

10. Otras aplicaciones farmacoterapéuticas

JUAN M. IRACHE

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Universidad de Navarra.*

Este heterogéneo capítulo está dividido en varias secciones. En la primera sección se considera el uso de la nanotecnología para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por hongos, parásitos, bacterias y virus. En la segunda sección se revisa el uso de estas tecnologías para el tratamiento de enfermedades metabólicas, principalmente la diabetes tipo I y la osteoporosis. Finalmente, en la última parte del este capítulo se recogen algunos trabajos sobre el potencial de las nanopartículas en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, la inflamación y el alivio del dolor.

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Aunque en el último siglo se han realizado importantes progresos en el control de las enfermedades infecciosas, estas representan todavía un problema importante de salud pública que sigue necesitando, de manera urgente, nuevos tratamientos alternativos.

Las causas de las infecciones son múltiples y la búsqueda de nuevas moléculas y tratamientos es complicado. Todo ello es debido a numerosos factores entre los que destaca la constante modificación de los patógenos y la aparición de mecanismos de resistencia. Otro factor importante es el creciente número de individuos inmunocomprometidos entre los pacientes que requieren este tipo de tratamientos. Este fenómeno está asociado al envejecimiento de la población, el aumento del número de pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y al incremento en el número de pacientes tratados con terapias inmunosupresoras.

Dentro de los diferentes tipos de infecciones, aquellas causadas por patógenos intracelulares son las más dificultosas de erradicar. En realidad los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias para su supervivencia en el interior de la célula huésped, destacando los siguientes: (i) inhibición de la fusión entre fagosomas y lisosomas, (ii) resistencia al ataque de las enzimas lisosomales, agentes oxigenados y defensas de los macrófagos o células huésped, o (iii) escape desde el fagosoma al citoplasma. Dentro del grupo de los microorganismos intracelulares obligados destacan *Legionella pneumophila*, *Toxoplasma gondii* o *Clamidia trachomatis*. Igualmente, ciertos patógenos intracelulares facultativos como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Brucella melitensis*, también, son un problema significativo.

Muchos de estos patógenos intracelulares son capaces de infectar los macrófagos (y otras células del sistema inmune), utilizándolas como reservorios para patógenos capaces de colonizar otros tejidos o células dando lugar a infecciones recurrentes. En pacientes inmunocomprometidos, ciertas infecciones oportunistas causadas por *Salmonella* spp. o por micobacterias atípicas son mucho más frecuentes. Así, en pacientes infectados con VIH la incidencia de salmonelosis (principalmente debida a *S. typhimurium*) es entre 15 y 100 veces mayor que en pacientes sanos. Otro tipo de infecciones muy frecuentes son las causadas por el complejo *M. avium-M. intracellulare* que dan lugar a las infecciones oportunistas pulmonares no tuberculosas más frecuentes en pacientes con el sistema inmune debilitado (1).

Por lo que respecta a los fármacos antiinfecciosos, algunos de ellos son extremadamente irritantes y tóxicos y existe un gran interés en encontrar nuevos caminos para formularlos de manera más segura y eficaz (2-5). Por otra parte, estas moléculas activas necesitan alcanzar el nivel celular/subcelular donde los patógenos están escondidos y, desgraciadamente, esto suele ser bastante complicado (6, 7). Además, otra dificultad añadida a la terapia antiinfecciosa es que algunos patógenos son quiescentes o durmientes. Estos microorganismos están presentes en un estado reversible y pueden persistir durante largos periodos sin dividirse bajo una forma viable pero no «cultivable» (8). En ese caso, las dianas de los fármacos están expresadas en pequeño número y la permeabilidad celular está alterada, influenciando su susceptibilidad a estos agentes (9).

En cualquier caso, la nanotecnología puede ser una herramienta adecuada para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Es bien conocido que las nanopartículas (poliméricas, lipídicas, liposomas, etc.) al ser administradas por vía intravenosa se concentran preferentemente en órganos con alta capacidad

fagocítica y en monocitos circulantes (10, 11). En realidad, una vez en sangre, ciertas proteínas plasmáticas (opsoninas) son capaces de interactuar y adsorberse sobre la superficie de las nanopartículas. Este fenómeno, facilita su reconocimiento por las células del sistema monocito-macrofágico o sistema fagocítico mononuclear (MPS). Por ello, las partículas submicrónicas se acumulan en el hígado (principalmente en las células de Kupffer), el bazo y la médula ósea. De todas formas, tanto la captación como su concentración en estas células son dependientes de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas. Aquellas con tamaños inferiores a 100 nm o recubiertas con moléculas hidrofílicas (polietilenglicoles, dextranos, etc...) sufren un menor grado de opsonización. Por ello, el tiempo de circulación en sangre de estas formas de dosificación es mucho mayor, permitiendo que puedan alcanzar otros lugares del organismo.

La Figura 10.1 resume las ventajas generales que puede aportar la nanotecnología en la formulación de este tipo de los fármacos antiinfecciosos.

Infecciones parasitarias y por hongos

En la actualidad, las infecciones fúngicas no son las de mayor prevalencia dentro de la práctica hospitalaria, pero sí son las de mayor tasa de morbilidad y mortalidad en los receptores de un trasplante de órgano sólido o en aquellos pacientes inmunocomprometidos debido a terapias agresivas, tratamientos oncológicos o infecciones por VIH. El tratamiento de estas infecciones presenta además un gran número de complicaciones, reintervenciones y fracasos terapéuticos.

Por otra parte, la utilización de nanotecnologías para la administración sistémica de antiinfecciosos frente a parásitos responsables de infecciones severas tales como leishmaniasis visceral, candidiasis o malaria ha sido propuesta como una estrategia interesante para aumentar la eficacia de estos fármacos (14-19). En general tanto los liposomas como las nanopartículas lipídicas o poliméricas han demostrado una capacidad superior al fármaco libre para el tratamiento de este tipo de infecciones.

La Tabla 10.1 resume algunos de los trabajos que recogen la utilización de nanosistemas para la administración intravenosa de antifúngicos. En muchos ejemplos, la toxicidad del fármaco se ve fuertemente reducida mientras que en otros casos también se observan incrementos muy importantes en la eficacia del tratamiento.

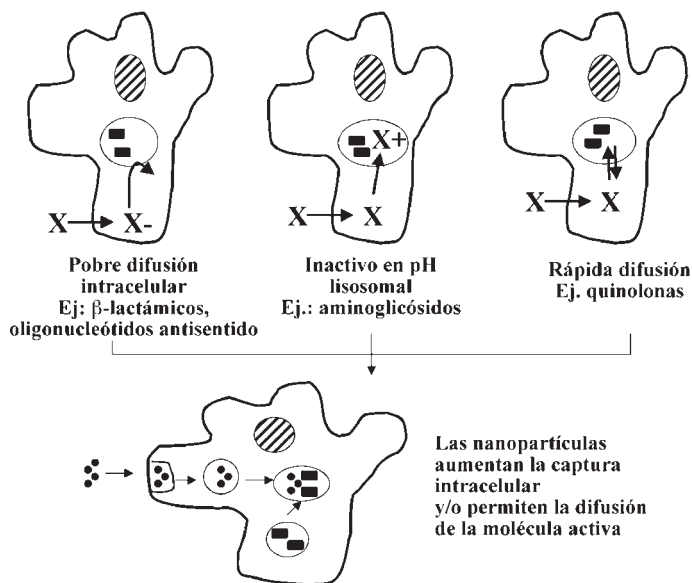


FIGURA 10.1. Representación esquemática de cómo las nanopartículas pueden aumentar la concentración intracelular de antibióticos, antifúngicos y/o antivirales. Los tres mayores problemas identificados: pobre penetración o difusión intracelular (incluido difusión a los lisosomas), inactivación del fármaco por el pH ácido lisosomal y, dependiendo de sus características fisicoquímicas, rápida difusión o mecanismos de entrada-salida desde componentes intracelulares. Las nanopartículas podrían resolver estos problemas mediante un incremento de la captura intracelular (ej., mediante endocitosis) y/o permitiendo que el principio activo difunda libremente dentro de la célula (ej. mediante mecanismo de fusión de los lisosomas) [adaptada de 12, 13].

La primera nanomedicina puesta en el mercado para el tratamiento de infecciones fúngicas severas fue Ambisome[®] (NeXstar, hoy en día Gilead). Esta formulación de anfotericina B liposomal permitía reducir entre 50 y 70 veces la toxicidad del antifúngico observada con la formulación tradicional (asociación de desoxicolato y antifúngico) (32). Como consecuencia de esta drástica reducción de la toxicidad, la cantidad de anfotericina B que se puede administrar a un paciente se ve aumentada 5 veces. El éxito de esta formulación se relacionó con la capacidad de los liposomas por alcanzar y concentrarse en las células del sistema monocito-macrofágico. Sin embargo, el pequeño tamaño de estos liposomas (< 100 nm) también favorecería que una porción importante de la dosis inyectada escapara al aclaramiento inmediato por parte de los macrófagos del hígado y del bazo. Por ello, estos liposomas con anfotericina B pueden viajar a través del torrente sanguíneo durante un periodo de tiempo prolongado y, así, acceder a otros tejidos infectados como pueden ser los pulmones, el hígado, los riñones y el cerebro. Como consecuencia de ello, la formulación es efectiva frente a microorganismos fagocitados y no fagocitados (33).

