, 437-449.

Abbott, N. J. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2013**, *36*, 437-449.

Aisen, P. Transferrin receptor 1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2137-2143.

Alam, M. I.; 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*, 385-403.

B

Ballabh, P.; Braun, A.; Nedergaard, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *16*, 1-13.

Barcia, J. A.; Gallego, J. M. Intraventricular and intracerebral delivery of anti-epileptic drugs in the kindling model. *Neurotherapeutics* **2009**, *6*, 337-343.

Beard, J. L.; Wiesinger, J. A.; Li, N.; Connor, J. R. Brain iron uptake in hypotransferrinemic mice: influence of systemic iron status. *J. Neurosci. Res.* **2005**, *79*, 254-261.

Begley, D. J.; Brightman, M. W. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog. Drug Res.* **2003**, *61*, 39-78.

Bernacki, J.; Dobrowolska, A.; Nierwińska, K.; Malecki, A. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol. Rep.* **2008**, *60*, 600-622.

Bickel, U.; Yoshikawa, T.; Landaw, E. M.; Faull, K. F.; Pardridge, W. M. Pharmacologic effects *in vivo* in brain by vector-mediated peptide drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 2618-2622.

Bickel, U.; Kang, Y. S.; Yoshikawa, T.; Pardridge, W. M. In vivo demonstration of subcellular localization of anti-transferrin receptor monoclonal antibody-colloidal gold conjugate in brain capillary endothelium. *J. Histochem. Cytochem.* **1994**, *42*, 1493-1497.

Bickel, U.; Yoshikawa, T.; Pardridge, W. M. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 247-279.

Biedl, A.; Kraus, R. Über eine bisher unbekannte toxische Wirkung der Gallensäure auf das Zentralnervensystem. *Zentrabl. Inn. Med.* **1898**, *19*, 1185-1200.

Blasberg, R. G.; Patlak, C.; Fenstermacher, J. D. Intrathecal chemotherapy: brain tissue profiles after ventriculocisternal perfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1975**, *195*, 73-83.

Boado, R. J.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Pardridge, W. M. Engineering and expression of a chimeric transferrin receptor monoclonal antibody for blood-brain barrier delivery in the mouse. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 1251-1258.

Bouchaud, C.; Bosler, O. The circumventricular organs of the mammalian brain with special reference to monoaminergic innervation. *Int. Rev. Cytol.* **1986**, 105, 283-327.

Briggman, K. L.; Bock, D. D. Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2012**, 22, 154-161.

Brightman, M. W. The intracerebral movement of proteins injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. *Prog. Brain Res.* **1968**, 29, 19-37.

Brightman, M. W.; Reese, T. S. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* **1969**, 40, 648-677.

Broadwell, R. D.; Balin, B. J.; Salzman, M.; Kaplan, R. S. Blood-brain barrier? Yes and no. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, 80, 7352-7356.

Broadwell, R. D.; Baker-Cairns, B. J.; Friden, P. M.; Oliver, C.; Villegas, J. C. Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. III. Receptor-mediated transcytosis through the blood-brain barrier of blood-borne transferrin and antibody against the transferrin receptor. *Exp. Neurol.* **1996**, 142, 47-65.

Burdo, J. R.; Connor, J. R. Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *BioMetals* **2003**, 16, 63-75.

Burgess A.; Hynynen, K. Microbubble-assisted ultrasound for drug delivery in the brain and central nervous system. In *Therapeutic Ultrasound*; Escoffre, J. M.; Bouakaz, A., Eds.; Springer International Publishing, Switzerland: **2016**, pp 293-308.

C

Campos-Bedolla, P.; Walter, F. R.; Veszelka, S.; Deli, M. A. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch. Med. Res.* **2014**, 45, 610-638.

Candela, P.; Gosselet, F.; Miller, F.; Buee-Scherrer, V.; Torpier, G.; Cecchelli, R.; Fenart, L. Physiological pathway for low-density lipoproteins across the blood-brain barrier: transcytosis through brain capillary endothelial cells in vitro. *Endothelium* **2008**, 15, 254-264.

Chaichana, K. L.; Pinheiro, L.; Brem, H. Delivery of local therapeutics to the brain: working toward advancing treatment for malignant gliomas. *Ther. Deliv.* **2015**, 6, 353-369.

Chen, Y.; Liu, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 640-665.

Cheng, Y.; Dai, Q.; Morshed, R. A.; Fan, X.; Wegscheid, M. L.; Wainwright, D. A.; Han, Y.; Zhang, L.; Auffinger, B.; Tobias, A. L.; Rincón, E.; Thaci, B.; Ahmed, A. U.; Warnke, P. C.; He, C.; Lesniak, M. S. Blood-brain barrier permeable gold nanoparticles: an efficient delivery platform for enhanced malignant glioma therapy and imaging. *Small* **2014**, 10, 5137-5150.

Clark, A. J.; David, M. E. Increased brain uptake of targeted nanoparticles by adding acid-cleavable linkage between transferrin and the nanoparticle core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, 12486-12491.

Coomer, B. L.; Stuart, P. A. Three-dimensional reconstruction of vesicles in endothelium of blood-brain barrier versus highly permeable microvessels. *Anat. Rec.* **1986**, 215, 256-261.

Correale, J.; Villa, A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochem. Res.* **2009**, *34*, 2067-2077.

Cottrell, G. T.; Ferguson, A. V. Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation. *Regul. Pept.* **2004**, *117*, 11-23.

D

Dauchy, S.; Dutheil, F.; Weaver, R. J.; Chassoux, F.; Dumas-Duport, C.; Couraud, P. O.; Scherrmann, J.M.; de Waziers, I.; Declèves, X. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J. Neurochem.* **2008**, *107*, 1518-1528.

De Bock, M.; Vandenbroucke, R. E.; Decrock, E.; Culot, M.; Ceccheli, R.; Leybaert, L. A new angle on blood-CNS interfaces: a role for connexins? *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 1259-1270.

de Boer, A. G.; van der Sandt, I. C.; Gaillard, P. J. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *43*, 629-656.

de Boer, A. G.; Gaillard, P. J. Drug targeting to the brain. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 323-355.

Deeken, J. F.; Loscher, W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan Horses. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1663-1674.

Dejana, E.; Orsenigo, F.; Lampugnani, M. G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 2115-2122.

Descamps, L.; Dehouck, M. P.; Torpier, G.; Cecchelli, R. Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **1996**, *270*, 1149-1158.

Dreier, T.; Lode, H. N.; Xiang, R.; Dolman, C. S.; Reisfeld, R. A.; Kang, A. S. Recombinant immunocytokines targeting the mouse transferrin receptor: construction and biological activities. *Bioconj. Chem.* **1998**, *9*, 482-489.

Drin, G.; Cottin, S.; Blanc, E.; Rees, A. R.; Tamsamani, J. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31192-31201.

E

Egleton, R. D.; Davis, T. P. Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain. *Peptides* **1997**, *18*, 1431-1439.

Ehrlich, P. (1885). *Das Sauerstoff-bedürfnis de Organismus: eine farbenanalytische Studie.* Hirschwald, Berlin.

Ehrlich, P.; Shiga, K. Farbtherapeutische versuche bei Trypanosomenerkrankung. *Berl. Klin. Wochenschr.* **1904**, *41*, 329-332.

ElAli, A.; Thériault, P.; Rivest, S. The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 6453-6474.

el-Bacha, R. S.; Minn, A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell. Mol. Biol.* **1999**, *45*, 15-23.

Engelhardt, B.; Wolburg-Buchholz, K.; Wolburg, H. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microsc. Res. Tech.* **2001**, 52, 112-129.

F

Farkas, E.; Luiten, P. G. M. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **2001**, 64, 575-611.

Felber, A. E.; Castagner, B.; Elsabahy, M.; Deleavey, G. F.; Damha, M. J.; Leroux, J. C. siRNA nanocarriers based on methacrylic acid copolymers. *J. Control. Release* **2011**, 152, 159-167.