OTRAS APLICACIONES FARMACOTERAPÉUTICAS

TABLA 10.1. *Utilización de liposomas y nanopartículas como vehículos para el tratamiento de infecciones fúngicas.*

Formulación Referencia	Fármaco	Modelo	Infección experimental	Resultado
Liposomas 20	Anfotericina B	Ratón	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Aumento de la tasa de supervivencia y menor cantidad de células viables que controles
Liposomas 21	Anfotericina B	Ratón	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la toxicidad aguda • Dosis máxima tolerable 9 veces mayor que control
Ambisome® 22	Anfotericina B	Ratón	Varios	Efectivo en infecciones intracelulares (leishmaniasis, histoplasmosis) y extracelulares (candidiosis, aspergilosis)
Liposomas 23	Complejo anfotericina B: ciclodextrinas	Ratón	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cryptococcus neoformans</i> • <i>Aspergillus fumigatus</i> 	Reducción de la toxicidad al utilizar complejos con HPCD o SBECD
Liposomas pegilados 24	Anfotericina B	Ratón	<i>Candida albicans</i>	Menos efectivo frente a infección experimental
Liposomas funcionalizados con PAM	Anfotericina B	Rata	—	Acumulación del fármaco en hígado y bazo
Liposomas funcionalizados con OPM 25				Acumulación del fármaco en pulmón
Nanoesferas P 26	Anfotericina B	Ratón	<i>Candida albicans</i>	Actividad menor que fármaco libre pero menor toxicidad
Nanoesferas lipídicas 27	Anfotericina B	Varios	<i>Candida albicans</i>	En perro, niveles plasmáticos 3 veces superior a Ambisome En rata, buena eficacia antifúngica
Liposomas 28; 29	Nistatina	Ratón	<i>Aspergillus spp.</i>	Disminución toxicidad hemolítica y aumento eficacia
Liposomas 30	Nistatina	Conejo	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Aumento eficacia frente aspergillosis diseminada
Liposoma 31	Nistatina	Ratón	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Aumento eficacia

PAM: p-aminofenil-manopiranosido; OPM: O-palmitoil-manano; PEC: poli(epsilon-caprolactona); HPCD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina; SBECD: sulfobutileter-beta-ciclodextrina.

Ambisome, aparte de ser utilizado en el tratamiento específico de micosis sistémicas graves, ha demostrado en los últimos años una gran actividad para el tratamiento de la leishmaniasis visceral (16). El mayor problema de Ambisome sigue siendo su coste (estimado en 2004 en unos 16.000-20.000 euros/mes frente a 127 euros para la formulación convencional) (34, 35). En cualquier caso, existen varios estudios que demuestran que el coste en la adquisición del fármaco se ve justificado debido a la disminución de los gastos derivados de los efectos adversos asociados al uso de la presentación convencional de anfotericina B (36, 37). Así, en un estudio con pacientes sometidos a trasplante hepático, se ha demostrado que Ambisome ofrece una menor incidencia de infecciones fúngicas invasoras (*Candida* spp. o *Aspergillus* spp.) que el tratamiento convencional (del 6% frente al 17%) (37); incluso cuando Ambisome se administra por nebulización en la profilaxis de aspergillosis en los receptores de un trasplante pulmonar (38). Desde un punto de vista farmacoeconómico, se comparó la utilización de anfotericina B liposomal frente a anfotericina B convencional en el tratamiento empírico de fiebre persistente en pacientes neutropénicos (39). El coste de hospitalización por paciente a lo largo de toda la estancia fue inferior en aquellos individuos tratados con la especialidad liposomal frente a la anfotericina convencional. Este resultado ha sido atribuido a la menor incidencia de nefrotoxicidad observada con la anfotericina B liposomal.

En cualquier caso, y debido a este problema económico, se han hecho considerables esfuerzos para desarrollar formulaciones alternativas con menores precios. En este contexto, se propuso una nueva formulación lipídica de anfotericina B (Abelcet®) que presentaba una cantidad de lípidos 3 veces inferior a la incluida en Ambisome. Esta formulación, aunque sensiblemente más barata que Ambisome, es ligeramente peor en términos de eficacia.

Por otra parte, Larabi y colaboradores demostraron que unos nanodiscos lipídicos conteniendo anfotericina B (diámetro de 250 nm y 3 nm de espesor) se podían obtener con una composición en lípidos muy parecida a la de Abelcet pero modificando el método de preparación. Estos nanodiscos, aunque menos activos que Ambisome, parecen más eficientes que Abelcet para reducir la infección por *Leishmania donovani* en un modelo murino de leishmaniasis visceral (40).

Las nanopartículas poliméricas, en principio más baratas que las mezclas lipídicas, también se han desarrollado como vehículos para anfotericina B (41, 42). En estos trabajos se demostró que tanto nanoesferas de poli(épsilon-caprolactona) como micelas mixtas con Pluronic F68 podían incorporar de manera eficiente anfotericina B. Además, la asociación de anfotericina B en nanoesferas de poli(ép-

silon-caprolactona) permite aumentar de manera significativo la eficacia del anti-fúngico frente a amastigotes de *Leishmania donovani* (43). De la misma manera, utilizando promastigotes de *Leishmania donovani* resistente a anfotericina B, se pudo observar una reversión de dicha resistencia al utilizar micelas mixtas entre Pluronic F68 y el antifúngico (44). Por último, estas formulaciones fueron evaluadas para testar su eficacia terapéutica en un modelo de candidiosis experimental en ratones neutropénicos (26). De igual forma a lo observado con Ambisome, la formulación de nanoesferas disminuía la actividad antifúngica del fármaco libre pero, en paralelo, permitía reducir de forma importante la toxicidad renal de anfotericina B y permitiría administrar mayores concentraciones del polieno.

Otros fármacos utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis también han sido incorporados en vehículos submicrónicos. Así, nanopartículas de poli(hexilcianoacrilato) conteniendo primaquina aumentaban más de veinte veces la actividad del fármaco libre frente a *L. donovani* (45). De la misma forma, en diferentes especies animales con infección aguda, los niosomas conteniendo estibogluconato sódico son más efectivos eliminando el parásito del hígado, bazo y médula ósea que Ambisome o Abecet y ofrecen elevados niveles tisulares del fármaco durante largos periodos de tiempo (46, 47). Igualmente, la encapsulación de amarogentina encapsulada en liposomas o en niosomas aumenta la eliminación del parásito de los bazos de hamsters infectados de forma experimental (48). Por otra parte, la toxicidad de andrografólido (49) y dehidroemetina (50) (utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis) se reduce drásticamente tras su incorporación en liposomas o nanoesferas, respectivamente. En otro interesante estudio se pudo demostrar como la incorporación de arjunglucosido en nanogeles hidrofílicos o en nanoesferas de ácido poliláctico (PLA) permitía reducir de forma importante la hepatotoxicidad y neurotoxicidad del fármaco libre. En paralelo, estas formulaciones mostraban una actividad similar en un modelo experimental de leishmaniasis, caracterizada por una reducción de la carga parasitaria del bazo cercana al 80%; mientras, para el fármaco libre esta reducción era de solamente el 38% (51).

En el caso de malaria, la situación es diferente. En este caso, el parásito se localiza en los glóbulos rojos. Por ello, la nanotecnología usada para reducir la toxicidad de los principios activos necesita bien permanecer en el torrente sanguíneo o interaccionar con los glóbulos rojos infectados. Unos pocos estudios han considerado la administración de antipalúdicos con liposomas capaces de interaccionar específicamente con glóbulos rojos infectados. Para ello, el «anclaje» de los liposomas a estas células tiene lugar mediante la utilización de fragmento F(ab') que se demostró muy efectivo para controlar la parasitosis.

Los liposomas conteniendo cloroquina fueron incluso capaces de curar infecciones resistentes a este fármaco (19).

Liposomas pegilados y nanocápsulas parecen también superiores al principio activo libre para tratar la malaria (52, 53). Así, por ejemplo, varias formulaciones de halofantrina encapsulada en nanocápsulas fueron evaluadas en ratones infectados con *Plasmodium berghei* (52). La formulación de nanocápsulas se reveló superior a la formulación convencional de halofantrina ya que el uso de estas nanopartículas permitía enmascarar los efectos tóxicos del fármaco. Los resultados farmacocinéticos mostraron que la formulación de nanocápsulas, especialmente las formulaciones pegiladas, permitían perfiles plasmáticos de halofantrina más favorables. Además, el AUC de halofantrina en plasma fue 6 veces superior con la formulación de nanocápsulas comparadas con la solución. Más recientemente, utilizando nanoesferas de Gantrez AN conteniendo cloroquina, se ha demostrado incrementos importantes de su biodisponibilidad oral en ratones. Así, estas nanopartículas fueron capaces de multiplicar por 3 la biodisponibilidad oral de este fármaco (comparado con formulaciones convencionales) y permitir niveles plasmáticos efectivos durante al menos 3 días (datos no publicados).

Por otra parte, y debido a la localización de los parásitos, el uso de ligandos específicos en la superficie de nanopartículas o la pegilación de las mismas puede ser interesante para aumentar la actividad y eficacia de estos sistemas. En el caso de los ligandos capaces de reconocer de manera específica algún receptor de la superficie celular, se han propuesto manosa (54), péptidos (tuftsina) y anticuerpos. Así, la utilización de liposomas funcionalizados con tuftsina ha permitido aumentar la eficacia de estibogluconato sódico (55, 56) y anfotericina B (56, 57). Por otra parte, los inmunoliposomas (resultantes tras la asociación de anticuerpos a la superficie de liposomas) favorecen el acceso de los principios activos a la médula ósea, el tracto gastrointestinal y la piel; órganos que suelen actuar de reservorio para algunos de estos patógenos y causantes de las recaídas (58, 59). Por lo que respecta a la pegilación, los sistemas «stealth» o furtivos también pueden ser interesantes para incrementar las concentraciones de antifúngicos en pulmón y riñón. Sin embargo, los resultados obtenidos tras la administración de diferentes formulaciones de liposomas pegilados conteniendo anfotericina B en ratones infectados neutropénicos no han sido concluyentes (24, 53).

Infecciones bacterianas

Las nanotecnologías ofrecen también una serie de ventajas interesantes para la administración de antibióticos en infecciones causadas por bacterias.

En general, la encapsulación de antibióticos en liposomas o en nanopartículas aumenta la dosis máxima tolerada y el índice terapéutico de estos fármacos en comparación con las formas farmacéuticas convencionales. Esto puede explicarse por una modificación del perfil farmacocinético del antibiótico cuando está encapsulado y por una modificación de su distribución en el organismo.

Infecciones debidas a micobacterias

Las infecciones debidas a micobacterias son un problema sanitario importante ya que estos microorganismos son responsables de numerosas enfermedades, como la tuberculosis, así como de algunas de las infecciones oportunistas que más afectan a los pacientes inmunodeprimidos. La tuberculosis, causada por *M. tuberculosis*, es una infección pulmonar común, endémica en algunas regiones. Su incidencia ha aumentado recientemente, ya que está frecuentemente asociada al VIH. Por otra parte el complejo *M. avium* - *M. intracellulare* (MAC) es la principal causa de complicaciones en pacientes inmunodeprimidos (60, 61).

En general, los aminoglicósidos son eficaces frente a las infecciones causadas por micobacterias. Sin embargo, estos presentan una baja capacidad para atravesar las membranas celulares e importantes efectos secundarios, como nefrotoxicidad y ototoxicidad (62). La encapsulación de estos antibióticos en liposomas ha mostrado, en general, un aumento importante de su eficacia terapéutica tanto *in vitro* como *in vivo*. Así por ejemplo, en una formulación liposomal de amikacina (denominada Mikasome[®], Gilead), el antibiótico fue entre 2 y 6 veces más activo que el principio activo libre y que la estreptomina en un modelo agudo de tuberculosis en ratón (63). Además se ha demostrado que esta formulación permite prolongar los niveles de antibiótico en plasma, aumentando la eficacia del mismo frente a infecciones por *Mycobacterium* spp., *Klebsella* spp. y *Pseudomonas* spp (64). En modelos animales infectados con el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, amikacina liposomal permitió reducir en 3 logaritmos (1.000 veces) el número de bacterias viables en hígado, bazo y, en menor medida, en pulmones, comparados con el control no tratado (64-66). Resultados similares han sido descritos por otros autores con formulaciones de amikacina liposomal de composición semejante a la descrita anteriormente (67, 68).

Liposomas conteniendo estreptomicina también permitieron prolongar la supervivencia de ratones infectados con *Mycobacterium* spp. y producir una inhibición significativa del crecimiento bacteriano en el hígado y en el bazo, pero no en los pulmones (69, 70). La ausencia de concentración del antibiótico en los pulmones parece ser debido a que los liposomas empleados presentaban una carga superficial neutra que favorecería una mayor circulación en el torrente circulatorio que, por ejemplo, los liposomas catiónicos que tienden a concentrarse en estos órganos.

Sin embargo, en algunas infecciones experimentales por micobacterias, el efecto superior de los liposomas también ha sido observado en los pulmones. Así, la eficacia de kanamicina liposomal (71) o de estreptomicina liposomal (72) fue significativamente mayor a la obtenida con el fármaco libre. Igualmente, gentamicina encapsulada en liposomas de fosfatidilcolina reducía en 3 logaritmos el número de bacterias viables en los pulmones de ratones infectados con *Klebsiella pneumoniae* y aumentaba el tiempo de supervivencia hasta más de 15 días, comparados con los 8 días obtenidos con el principio activo libre (73). La Tabla 10.2 recoge algunos ejemplos de utilización de nanotecnologías en el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias.

En general, se puede afirmar que estas nanomedicinas presentan resultados bastante prometedores. Sin embargo, muchos de los datos obtenidos con estas nuevas formulaciones se han realizado con animales sanos (con el sistema inmune intacto y con bacterias altamente susceptibles a los antibióticos); a pesar de que en la práctica clínica los tratamientos son administrados a pacientes con el sistema inmune afectado o que han sido infectados por microorganismos con baja susceptibilidad a los antibióticos empleados. En cualquier caso, la erradicación completa de los patógenos localizados en pulmón es bastante difícil y así se demostró al realizar ensayos clínicos con Mikasome destinados a tratar pacientes infectados con tuberculosis. Estos ensayos fallaron ya que el antibiótico era liberado en macrófagos que se encontraban relativamente lejos de los bacilos extracelulares y de aquellos localizados en los focos de necrosis caseosa en la infección humana (63). En el caso del tratamiento de la tuberculosis, es bien conocido que concentrar el antibiótico en los lugares donde se localizan los bacilos extracelulares sigue siendo un desafío y un problema importante a resolver (79).

TABLA 10.2. *Ejemplos de utilización de nanotecnologías en el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias.*

Formulación Referencia	Fármaco	Modelo	Infección experimental	Resultado
Liposomas 74	Claritromicina Ofloxacino	Macrófagos humanos	<i>Mycobacterium avium</i> - <i>M. intracellulare</i>	Reducción del número de UFCs en macrófagos infectados
Liposomas 75	Esparfloxacino	Macrófagos J774	<i>Mycobacterium avium</i> - <i>M. intracellulare</i>	Concentración del fármaco en hígado y bazo
Liposomas pegilados 76	Isoniazida Rifampicina	Ratón	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación controlada del fármaco • Reducción de la toxicidad del fármaco
Liposomas 77	Claritromicina Ciprofloxacino	Ratón	<i>M. avium</i>	Inhibición del crecimiento de la bacteria en el modelo de tuberculosis experimental
Liposomas 78	Norfloxacino			
Dextrano manosilado 78	Norfloxacino	Ratón	<i>Mycobacterium bovis</i>	Reducción del número de UFCs en los pulmones de los ratones infectados

UFCs: Unidades formadoras de colonias.

Por todo ello, en los últimos años se están haciendo grandes esfuerzos para desarrollar liposomas y nanopartículas para la administración pulmonar mediante inhalación de antibióticos (80-82); aunque quedan algunos problemas por resolver como la deposición homogénea en los pulmones de la formulación inhalada.

Salmonelosis

Las bacterias del género *Salmonella* son parásitos intracelulares facultativos y causan salmonelosis y fiebres tifoideas. Los antibióticos efectivos contra este tipo de bacterias presentan baja penetración celular y diferentes efectos secundarios.

Ampicilina encapsulada en liposomas fue más efectiva que el fármaco libre en un modelo ratón utilizando *Salmonella typhimurium* (83). A dosis única de ampicilina (0,8 mg) encapsulada en liposomas se obtuvo una tasa de protección del 60% de los ratones durante 2 meses. La administración de 3 dosis de

0,8 mg de ampicilina liposomal fue ligeramente más efectiva. Este incremento en la eficacia terapéutica de la ampicilina liposomal se atribuyó a la concentración del antibiótico en las células del sistema monocito-macrofágico tras su administración por vía intravenosa. Sin embargo, cualquiera que fuese la dosis, los tratamientos no eliminaban por completo la presencia de bacterias en hígado o bazo, quedando aproximadamente 102 UFC/órgano en los ratones supervivientes. En otro interesante trabajo, la encapsulación de ampicilina en nanopartículas de poli(isobutilcianoacrilato) aumentó alrededor de 120 veces la eficacia del antibiótico en el modelo anterior de infección experimental aguda de *Salmonella typhimurium* de ratón. En este caso, el 100% de los ratones tratados con una única dosis de nanopartículas sobrevivió, mientras que los animales no tratados morían tras 10 días. Esta elevada actividad fue explicada por una completa esterilización de los órganos donde la bacteria intracelular se localizaba (83-85). Aunque no existe un gran número de experiencias en las cuales se hayan realizado una comparativa de la eficacia ofertada por los diferentes sistemas submicrónicos, las nanopartículas parecen más eficaces que los liposomas y, estos a su vez, más eficientes que los liposomas (86). Esta superioridad de las nanopartículas puede ser explicada por su mayor estabilidad en los medios biológicos.