Fleming, A. B.; Saltzman, W. M. Pharmacokinetics of the carmustine implant. *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, 41, 403-419.

Freskgård, P. O.; Urich, E. Antibody therapies in CNS diseases. *Neuropharmacology* **2016** doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.014.

Friden, P. M.; Walus, L. R.; Musso, G. F.; Taylor, M. A.; Malfroy, B.; Starzyk, R. M. Anti-transferrin receptor antibody and antibody drug conjugates across the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 4771-4775.

G

Gabathuler, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol. Dis.* **2010**, 37, 48-57.

Gaillard, P. J.; Visser, C. C.; de Boer, A. G. Targeted delivery across the blood-brain barrier. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, 2, 299-309.

Garrick, M. D.; Garrick, L. M. Cellular iron transport. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1790, 309-325.

Georgieva, J. V.; Hoekstra, D.; Zuhorn, I. S. Smuggling drugs into the brain: an overview of ligands targeting transcytosis for drug delivery across the blood-brain barrier. *Pharmaceutics* **2014**, 6, 557-583.

Gherzi-Egea, J. F.; Leininger-Muller, B.; Cecchelli, R.; Fenstermacher, J. D. Blood-brain interfaces: relevance to cerebral drug metabolism. *Toxicol. Lett.* **1995**, 82-83, 645-653.

Giometto, B.; Bozza, F.; Argentiero, V.; Gallo, P., Pagni, S.; Piccinno, M. G.; Tavalato, B. Transferrin receptors in rat central nervous system. An immunocytochemical study. *J. Neurol. Sci.* **1990**, 98, 81-90.

Girod, J.; Fenart, L.; Régina, A.; Dehouck, M. P.; Hong, G.; Scherrmann, J. M.; Cecchelli, R.; Roux, F. Transport of cationized anti-tetanus Fab'2 fragments across an in vitro blood-brain barrier model: involvement of the transcytosis pathway. *J. Neurochem.* **1999**, 73, 2002-2008.

Goldmann, E. E. Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der 'vitalen Färbung'. *Beitr. Klin. Chir.* **1909**, 64, 192-265.

Goldmann, E. E. Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh. Preuss. Akad. Wiss.* **1913**, 1, 1-60.

Gosk, S.; Vermehren, C.; Storm, G.; Moos, T. Targeting anti-transferrin receptor antibody (OX26) and OX26-conjugated liposomes to brain capillary endothelial cells using *in situ* perfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2004**, *24*, 1193-1204.

Grieb, P.; Forster, R. E.; Strome, D.; Goodwin, C. W.; Pape, P. C. O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator dilution technique. *J. Appl. Physiol.* **1985**, *58*, 1929-1941.

H

Hamel, E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J. Appl. Physiol.* **2006**, *100*, 1059-1064.

Hawkins, B. T.; Davis, T. P. The blood-brain barrier/ neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 173-185.

Hawkins, R. A.; O'Kane, R. L.; Simpson, I. A.; Vina, J. R. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 218S-226S.

Heffetz, D.; Fridkin, M.; Zick, Y. Antibodies directed against phosphothreonine residues as potent tools for studying protein phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *182*, 343-348.

Hervé, F.; Ghinea, N.; Scherrmann, J. M. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.* **2008a**, *10*, 455-472.

Hervé, F.; Ghinea, N.; d'Athis, P.; Carrupt, P. A.; Scherrmann, J. M. Covalent modifications of anti-tetanus F(ab')₂ fragments with natural and synthetic polyamines and their effects on the antibody endocytosis in cultured HL60 cells. *Bioconjug. Chem.* **2008b**, *19*, 1543-1555.

Hillarieau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2873-2896.

Hirose, M. The structural mechanism for iron uptake and release by transferrins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 1328-1336.

Hong, G.; Chappey, O.; Niel, E.; Scherrmann, J. M. Enhanced cellular uptake and transport of polyclonal immunoglobulin G and Fab after their cationization. *J. Drug Target.* **2000**, *8*, 67-77.

Huyhn, G. H.; Deen, D. F.; Szoka Jr., F. C. Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumours. *J. Control. Release* **2006**, *110*, 236-259.

Hynynen, K.; McDannold, N.; Vykhodsteva, N.; Jolesz, F. A. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology* **2001**, *220*, 640-646.

J

Jefferies, W. A.; Brandon, M. R.; Hunt, S. V.; Williams, A. F.; Gater, K. C.; Mason, D. Y. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* **1984**, *312*, 162-163.

Jones, A. R.; Shusta, E. V. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1759-1771.

K

Keaney, J.; Campbell, M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* **2015**, 282, 4067-4079.

Ke, Y.; Quian, Z. M. DMT1: a newly discovered mammalian iron transport protein. *Prog. Biophys. Biochem.* **2002**, 29, 2-6.

Kissel, K.; Hamm, S.; Schulz, M.; Vecchi, A.; Garlanda, C.; Engelhardt, B. Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood-tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody. *Histochem. Cell Biol.* **1998**, 110, 63-72.

Kratz, F.; Beyer, U.; Roth, T.; Tarasova, N.; Collery, P.; Lechenault, F.; Cazabat, A.; Schumacher, P.; Unger, C.; Falken, U. Transferrin conjugates of doxorubicin: synthesis, characterization, cellular uptake, and *in vitro* efficacy. *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 338-346.

Kremer, A.; Lippens, S.; Bartunkova, S. *et al.* Developing 3D SEM in a broad biological context. *J. Microsc.* **2015**, 259, 80-96.

L

Lajoie, J. M.; Shusta, E. V. Targeting receptor-mediated transport for delivery of biologics across the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2015**, 55, 613-631.

Lampugnani, M. G.; Orsenigo, F.; Gagliani, M. C.; Tacchetti, C.; Dejana, E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J. Cell Biol.* **2006**, 174, 593-604.

Lee, H. J.; Engelhardt, B.; Lesley, J.; Bickel, U.; Pardridge, W. M. Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood-brain barrier in mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 292, 1048-1052.

Lee, H. J., Zhang, Y.; Zhu, C.; Duff, K.; Pardridge, W. M. Imaging brain amyloid of Alzheimer disease *in vivo* in transgenic mice with an A β peptide radiopharmaceutical. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2002**, 22, 223-231.

Leitner, D. F.; Connor, J. R. Functional roles of transferrin in the brain. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1820, 393-402.

Leonhardt, H. Ependym und circumventriculäre Organe. In *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*; Oksche, A.; Vollrath, L., Eds; Springer, Berlin: **1980**, pp 177-666.

Lesley, J.; Schulte, R.; Woods, J. Modulation of transferrin receptor expression and function by anti-transferrin receptor antibodies and antibody fragments. *Exp. Cell Res.* **1989**, 182, 215-233.

Lewandosky, M. Zur Lehre der Zerebrospinalflüssigkeit. *Z. Klin. Med.* **1890**, 40, 480-494.

Liddel, S. A. Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint. *Fluids Barriers CNS* **2011**, 8, 2.

Loureiro, J. A.; Gomes, B.; Coelho, M. A. N.; Pereira, M. C.; Rocha, S. Targeting nanoparticles across the blood-brain barrier with monoclonal antibodies. *Nanomedicine* **2014**, 9, 709-722.

Loureiro, J. A.; Gomes, B.; Fricker, G.; Cardoso, I.; Ribeiro, C. A.; Gaiteiro, C.; Coelho, M. A. N.; Pereira, M. C.; Rocha, S. Dual ligand immunoliposomes for drug delivery to the brain. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, 134, 213-219.

Lu, C. T.; Zhao, Y. Z.; Wong, H. L.; Cai, J.; Peng, L.; Tian, X. Q. Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, 9, 2241-2257.

M

Mayle, K. M.; Le, A. M.; Kamei, D. T. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1820, 264-281.