En otro trabajo también se demostró la eficacia de liposomas para incluir estreptomycin y tratar infecciones por *Salmonella enteritidis* (87), utilizando ratones C57BL/6. En este modelo estos liposomas suprimieron la multiplicación bacteriana y prolongaron la tasa de supervivencia de los animales hasta 55 días tras la administración de solamente dos dosis.

Por otra parte, liposomas de gentamicina fueron adecuados para tratar de manera satisfactoria infecciones diseminadas de *Salmonella dublin* en ratones BALB/c (88). En este caso, todos los animales sobrevivieron tras una única administración de 20 mg gentamicina/kg, mientras que la misma dosis del fármaco libre era totalmente ineficaz. Además, los bazos se encontraron «estériles», aunque un pequeño número de bacterias viables se pudo cuantificar en los nodulos linfáticos mesentéricos y en placas de Peyer. En un estudio parecido, gentamicina liposomal a una dosis de 10 mg/kg mostró una elevada eficiencia profiláctica y una gran actividad terapéutica en una infección experimental con *Salmonella typhimurium* en un modelo murino (89).

La eficacia de liposomas encapsulando ciprofloxacino fue estudiado en ratones BALB/c infectados con *Salmonella Dublin* (90). El tratamiento con ciprofloxacino liposomal disminuía el número de bacterias viables en bazo, nodulos linfáticos y placas de Peyer, indicando que el antibiótico se distribuía a todas las áreas de inflamación y no solamente a los órganos principales del sis-

tema retículoendotelial. En una infección sistémica de *Salmonella typhimurium* en ratones, ciprofloxacino liposomal administrado a 20 mg/kg disminuía entre 3 y 4 logaritmos el número de bacterias viables en hígado y bazo (91). Igualmente se observaba una reducción del número de bacterias en pulmón y riñón. Cuando la formulación era administrada por vía pulmonar, la retención de ciprofloxacino en este órgano era también significativamente mayor (91).

Listeriosis

Listeria monocytogenes es un parásito intracelular facultativo capaz de causar meningitis y septicemia. La encapsulación de ampicilina en liposomas multiplicó por 90 su eficacia en ratones infectados con *Leysteria monocytogenes* (92). Este fenómeno es debido a que la ampicilina liposomal disminuye la supervivencia de este patógeno en macrófagos peritoneales de ratón; aunque, la tasa de actividad es dependiente de la composición de estos sistemas lipídicos (93). Por otra parte, en este caso también, nanopartículas conteniendo ampicilina se mostraron más eficientes que los liposomas para el tratamiento de listeriosis en un modelo de infección crónica de ratones con *Listeria monocytogenes* (94). En este caso, se mostró que el bazo no fue totalmente esterilizado, y que ocurrían reinfecciones al cabo de varios días tras la supresión del tratamiento. En este modelo, la reinfección fue explicada por la presencia de bacterias en estadio de no división; aunque, en este mismo modelo, la administración de nanopartículas conteniendo ciprofloxacino (fluoroquinolona activa frente a bacterias en fase de división y en reposo), no pudieron erradicar por completo el reservorio de bacterias (95).

Brucelosis

La brucelosis es una zoonosis transmisible a los humanos tras contacto con animales infectados. En principio, dado que *Brucella* spp. se localiza intracelularmente y que los antibióticos utilizados tienen una baja eficacia, los tratamientos son bastante largos y las recaídas son también bastante frecuentes.

Los liposomas han demostrado ser adecuados sistemas para la administración de gentamicina y estreptomycin. Así, dos inyecciones intraperitoneales de estas formulaciones mostraron su efectividad en ratones y cobayas infectados con *Brucella* spp., no detectándose bacterias viables en el hígado, bazo, pulmones o riñones diez días después de la infección (96). En otro interesante traba-

jo, gentamicina encapsulada en liposomas cargados positivamente demostraron una gran eficacia en reducir el número de bacterias viables de *Brucella melitensis* residentes en el hígado y bazo de ratones infectados. Por el contrario, liposomas cargados negativamente fueron mucho menos eficaces en el tratamiento de la misma infección (97). Estos resultados fueron confirmados por Vitas y colaboradores en un estudio en el cual, utilizando gentamicina encapsulada en liposomas catiónicos, aumentaron la actividad del antibiótico en ratones infectados con *Brucella abortus* ofreciendo hasta un 70% de protección (98, 99).

Más recientemente, partículas de PLA y de PLGA conteniendo gentamicina mostraron una muy buena actividad frente a un modelo de brucelosis experimental en ratones (100-103). En realidad, las partículas de PLGA conteniendo gentamicina se acumulan en los macrófagos y muestran una distribución selectiva en el hígado y el bazo de ratones infectados.

Se ha demostrado también la capacidad de dendrímeros manosilados para la liberación pH específica de rifampicina en macrófagos alveolares de rata (104).

Otras infecciones bacterianas

La Tabla 10.3 recoge otros estudios relacionados con la aplicación de nanotecnologías en el tratamiento de diferentes infecciones bacterianas.

Las formulaciones submicrónicas de antibióticos también han demostrado un importante interés para la administración local de antibióticos y para la liberación controlada de los mismos en el lugar de infección. Así se ha propuesto la utilización de estas formulaciones en la profilaxis de heridas quirúrgicas (113, 114), o en el tratamiento de infecciones oculares como queratitis o endoftalmitis (115-118). Recientemente, unas partículas bioerosionables de sulfato cálcico conteniendo nanopartículas de hidroxiapatita han sido propuestas como material para la administración local y sostenida de antibióticos en infecciones óseas (119). En este sistema, las nanopartículas de hidroxiapatita modifican las propiedades del material permitiendo liberación total de la dosis del antibiótico incorporado. Por otra parte, la tolerancia del material modificado por las nanopartículas aumenta al reducirse la cantidad de ácido producido por la disolución del sulfato cálcico, reduciéndose la respuesta inflamatoria. Este es un buen ejemplo de cómo las nanotecnologías pueden aportar ventajas importantes a otras tecnologías ya disponibles, como puede ser la de producción de materiales para implantación.

TABLA 10.3. *Ejemplos de utilización de nanotecnologías en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias.*

Formulación Referencia	Fármaco	Modelo	Infección experimental	Resultado
Liposomas 105	Penicilina	<i>In vitro</i>	—	Inhibición del crecimiento de cepas resistentes de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> y <i>Escherichia coli</i>
Liposomas 106	Netilmicina	Ratón	<i>Escherichia coli</i>	Aumento de la actividad farmacológica, profiláctica y terapéutica, en modelo experimental
Liposomas 107	Amikacina	Ratón	<i>Mycobacterium avium</i> - <i>M. intracellulare</i>	Niveles de antibiótico en hígado y pulmón durante 28 días
Nanopartículas de gliadina 108	Amoxicilina	Jerbo de Mongolia	<i>Helicobacter pylori</i>	Eliminación eficiente infección experimental por <i>H. pylori</i> debido a su capacidad mucoadhesiva
Bacteriofagos (PhagoBio Derm) 109	Ciprofloxacino		Pacientes con heridas infectadas por <i>S. aureus</i> resistentes	Eliminación de la infección
Nanopartículas PLGA 110	Gentamicina	Ratón	<i>Brucella melitensis</i>	
Nanopartículas PLGA 111	Ciprofloxacino	Ratón	<i>Escherichia coli</i>	Inhibición efectiva crecimiento bacteriano debido a las características de liberación sostenida desde las nanopartículas
Micelas poliméricas (colesterol - PEG - TAT)	Ciprofloxacino	Rata	—	Micelas capaces de atravesar la barrera hematoencefálica

PLGA: poli(láctico-co-glicólico); PEG: polietilenglicol; TAT: péptido activador (NH₂-YGRKKRRQRRR); GEN: gentamicina.

Infecciones virales

Las infecciones víricas son, probablemente, las más difíciles a tratar y se están realizando grandes esfuerzos en la búsqueda de nuevas moléculas y nuevas estrategias para desarrollar terapias efectivas. En la actualidad, las estrategias innovadoras más prometedoras pasan por la utilización de oligonucleótidos antisentido (120-125). La terapia antisentido constituye una alternativa general

a todos los demás tratamientos antivirales que existen para las principales infecciones virales en humanos: HIV, citomegalovirus, virus de la hepatitis C, y el virus respiratorio sincitial.

Infecciones por citomegalovirus

El citomegalovirus humano (CMVH) es un virus altamente especie-específico (126). En los países desarrollados, la prevalencia aumenta desde la infancia y un 10-20% de los niños se infectan antes de llegar a la pubertad. En adultos, la seroprevalencia oscila entre el 10 y el 40%. CMVH raramente causa enfermedad en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, puede causar mortalidad severa en neonatos y en individuos inmunocomprometidos, principalmente en pacientes transplantados y enfermos de SIDA (127). Así, entre un 15-40% de los infectados por VIH sufren retinitis uni- o bilateral que sin un eficaz tratamiento causa ceguera (128). Igualmente, la mortalidad por neumonía causada por CMVH puede alcanzar hasta el 40% en pacientes transplantados de médula (129).