McCarthy, R. C.; Kosman, D. J. Iron transport across the blood-brain barrier; development, neurovascular regulation and cerebral amyloid angiopathy. *Cell Mol. Life Sci.* **2015**, 72, 709-727.

McGowan, J. W. D., Bidwell III, G. L.; Vig, P. J. S. Challenges and new strategies for therapeutic peptide delivery to the CNS. *Ther. Deliv.* **2015**, 6, 841-853.

Mitic, L. L.; Anderson, J. M. Molecular architecture of tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, 60, 121-142.

Moos, T.; Morgan, E. H. Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2000**, 20, 77-95.

Moos, T.; Morgan, E. H. Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood-brain barrier in the rat. *J. Neurochem.* **2001**, 79, 119-129.

Moos, T.; Morgan, E. H. The significance of the mutated divalent metal transporter (DMT1) on iron transport into the Belgrade rat brain. *J. Neurochem.* **2004**, 88, 233-245.

Moos, T.; Rosengren Nielsen, T. Ferroportin in the postnatal rat brain: implications for axonal transport and neuronal export of iron. *Semin. Pediatr. Neurol.* **2006**, 13, 149-157.

Moos, T.; Rosengren Nielsen, T.; Skjørringe, T.; Morgan, E. H. Iron trafficking inside the brain. *J. Neurochem.* **2007**, 103, 1730-1740.

N

Nag, S.; Begley, D. J. Blood-brain barrier, exchange of metabolites and gases. In *Pathology and Genetics. Cerebrovascular Diseases*; Kalimo, H., Ed; ISN Neuropath., Press, Basel: **2005**, pp 22-29.

Nagpal, K.; Singh, S. K.; Mishra, D. N. Drug targeting to brain: a systematic approach to study the factors, parameters and approaches for prediction of permeability of drugs across BBB. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, 10, 927-955.

Neuwelt, E. A.; Bauer, B.; Fahlke, C.; Fricker, G.; Iadecola, C.; Janigro, D.; Leybaert, L.; Molnar, Z.; O'Donnell, M.; Povlishock, J.; Saunders, N.; Sharp, F.; Stanimirovic, D.; Watts, R.; Drewes, L. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, 12, 169-182.

Niewoehner, J.; Bohrmann, B.; Collin, L.; Urich, E.; Sade, H., Maier, P.; Rueger, P.; Stracke, J. O.; Lau, W.; Tissot, A. C.; Loetscher, H.; Ghosh, A.; Freskgård, P. O. Increased brain

penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* **2014**, 81, 49-60.

O

O'Donnell, M. E.; Lam, T. I.; Tran, L. Q.; Foroutan, S.; Anderson, S. E. Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2006**, 26, 1234-1249.

Ohno, N.; Kato, M.; Saitoh, Y.; Saitoh, S.; Ohno, S. Three-dimensional volume imaging with electron microscopy toward connectome. *Microscopy* **2015**, 64, 17-26.

Ohtsuki, S.; Terasaki, T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.* **2007**, 24, 1745-1758.

Oller Salvia, B. From bee venom to blood-brain barrier shuttles. Development of minimized apamin derivatives for brain delivery of antibodies and other cargoes [tesis doctoral]. Barcelona: Universitat de Barcelona; **2015**.

Oller-Salvia, B.; Sánchez-Navarro, M.; Giral, E.; Teixidó, M. Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45, 4690-4707.

Organización Mundial de la Salud. ¿Qué son los trastornos neurológicos? Preguntas y respuestas en línea. Mayo 2016. <http://www.who.int/features/qa/55/es/>.

P

Palmer, A. M. The role of the blood-CNS barrier in CNS disorders and their treatment. *Neurobiol. Dis.* **2010**, 37, 3-12.

Pang, Z.; Lu, W.; Gao, H.; Hu, K.; Chen, J.; Zhang, C.; Gao, X.; Jiang, X.; Zhu, C. Preparation and brain delivery property of biodegradable polymersomes conjugated with OX26. *J. Control. Release* **2008**, 128, 120-127.

Papademetriou, I. T.; Garnacho, C.; Schuchman, E. H.; Muro, S. *In vivo* performance of polymer nanocarriers dually-targeted to epitopes of the same or different receptors. *Biomaterials* **2013**, 34, 3459-3466.

Papademetriou, I. T.; Porter, T. Promising approaches to circumvent the blood-brain barrier: progress, pitfalls and clinical prospects in brain cancer. *Ther. Deliv.* **2015**, 6, 989-1016.

Pardridge, W. M. Receptor-mediated peptide transport through the blood-brain barrier. *Endocr. Rev.* **1986**, 7, 314-330.

Pardridge, W. M.; Kumagai, A. K.; Eisenberg, J. B. Chimeric peptides as a vehicle for peptide pharmaceutical delivery through the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 146, 307-313.

Pardridge, W. M.; Buciak, J. L.; Friden, P. M. Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, 259, 66-70.

- Pardridge, W. M. Drug delivery to the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1997**, *17*, 713-731.
- Pardridge, W. M. CNS drug design based on the principles of blood-brain barrier transport. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 1781-1792.
- Pardridge, W. M. *Brain drug targeting: The future of brain drug development*. Cambridge University Press, Cambridge, UK: **2001**.
- Pardridge, W. M. Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan Horses. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 131-139.
- Pardridge, W. M. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol. Biotechnol.* **2005a**, *30*, 57-70.
- Pardridge, W. M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRX* **2005b**, *2*, 3-14.
- Pardridge, W. M. Drug targeting to the brain. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1733-1744.
- Pardridge, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *32*, 1959-1972.
- Paris-Robidas, S.; Emond, V.; Tremblay, C.; Soulet, D.; Calon, F. In vivo labeling of brain capillary endothelial cells after intravenous injection of monoclonal antibodies targeting the transferrin receptor. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 32-39.
- Paris-Robidas, S.; Brouard, D.; Emond, V.; Parent, M.; Calon, F. Internalization of targeted quantum dots by brain capillary endothelial cells in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2016**, *36*, 731-742.
- Pasha, S.; Gupta, K. Various drug delivery approaches to the central nervous system. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 113-135.
- Penichet, M. L.; Kang, Y. S.; Pardridge, W. M.; Morrison, S. L.; Shin, S. U. An antibody-avidin fusion protein specific for the transferrin receptor serves as a delivery vehicle for effective brain targeting: initial applications in anti-HIV antisense drug delivery to the brain. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 4421-4426.
- Persidsky, Y.; Ramirez, S. H.; Haorah, J.; Kanmogne, G. D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2006**, *1*, 223-236.
- Ponka, P.; Lok, C. N. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31*, 1111-1137.
- Prades, R.; Guerrero, S.; Araya, E.; Molina, C.; Salas, E.; Zurita, E.; Selva, J.; Egea, G.; López-Iglesias, C.; Teixidó, M.; Kogan, M. J.; Giral, E. Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7194-7205.

Q

- Quian, Z. M.; Li, H.; Sun, H.; Ho, K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 561-587.

R

Ramos-Cabrer, P.; Campos, F. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 951-960.

Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J. Prodrug approaches for CNS delivery. *AAPS J.* **2008**, *10*, 92-102.

Redzic, Z. B.; Segal, M. B. The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1695-1716.

Reese, T. S.; Karnovsky, M. J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* **1967**, *34*, 207-217.

Rhim, T.; Lee, D. Y.; Lee, M. Drug delivery systems for the treatment of ischemic stroke. *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 2429-2444.

Rivest, V.; Phivilay, A.; Julien, C.; Bélanger, S.; Tremblay, C.; Émond, V.; Calon, F. Novel liposomal formulation for targeted gene delivery. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 981-990.

Rolfe, D. F.; Brown, G. C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 731-758.

S

Saunders, N. R.; Ek, C. J.; Habgood, M. D.; Dziegielewska, K. M. Barriers in the brain: a renaissance? *Trends Neurosci.* **2008**, *31*, 279-286.