Para el tratamiento local de infecciones por citomegalovirus y para su administración en el ojo, algunos antivirales (como aciclovir y ganciclovir) han sido asociados a nanopartículas. Así nanoesferas convencionales y pegiladas de PLA conteniendo aciclovir fueron capaces de aumentar los niveles del antiviral en el humor acuoso, tras su administración bajo forma de instilación oftálmica en conejos. Sin embargo, las nanoesferas pegiladas eran mucho mejor toleradas que las convencionales y su eficacia era también sensiblemente mayor (130). En un trabajo similar, la pegilación de nanopartículas de poli(alquilcianoacrilatos) aumento la tolerancia ocular de estos sistemas (131).

En otro trabajo, se utilizaron nanopartículas de albúmina para la administración intravítrea de ganciclovir (132). El ganciclovir (GCV) se considera el fármaco de primera elección en el tratamiento de afecciones graves por CMVH. Este principio activo previene la replicación del ADN viral pero no elimina el virus del tejido. Cuando ganciclovir es administrado por vía intravenosa, los niveles que se alcanzan en el vítreo son relativamente bajos, por lo que se hace necesario administraciones repetidas y dosis altas. Con el fin de evitar este problema, se propuso la administración local intravítrea para el tratamiento de retinitis causadas por HCMV (133). Sin embargo, en el vítreo, ganciclovir presenta un aclaramiento elevado y su tiempo medio de residencia es bajo, lo que hace necesario inyecciones frecuentes para mantener los niveles de fármaco en

el rango terapéutico. Esas administraciones continuas y repetidas tienen el riesgo de inducir la aparición de cataratas, desprendimientos de retina y hemorragias (134). Una posible alternativa para facilitar la eficacia y la aceptación del tratamiento por parte del paciente puede ser el uso de nanopartículas como sistemas reservorios de tipo implante matricial a inyectar en el vítreo. Estos, por su pequeño tamaño, minimizarán la alteración de la visión que producen sistemas implantables de mayor tamaño. Por otra parte, la albúmina es una proteína biodegradable que puede asociarse a un gran número de fármacos de naturaleza hidrofílica de forma no específica. Además, las técnicas para la preparación de nanopartículas de albúmina son relativamente sencillas y no es necesario recurrir al uso de disolventes orgánicos ni reactivos tóxicos. Finalmente, estos sistemas deberían permitir una liberación prolongada del fármaco encapsulado y su acceso al núcleo celular (132, 135).

La actividad antiviral de estas nanopartículas de albúmina conteniendo ganciclovir se determinó en fibroblastos de estroma de cornea humanos y fibroblastos embrionarios de pulmón humano (MRC-5) mediante las técnicas de la formación de placas y de la expresión de los antígenos del periodo precoz (136). En fibroblastos MRC-5 infectados, la formulación de nanopartículas era 3 veces más activa que la solución acuosa del antiviral, con una IC₅₀ de 0,4 μ M. Cuando las células eran tratadas con las formulaciones 48 horas después de su infección, la actividad de las mismas aumentaba significativamente en comparación con el tratamiento a tiempo 0. Todos estos resultados se correlacionaron con la capacidad de las nanopartículas de albúmina para vehicular el fármaco al interior de la célula infectada (132).

Recientemente, la terapia antisentido está tomando cuerpo como una alternativa a las carencias terapéuticas de la terapia antiviral tradicional. El primer oligonucleótido antisentido comercializado fue Vitravene[®], para el tratamiento de infecciones por citomegalovirus en pacientes infectados por HIV. Vitravene[®] se administra en solución acuosa por vía intravítrea. Sin embargo, la pobre estabilidad de los oligonucleótidos y su baja capacidad para atravesar las membranas celulares impone pautas de dosificación basadas en administraciones frecuentes y repetidas que pueden ser peligrosas y dañar de forma irreversible el ojo. Por ello, tanto liposomas como nanopartículas han sido propuestos como sistemas de liberación sostenida capaces de ofrecer tratamientos más aceptables desde el punto de vista del paciente (124, 137, 138).

Uno de los primeros trabajos en este sentido, fue la utilización de nanopartículas de albúmina como vehículos para este tipo de moléculas biológicamente activas. En cultivos celulares de fibroblastos infectados con citomegalo-

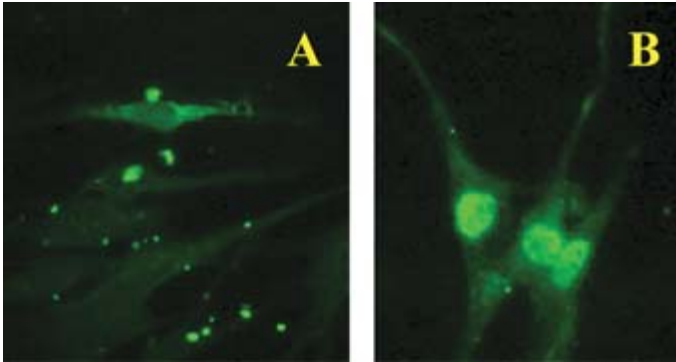


FIGURA 10.2. Perfil de distribución celular de un oligonucleótido antisense libre (A) o encapsulado en nanopartículas de albúmina (B) en células MRC-5. Las células fueron incubadas con $5 \mu\text{M}$ del oligonucleótido durante 24 h a 37°C .

virus humano, la formulación control del oligonucleótido antisense (PO) mostró una actividad antiviral baja. Así, a una concentración de $10 \mu\text{M}$, la eficacia del tratamiento fue solo de un 20%. Por el contrario, las formulaciones de nanopartículas de albúmina aumentaban de manera significativa la actividad antiviral del oligonucleótido y su IC50 se encontraba cerca de $10 \mu\text{M}$ (135). Con el fin de tener una idea más aproximada de la eficacia de las nanopartículas, se investigó su influencia en la internalización del oligonucleótido marcado fluorescentemente. Para PO, su distribución en las células mostraba una distribución perinuclear correspondiente a su acumulación en compartimentos vesiculares como los endosomas y/o lisosomas, sin acumulación nuclear detectable (Figura 10.2A). Además, la fluorescencia asociada a las células disminuía muy significativamente al bajar la temperatura, indicando que la captación del oligonucleótido por las células es un mecanismo de endocitosis dependiente de energía. Por el contrario, las nanopartículas de albúmina fueron capaces de transferir el oligonucleótido al núcleo de las células (Figura 10.2B) (138). Estos resultados confirmaban que las nanopartículas de albúmina tienen propiedades fusogénicas que permiten el escape endosomal de los oligonucleótidos y su distribución nuclear.

Por otra parte, la inyección intravítrea de estas nanopartículas de albúmina en rata demostró que estos sistemas eran bien tolerados (139). Dos semanas después de la administración se observó como una cantidad significativa de las mismas se localizaba todavía en la cavidad vítrea, principalmente en una fina capa que recubría parte de la retina, en sitios adyacentes a los vasos sanguíneos, en el iris y en el cuerpo ciliar. En ningún caso se obtuvieron evidencias de pre-

sencia de nanopartículas en las capas interiores de la retina (células responsables de la visión y en el área neuronal). Además, se pudo confirmar la ausencia de alteraciones en los tres principales autoantígenos inductores de uveoretinitis autoinmune experimental (arrestina, rodopsina e IRPB) que induce un daño considerable en la retina y en los tejidos adyacentes.

La encapsulación de estavudina (d4T) en diferentes tipos de liposomas, aumentó en todos los casos la penetración del fármaco en macrófagos humanos (147). La forma fosforilada de dideoxicitidina (ddCTPP) en liposomas redujo la infección en bazo y médula ósea en ratones infectados, disminuyendo los signos clínicos de la infección, pero sin modificar los parámetros sanguíneos (148). Igualmente, la encapsulación de zalcitabina y saquinabir en nanopartículas permite concentraciones elevadas de ambos fármacos en macrófagos humanos infectados. Sin embargo, en el caso de zalcitabina, no se observaron mejoras significativas al comparar con el fármaco libre (149).

La fijación de ligandos como sCD4 y CD4-IgG en la superficie de liposomas aumenta de forma selectiva la capacidad de estos nanosistemas para alcanzar los macrófagos infectados (121, 150). Con estos sistemas «pilotados» se ha demostrado un aumento de 10 veces en la eficacia del antiviral, disminuyendo en paralelo los efectos tóxicos.

De igual forma se ha visto que la utilización de liposomas pH sensibles permite mejorar la selectividad y la eficacia de los oligonucleótidos antisentido en su capacidad para inhibir la replicación del virus en macrófagos infectados por el VIH 50LTR (151). Sin embargo, hasta la fecha no existe demostración concluyente que la terapia antisentido es capaz de controlar las infecciones virales in vivo. Esto es parcialmente debido a que sensibilidad al pH de este tipo de liposomas se ve fuertemente afectada al entrar en contacto con la sangre. Por ello, y con el fin de incrementar la estabilidad de estos vehículos, parece preferible la utilización de nanopartículas poliméricas. Aunque, hasta la fecha, pocos trabajos han sido publicados, si se ha podido comprobar que las nanopartículas de PLGA permiten aumentar la captura intracelular de los oligonucleótidos antisentido en células infectadas por VIH-1, reduciendo de manera sensible su actividad viral (152).

Otro tipo de vehículos que puede ser interesante para controlar las infecciones virales son los liposomas fusogénicos (153, 154). Recientemente, se ha propuesto un sistema innovador formado por la combinación de liposomas fusogénicos y nanopartículas cargadas con un oligonucleótido (155). En este sistema, los liposomas fusogénicos facilitarían la entrada de las nanopartículas al

citoplasma celular. Una vez en el interior de la célula, las nanopartículas liberarían de forma controlada el oligonucleótido, actuando como reservorio intracelular del oligonucleótido y prolongando su acción en el lugar de acción. El sistema se ha mostrado particularmente interesante para conseguir una regulación prolongada de la expresión de un determinado gen en la célula.

Otro desafío importante en la terapia antirretroviral es el aumento de la estabilidad y de la solubilidad de estos fármacos en el tracto gastrointestinal. Por otra parte, se ha comprobado que el VIH es activo en el tejido linfoide asociado a mucosas en el cual las células inmunocompetentes son un importante «target» para el virus durante el periodo clínico de latencia. En este contexto, la incorporación de azidotimidina (AZT) en nanopartículas de poli(alquilcianoacrilatos) aumentó la estabilidad de este fármaco en los fluidos digestivos (156). Para saquinavir, su asociación previa con ciclodextrinas y posterior encapsulación en nanopartículas de poli(alquilcianoacrilato) ha sido sugerido como una estrategia para resolver su baja biodisponibilidad (157). Aparte de aumentar la solubilidad acuosa del fármaco, esta estrategia permite al fármaco evitar el efecto de la P-glicoproteína intestinal y el metabolismo hepático presistémico, principales responsables de su baja biodisponibilidad oral. Por último, la incorporación de saquinavir en este tipo de nanopartículas era también beneficioso para promover la captura intracelular del fármaco en macrófagos infectados por VIH reduciendo drásticamente su actividad antiviral y potenciando enormemente la eficacia del fármaco libre (149).

Por otra parte, nanopartículas pH-sensibles han demostrado también su eficacia para aumentar la biodisponibilidad oral de un nuevo inhibidor de la proteasa de características lipófilas (CPG 70726). Se probaron distintos tipos de nanopartículas a base de PLA y de copolímeros del ácido metacrílico (Eudragit® L y Eudragit® S). Cuando las nanopartículas se administraron por vía oral a perros Beagle, solamente las nanopartículas a base de Eudragit L permitieron niveles plasmáticos adecuados del fármaco (158).

Otros tratamientos antivirales

La limitación principal del uso de compuestos antivirales de bajo peso molecular reside en la aparición rápida de resistencia viral. Por ello, hoy en día se están intentando aplicar otras estrategias basadas en la estimulación de las defensas naturales del huésped mediante la utilización de interferones combinado con fármacos de síntesis orgánica. Sin embargo, no todos los pacientes responden adecuadamente a esta terapia (159-162). Aparentemente, buenos resultados

se han conseguido mediante la encapsulación de interferón en liposomas (159) y en nanopartículas de albúmina (163). La aplicación de la nanotecnología a la terapia antiviral esta todavía en su infancia. Los pocos datos que ya se disponen en células infectadas son esperanzadores y permiten sospechar que esta estrategia puede tener un futuro muy brillante.

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN ENFERMEDADES METABÓLICAS

Las enfermedades metabólicas incluyen algunos de las principales amenazas para la salud pública mundial. La diabetes afecta a decenas de millones de personas en el mundo (164) y la osteoporosis es la enfermedad metabólica más prevalente.

El tratamiento de enfermedades metabólicas requiere la administración de proteínas o péptidos para paliar estos desórdenes metabólicos. En el caso de la diabetes, las inyecciones diarias de insulina están basadas en la autorregulación de los niveles sanguíneos de glucosa, combinado con un régimen de dieta y ejercicio (165, 166). Desde un punto de vista general, todos estos tratamientos basados en la administración parenteral diaria de la dosis adecuada son engorrosos y poco aceptados por los pacientes, lo cual puede limitar su eficacia (166, 167). Para favorecer la aceptación del tratamiento por parte de los pacientes, diferentes estrategias destinadas a conseguir niveles más sostenidos de estas macromoléculas han sido objeto de intensas investigaciones (168, 169). Entre ellas, el desarrollo de vehículos o formas farmacéuticas capaces de permitir la absorción y regular la liberación de estas macromoléculas a través de las mucosas oral, nasal o pulmonar también han sido (y son) objeto de trabajo intenso. En el caso de la insulina, la formulación oral debería permitir que la hormona accediera directamente al hígado por la vena porta. Esto sería una gran ventaja ya que éste camino mimetizaría su tráfico fisiológico cuando es secretada por el páncreas en individuos sanos (170). Sin embargo, las rutas de administración a través de mucosas siguen siendo un reto importante para la administración de péptidos y proteínas, ya que estas macromoléculas hidrofílicas son incapaces de atravesar las barreras mucosales por ellas mismas y son degradadas una vez alcanzado el torrente circulatorio.

Con el fin de solucionar estos problemas y favorecer la absorción de estas macromoléculas a través de las mucosas del organismo, diferentes estrategias basadas en la nanotecnología han sido propuestas. Aunque ya en 1976 se utilizaron liposomas para administrar insulina a través del tracto gastrointestinal

(171, 172), los resultados obtenidos han sido en general decepcionantes debido a la falta de estabilidad de estos vehículos en los fluidos digestivos. Por otra parte, el uso de nanopartículas poliméricas para la administración de este tipo de macromoléculas fue propuesto en 1980 (173) y, desde entonces, numerosos sistemas submicrónicos han sido ensayados con resultados dispares (174-180).

De todas formas, lo que sí parece cierto es que la capacidad adhesiva de las nanopartículas es uno de los factores clave que determina la absorción y la biodisponibilidad de estas macromoléculas cuando son administrados a través de mucosas. En realidad, el desarrollo de interacciones bioadhesivas favorece el «anclaje» de las nanopartículas en contacto íntimo con la mucosa. Este fenómeno aumentaría el tiempo de residencia de las nanopartículas en el lugar de absorción o de acción del fármaco, favoreciendo el establecimiento de un gradiente de concentración desde el reservorio (nanopartícula) hasta la circulación sanguínea (181, 182).

Otro fenómeno que parece influir en la absorción de macromoléculas a través de las mucosas del organismo es el de la «traslocación» de las nanopartículas. Este fenómeno de absorción es dependiente de la naturaleza de los vehículos. Las nanopartículas de poli(alquiliacianoacrilatos) son absorbidas intactas a través del epitelio intestinal normal, mientras que sufren una intensa degradación en la vecindad de las células M de las placas de Peyer (183). Para otros tipos de nanopartículas biodegradables, no se tienen datos concretos sobre su comportamiento; aunque, se ha descrito que serían principalmente absorbidas por las placas de Peyer (184-186). La Figura 10.3 muestra el comportamiento general de las nanopartículas poliméricas en el tracto gastrointestinal y las posibles vías para su absorción a través de las mucosas del organismo. En cualquier caso, este fenómeno de absorción no está completamente elucidado y una gran cantidad de trabajo experimental tiene que ser todavía realizado para llegar a comprender mejor esta «traslocación». Igualmente, menos información está disponible sobre el devenir de las nanopartículas una vez que han sido absorbidas por la mucosa. De nuevo, utilizando nanocápsulas de insulina se ha visto que estos vehículos alcanzan los vasos sanguíneos de la mucosa. Sin embargo, no hay datos concluyentes sobre si estas nanocápsulas serían capaces de alcanzar otros órganos del organismo o, por el contrario serían degradadas en los vasos sanguíneos que irrigan la mucosa (183, 187).

Recientemente, la administración oral en ratas de nanopartículas de quitosano conteniendo un plásmido que codifica para la luciferasa (pX2-Luc) indujo una importante transfección de las células del intestino delgado (188). Dicho fenómeno puede corroborarse con la utilización de otro plásmido codificando

para la proteína fluorescente verde (pEGFP-N1) que también permitió confirmar que la expresión de las proteínas tenía lugar únicamente en el intestino delgado. Allí, durante 3 días, se pudo monitorizar por luminiscencia (mediante una cámara CDD) la expresión de dicha proteína (188). Durante este periodo, la expresión de luciferasa fue disminuyendo con el tiempo hasta desaparecer a las 72 horas. Este resultado estaría determinado por la vida media de los enterocitos en rata que es del mismo orden a la expresión observada (189).