Saunders, N. R.; Daneman, R.; Dziegielewska, K. M.; Liddelow, S. A. Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 742-752.

Savarj, N.; Feun, L. G.; Lu, K.; Gray, K.; Wang, C.; Loo, T. L. Pharmacology of intrathecal VP-16-213 in dogs. *J. Neurooncol.* **1992**, *13*, 211-215.

Shechter, Y.; Maron, R.; Elias, D.; Cohen, I. R. Autoantibodies to insulin receptor spontaneously develop as anti-idiotypes in mice immunized with insulin. *Nature* **1982**, *216*, 542-545.

Shi, N.; Zhang, Y.; Zhu, C.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M. Brain-specific expression of an exogenous gene after i.v. administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12754-12759.

Shilo, M.; Motiei, M.; Hana, P.; Popovtzer, R. Transport of nanoparticles through the blood-brain barrier for imaging and therapeutic applications. *Nanoscale* **2014**, *6*, 2146-2152.

Simionescu, M.; Simionescu, N.; Palade, G. E. Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J. Cell. Biol.* **1976**, *68*, 705-723.

Simionescu, M.; Simionescu, N. Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol. Rev.* **1991**, *25*, 1-78.

Simpson, I. A.; Carruthers, A.; Vannucci, S. J. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2007**, *27*, 1766-1791.

Soos, M. A.; O'Brien, R. M.; Brindle, N. P. J.; Stigter, J. M.; Okamoto, A. K.; Whittaker, J.; Siddle, K. Monoclonal antibodies to the insulin receptor mimic metabolic effects of insulin but do not stimulate receptor autophosphorylation in transfected NIH 3T3 fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 5217-5221.

Spector, R.; Johanson, C. E. Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on Vitamins B and E. *J. Neurochem.* **2007**, 103, 425-438.

Stahl, P. D.; Barbieri, M. A. Multivesicular bodies and multivesicular endosomes: the 'ins and outs' of endosomal traffic. *Sci. STKE* **2002**; 2002: pe32.

Stanimirovic, D. B.; Friedman, A. Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, 32, 1207-1221.

Strazielle, N.; Ghersi-Egea, J. F. Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Mol. Pharmaceutics* **2013**, 10, 1473-1491.

T

Taddei, A.; Giampietro, C.; Conti, A.; Orsenigo, F.; Breviario, F.; Pirazzoli, V.; Potente, M.; Daly, C.; Dimmeler, S.; Dejana, E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat. Cell Biol.* **2008**, 10, 923-934.

Tajes, M.; Ramos-Fernández, E.; Weng-Jiang, X.; Bosch-Morató, M.; Guivernau, B.; Eraso-Pichot, A.; Salvador, B.; Fernández-Busquets, X.; Roquer, J.; Muñoz, F. J. The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Mol. Membr. Biol.* **2014**, 31, 152-167.

Taylor, C. J.; Nicola, P. A.; Wang, S.; Barrand, M. A.; Hladky, S. B. Transporters involved in regulation of intracellular pH in primary cultured rat brain endothelial cells. *J. Physiol.* **2006**, 576, 769-785.

Temsamani, J.; Rousselle, C.; Rees, A. R.; Scherrmann, J. M. Vector-mediated drug delivery to the brain. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2001**, 1, 773-782.

V

van Gelder, W.; Cleton-Soeteman, M. I.; Huijskes-Heins, M. I. E.; van Run, P. R. W. A.; van Eijk, H. G. Transcytosis of 6.6-nm gold-labeled transferrin: an ultrastructural study in cultured porcine blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Res.* **1997**, 746, 105-116.

Velasco-Aguirre, C.; Morales, F.; Gallardo-Toledo, E.; Guerrero, S.; Giralt, E.; Araya, E.; Kogan, M. J. Peptides and proteins used to enhance gold nanoparticle delivery to the brain: preclinical approaches. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, 10, 4919-4936.