Tratamiento de la diabetes

La insulina es una proteína de 51 aminoácidos y con una masa molecular de 6.000. Esta proteína es el sostén principal de los pacientes con Diabetes Mellitus insulino dependientes o Diabetes tipo I (190). La enfermedad está principalmente causada por una destrucción «autoinmune» de la insulina que se secreta en las células beta del páncreas (191). Los pacientes no pueden utilizar la glucosa de forma apropiada y presentan niveles altos de este azúcar en sangre (hiperglucemia) mientras que los niveles intracelulares de glucosa son bajos (192). Por otra parte, la administración oral de insulina es totalmente ineficaz para disminuir la glucemia (193). Con el fin de aumentar la biodisponibilidad

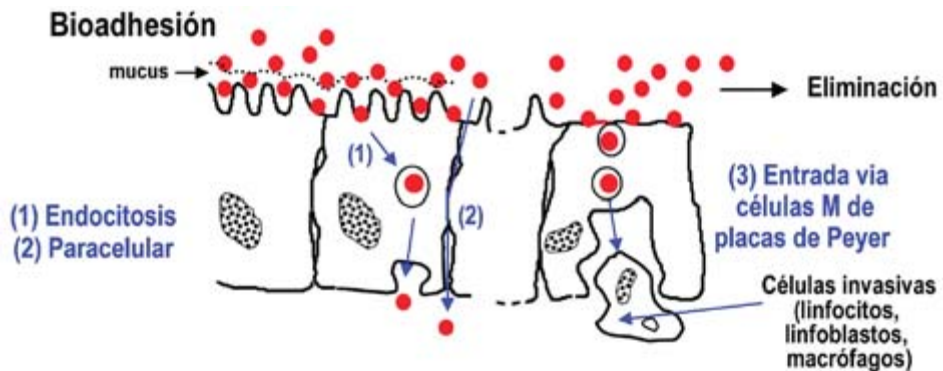


FIGURA 10.3. Representación esquemática del posible comportamiento de las nanopartículas poliméricas en la mucosa gastrointestinal tras su administración oral. Las nanopartículas serían capaces de desarrollar interacciones bioadhesivas con componentes de la mucosa. Esto aumentaría el tiempo de residencia de la forma farmacéutica en contacto con la mucosa y el establecimiento de un gradiente de concentración de la molécula biológicamente activa desde el reservorio (nanopartícula) hacia el epitelio, favoreciendo su absorción. En paralelo o con posterioridad, las nanopartículas (en función de su naturaleza) podrían ser capaces de atravesar dicha mucosa por alguno de los siguientes mecanismos: endocitosis a través de los enterocitos, entrada paracelular y/o absorción vía las células M de las placas de Peyer.

oral de insulina, numerosos trabajos han demostrado el potencial de las nanopartículas, incluyendo nanoesferas convencionales, pegiladas o asociadas a diferentes tipos de ligandos. La Tabla 10.4 recoge algunos ejemplos representativos de nanotecnologías aplicadas a la administración oral de insulina.

El primer estudio destinado a la evaluación de nanopartículas poliméricas como vehículos para la administración oral de insulina en ratas diabéticas fue realizado por Couvreur y colaboradores en 1980 (173). En este caso, la insulina se incorporó por adsorción física a la superficie de nanopartículas de poli(alquilcianoacrilato) de 220 nm. Desgraciadamente no se observó una disminución de los niveles plasmáticos de glucosa en las ratas diabéticas; aunque, la insulina seguía siendo activa tras administración subcutánea. Este resultado sugiere que el péptido no estaba protegido de su degradación proteolítica en el tracto gastrointestinal.

Más tarde, diferentes formulaciones han sido desarrolladas con el fin de encapsular insulina en el núcleo de las nanoesferas y, así, minimizar la rápida degradación de esta proteína. Así, la insulina fue encapsulada en nanocápsulas de PIBCA conteniendo Miglyol 812 (194). Tras su administración oral en ratas diabéticas, y dependiendo de la dosis administrada (12-50 UI/kg), la glucemia disminuyó de manera importante desde el segundo día tras su administración manteniéndose baja durante al menos una semana (194). En otro estudio posterior, la administración oral de 100 UI/kg de insulina encapsulada permitió reducir la glucemia en un 25% durante 6 días (207). En otros estudios llevados a cabo por el mismo grupo, se observó y cuantificó una disminución importante de otras disfunciones pancreáticas (hiperglucagonemia e hipersomatostatinemia) tras la administración intragástrica de insulina encapsulada en nanocápsulas, tanto en un modelo de rata diabética inducida con aloxano como en perros (195, 208).

En un trabajo similar, la dispersión de nanoesferas de PIBCA conteniendo insulina en Miglyol 810 provocó un importante descenso en la glucemia de los animales desde la segunda hora hasta al menos 10 días tras la administración de una única dosis de la macromolécula, con un mínimo de glucosa en sangre a las 48 horas. Sin embargo, estos efectos eran más cortos (2 días) o nulos si las nanoesferas se dispersaban en un medio acuoso conteniendo o no tensioactivos (196). En un trabajo más reciente, Hou y colaboradores han confirmado la influencia del vehículo oleoso en el incremento del efecto de la insulina encapsulada en estas nanopartículas. En este trabajo, la biodisponibilidad aparente de la formulación de insulina en las nanopartículas de PIBCA (50 UI/kg) fue del 22% cuando se dispersó la formulación en una solución oleosa (aceite de soja, Tween 20 y vitamina E) y del 15,5% cuando se dispersaba en un medio acuoso (197). Esta mayor

TABLA 10.4. *Ejemplos representativos de las nanopartículas empleadas para la administración oral de insulina.*

Formulación Referencia	Propiedades	Modelo animal/dosis	Resultados
Nanocápsulas PIBCA 194	220 nm EE: 55%	STZ-rata diabética 12-50 UI/kg	Efecto hipoglucemiante intenso y duradero (2.º día hasta 1-3 semanas)
NP PIBCA 195	145 nm 1 UI/mg polímero	STZ-rata diabética 100 IU/kg	Para insulina humana NP dispersadas en agua: no efecto NP dispersadas en tensioactivos: efecto hipoglucémico prolongado (desde la 2.ª h hasta 48 h) NP dispersadas en aceite: efecto hipoglucémico muy duradero (hasta 2 semanas)
NP PIBCA 196	85 nm EE: 60%	STZ-rata diabética 50 UI/kg	Para insulina humana, efecto hipoglucemiante durante al menos 40 h
NP PIBCA 197	—	STZ-rata diabética 50 UI/kg	Cuando NP dispersadas en agua: F_R del 15% Cuando NP dispersadas en aceite: F_R del 22%
NP PLGA NP PLGA-FAO-Fe 198	< 5 mm	Rata 19 UI/kg	Con insulina bovina: F_R para PLGA-NP: 1,7% F_R para PLGA-FAO-NP: 11,4%
NP PLGA 199	146 nm EE: 88,5%	STZ-rata diabética 20 UI/kg	Con complejo insulina-fosfolípido, el F_R fue del 7,7%
NP PLGA 200	150 nm 26 mg/mg	STZ-rata diabética 20 UI/kg	Con insulina porcina: F_R del 3,7% para PLGA NP F_R del 6,3% para PLGA-HP55 NP
NP PLGA-HP55	169 nm 32 mg/mg		
NP quitosano 201	270-340 nm EA: 39-79%	STZ-rata diabética 50-100 UI/kg	Con insulina porcina: EF del 4,4% (50 UI/kg) y 3,5% (100 UI/kg)
NP quitosano 202:203	290 nm 95 mg/mg	Aloxano-rata diabética 7-21 IU/kg	Para una dosis de 21 UI/kg, la hipoglucemia se prolongó durante al menos 15 h y EF fue 14,9%.
NP Quitosano-PGA 193	197 nm 15 mg/mg	STZ-rata diabética 15-30 UI/kg	Con insulina bovina, disminución importante de los niveles plasmáticos de glucosa durante al menos 10 h

TABLA 10.4. *Ejemplos representativos de las nanopartículas empleadas para la administración oral de insulina. (Continuación)*

Formulación Referencia	Propiedades	Modelo animal/dosis	Resultados
NP lipídicas sólidas 204	60 nm EE: 40% 50 UI/kg	STZ-rata diabética	Para NP lipídicas sólidas: $F_R = 5\%$ Para WGA-NP lipídicas sólidas: $F_R = 7,1\%$
WGA-NP lipídicas sólidas	70 nm EE: 40%		
Vitamina B12-NP dextrano 205	160-250 nm 10-28 μ g/mg	STZ-rata diabética 20 UI/kg	Para insulina humana, EF fue 2,6 veces mayor que para nanopartículas convencionales (26,5% vs 10,3%)
NP PEC-Eudragit RS 206	360 nm EE: 96%	STZ-rata diabética 25-100 UI/kg	Para insulina humana, efecto hipoglucémico dosis dependiente. A 100 UI/kg, F_R del 13%.

NP: nanopartículas; PIBCA: poli(isobutil-2-cianoacrilato); PLGA: poli(láctico-co-glicólico); FAO: oligómero de anhídrido fumárico; Fe: tetraóxido de hierro; HP55: phtalato de celulosa; PGA: ácido poli(glutámico); WGA: lectina de germen de trigo; PEC: poli(épsilon-caprolactona); EA: eficacia de asociación (%); EE: eficacia de encapsulación (%); STZ: estreptozotocina; F_R : biodisponibilidad relativa; EF: eficacia farmacológica; PIBCA: poli(isobutil-2-cianoacrilato).

absorción de la insulina cuando las nanopartículas se dispersan en medios oleosos fue confirmada por Watnasirichaikul y colaboradores (209). En este caso, la dispersión de estas nanopartículas en una microemulsión (conteniendo mono- di- y triglicéridos de cadena media, polisorbato 80 y monooleato de sorbitano) dio lugar a una mayor reducción de los niveles sanguíneos de glucosa en ratas diabéticas que la administración de una solución acuosa de insulina o que la administración de insulina libre dispersada en la misma microemulsión.