Vilella, A.; Ruozi, B.; Belletti, D.; Pederzoli, F.; Galliani, M.; Semeghini, V.; Forni, F.; Zoli, M.; Vandelli, M. A.; Tosi, G. Endocytosis of nanomedicines: the case of glycopeptide engineered PLGA nanoparticles. *Pharmaceutics* **2015**, 7, 74-89.

Vlieghe, P.; Khrestchatisky, M. Medicinal chemistry based approaches and nanotechnology-based systems to improve CNS drug targeting. *Med. Res. Rev.* **2013**, 33, 457-516.

von Tell, D.; Armulik, A.; Betsholtz, C. Pericytes and vascular stability. *Exp. Cell Res.* **2006**, 312, 623-629.

Vorbrodt, A. W. Ultrastructural cytochemistry of blood-brain barrier endothelia. *Prog. Histochem Cytochem.* **1988**, 18, 1-99.

Vorbrodt, A. W. Ultracytochemical characterization of anionic sites in the wall of brain capillaries. *J. Neurocytol.* **1989**, 18, 359-368.

W

Wager, T. T.; Villalobos, A.; Verhoest, P. R.; Hou, X.; Shaffer, C. L. Strategies to optimize the brain availability of central nervous system drug candidates. *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, 6, 371-381.

Weintraub, K. Biomedicine: The new gold standard. *Nature* **2013**, 495, 14-16.

Welfringer, f., d'Athis, P.; Sherrmann, J. M.; Hervé, F. Development and validation of an antigen-binding capture ELISA for native and putrescine-modified anti-tetanus F(ab')₂ fragments for the assessment of the cellular uptake and plasma kinetics of the antibodies. *J. Immunol. Methods* **2005**, 307, 82-95.

Wiley, D. T.; Webster, P.; Gale, A.; Davis, M. E. Transcytosis and brain uptake of transferring-containing nanoparticles by tuning to transferring receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110, 8662-8667.

Wohlfart, S.; Gelperina, S.; Kreuter, J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release* **2012**, 161, 264-273.

Wu, D.; Pardridge, W. M. Central nervous system pharmacologic effect in conscious rats after intravenous injection of a biotinylated vasoactive intestinal peptide analog coupled to a blood-brain barrier drug delivery system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, 279, 77-83.

Y

Yemişci, M.; Gürsoy-Özdemir, Y.; Caban, S.; Bodur, E.; Capan, Y.; Dalkara, T. Transport of a caspase inhibitor across the blood-brain barrier by chitosan nanoparticles. *Methods Enzymol.* **2012**, 508, 253-269.

Yu, Y. J.; Zhang, Y.; Kenrick, M.; Hoyte, K.; Luk, W.; Lu, Y.; Atwal, J.; Elliott, J. M.; Prabhu, S.; Watts, R. J.; Dennis, M. S. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Sci. Transl. Med.* **2011**, 3, 84ra44.

Z

Zhang, Y.; Zhang, Y. F.; Bryant, J.; Charles, A.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 3667-3677.

Zhang, Y., Pardridge, W. M. Delivery of β -galactosidase to mouse brain via the blood-brain barrier transferrin receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 313, 1075-1081.

Zheng, W.; Aschner, M.; Ghersi-Egea, J. F. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2003**, 192, 1-11.

Zheng, W.; Monnot, A. D. Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *133*, 177-188.

Zhou, Q. H.; Boado, R. J.; Lu, J. Z.; Hui, E. K. W.; Pardridge, W. M. Brain-penetrating IgG-iduronate 2-sulfatase fusion protein for the mouse. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 329-335.

Zhu, C.; Zhang, Y.; Zhang, Y. F.; Li, J. Y.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M. Organ-specific expression of the lacZ gene controlled by the opsin promoter after intravenous gene administration in adult mice. *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 906-912.

Zick, Y.; Rees-Jones, R. W.; Taylor, S. I.; Gorden, P.; Roth, J. The role of antireceptor antibodies in stimulating phosphorylation of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4396-4400.

Zlokovic, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **2008**, *57*, 178-201.

Zlokovic, B. V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Neuroscience* **2011**, *12*, 723-738.