Otro resultado interesante es que las formulaciones de insulina en nanopartículas de poli(alquilcianoacrilatos) se han mostrado eficaces para paliar la enfermedad en un modelo de ratón diabético y no obeso que mimetiza la diabetes tipo 1 humana (210). Así, la administración oral de una dosis semanal de insulina encapsulada en nanocápsulas de PIBCA (100 UI/kg) redujo la incidencia de diabetes (38% vs. 75% para el control), retrasó el inicio de la enfermedad y disminuyó la severidad de la inflamación linfocitaria de los islotes endógenos. Aunque el tratamiento oral fue parado a los 300 días de edad de los animales, la incidencia de diabetes a día 360 seguía siendo bajo en los ratones tratados con estas nanocápsulas de insulina por vía oral (210).

Todos estos resultados muestran claramente que la encapsulación de insulina en nanopartículas de poli(alquilcianoacrilatos), en comparación con la ad-

sorción superficial de la proteína, es capaz de reducir la glucemia en ratas diabéticas. De la misma forma, la presencia de excipientes oleosos podría jugar un papel importante en la protección de la insulina y en su paso a través de la barrera intestinal (195, 211). De hecho, las nanopartículas no recubiertas tendrían una mayor capacidad para adherirse a la mucosa mediante algún mecanismo de bioadhesión. El desarrollo de interacciones bioadhesivas favorecería la formación de un depósito o reservorio de insulina en la mucosa intestinal, desde el cual la proteína sería liberada (195, 207, 208). Por otra parte, la presencia de contenidos oleosos (asociados a las nanopartículas) reduciría el vaciamiento gástrico y, así, se aumentaría el tiempo de residencia y las posibilidades para el desarrollo de interacciones bioadhesivas entre las nanopartículas y ciertos componentes de la mucosa gastrointestinal. En este contexto, mediante el uso de marcadores fluorescentes, Aboubakar y colaboradores demostraron que las nanocápsulas de insulina son capaces de depositarse a lo largo de la mucosa intestinal (212). Resultados similares fueron obtenidos por Pinto-Alphandary y colaboradores (183) usando insulina marcada con rojo Texas o las mismas nanocápsulas, conteniendo insulina, marcadas con oro coloidal.

Otro tipo de sistemas submicrónicos ampliamente utilizados para la administración oral de insulina son las nanopartículas a base de poli(ésteres). Así, Barichello y colaboradores (213) prepararon este tipo de nanopartículas en las cuales la insulina se encontraba de manera preferente unida a la superficie de las mismas. A pesar de esta mayoritaria adsorción, se observó un fuerte efecto hipoglucémico tras su administración en el íleo de los animales. Por otra parte, nanopartículas de PLGA han sido también utilizadas para encapsular un complejo entre insulina y fosfatidilcolina de soja (199). En un modelo de ratas diabéticas, estas nanopartículas inducían una importante reducción de los niveles plasmáticos de glucosa durante las primeras ocho horas, manteniendo el efecto durante más de 12 horas. En paralelo, la concentración sérica de insulina aumentaba gradualmente durante las primeras seis horas. La biodisponibilidad relativa de la insulina encapsulada en estas nanopartículas fue inferior al 8%, comparándola con una dosis subcutánea de insulina libre de 1 UI/kg, todavía lejos al límite inferior requerido para situaciones clínicas (superior al 15%).

En otro interesante trabajo, una formulación de nanopartículas formada por Fe_3O_4 (10%) y una mezcla de PLGA y oligómeros de ácido fumárico (2:1) mostró una interesante actividad al ser administrada en ratas. Esta formulación mostró una eficacia superior al 11% de la que se obtuvo al administrar la misma dosis de insulina por vía intraperitoneal. Además, las nanopartículas fueron capaces de controlar los niveles de glucosa en plasma cuando se desafió a los animales

con una dosis de glucosa (198). Los autores suponen que varias propiedades de la formulación, incluyendo su capacidad bioadhesiva, contribuyen a la eficacia por vía oral. Así, los oligómeros de ácido fumárico y Fe_3O_4 potenciarían las propiedades bioadhesivas de las nanopartículas (214), permitiendo una mayor interacción entre estos vehículos y el epitelio intestinal. Por otra parte, el PLGA contribuiría a aumentar la estabilidad física de las nanopartículas resultantes y a modular la liberación de insulina. De hecho, cuando la insulina se formula en sistemas a base de poli(anhídridos), como el copolímero de ácido fumárico y sebáico, no se observa un efecto hipoglucemiante. Esto sería debido a la rápida liberación de la proteína desde estas formulaciones. De forma similar, nanopartículas de PLGA fueron también ineficaces debido, probablemente, a su menor habilidad para desarrollar interacciones adhesivas dentro del tracto gastrointestinal (214).

Más recientemente, insulina porcina encapsulada en nanopartículas de PLGA recubiertas con phtalato de celulosa (recubrimiento entérico) dio lugar a una formulación que administrada en un modelo de ratas diabéticas indujo un efecto hipoglucemiante importante. Además esta formulación permitía una mayor absorción de insulina que cuando se formulaba en nanopartículas similares pero no recubiertas. Esto implica que el recubrimiento entérico ofrece una mayor protección a la insulina frente a su eventual degradación en las condiciones fisiológicas del estómago (200).

Por otra parte, también recientemente, se ha propuesto la utilización de nanopartículas de poli(epsilon-caprolactona) y Eudragit[®] RS como vehículo para la administración oral de insulina (206). El hecho más interesante ha sido el gran potencial hipoglucemiante de estas nanopartículas. Este efecto comienza a observarse a las 2 horas de su administración y se mantiene durante al menos 24 horas. Estos resultados pueden explicarse por la presencia en Eudragit RS de grupos de metil amonio ionizables, que confieren a las nanopartículas una carga neta positiva favoreciendo el desarrollo de interacciones bioadhesivas con la mucosa. Además, los polímeros bioadhesivos (como Eudragit RS o quitosano) son capaces de abrir de forma reversible las uniones estrechas que existen entre las células constitutivas de las mucosas del organismo, favoreciendo de esta manera el transporte de macromoléculas (215).

También se ha investigado el potencial de las nanopartículas de quitosano para aumentar la biodisponibilidad oral de macromoléculas. Así, Pan y colaboradores (202) estudiaron la capacidad de estos sistemas para promover la absorción de insulina en un modelo de ratas diabéticas inducido por aloxano. En este caso, una dosis de 14 UI/kg administrada por vía oral inducía un efecto hi-

pogluicémico significativamente mayor que el obtenido en el grupo control. Cuando las dosis de insulina aumentaban, el efecto hipogluceante aparecía de forma más temprana y se prolongaba en el tiempo. En otro estudio, el mismo grupo investigó el efecto del tamaño de las nanopartículas de quitosano conteniendo insulina en el mismo modelo animal (203). Se pudo constatar como el diámetro de las partículas es un parámetro importante que condiciona el efecto de la proteína encapsulada. Así, el mayor efecto hipogluceante se observó con nanopartículas de 350 nm. En este caso, los niveles plasmáticos de glucosa eran remarcadamente bajos, con un efecto máximo a las 15 h que era cuantificable durante al menos 35 horas. Además, la disponibilidad farmacológica relativa, frente a una inyección subcutánea de insulina, era del 10% (para nanopartículas de 120 nm), 15% (nanopartículas de 350 nm) y 7% (partículas de 1000 nm).

En otro interesante trabajo, Ma y colaboradores evaluaron el comportamiento de nanopartículas de quitosano preparadas en condiciones de pH diferentes (pH 5,3 y pH 6,1) (201). En condiciones ácidas, las nanopartículas eran ligeramente menores que aquellas preparadas a pH 6,1 (270 vs 340 nm); aunque la cantidad de insulina incorporada en las nanopartículas era dos veces mayor cuando las nanopartículas se obtenían a pH 6,1. En un modelo de rata diabética, se observó una disminución sostenida de los niveles de glucosa en plasma con las nanopartículas preparadas a pH 5,3. En realidad, el máximo efecto farmacológico apareció a las 16 horas tras su administración, manteniéndose durante al menos las 11 horas siguientes. Por otra parte, las nanopartículas preparadas a pH 6,1 dieron lugar a un efecto inicial mucho más rápido (a las 2 horas) pero también menos sostenido.

Otra interesante aproximación para aumentar la biodisponibilidad de insulina mediante nanopartículas bioadhesivas fue desarrollado por Lin y colaboradores (193). En este estudio, nanopartículas compuestas de quitosano despolimerizado y ácido poliglútamico [β -PGA] se ensayaron en animales. Para una dosis oral de 15 UI/kg se pudo observar un importante descenso en los niveles plasmáticos de glucosa, manteniéndose durante al menos 10 horas tras la administración de la dosis de nanopartículas.

Además de todos estos tipos de nanopartículas, algunos trabajos basados en la asociación de diferentes ligandos a las nanotecnología han sido desarrollados en los últimos años. Entre los diferentes ligandos que se han propuesto para aumentar la biodisponibilidad de la insulina, mediante la potenciación de la habilidad de las nanopartículas para desarrollar interacciones bioadhesivas, se encuentran la lectinas o aglutinina de germen de trigo (WGA) (204) y ciertos derivados de vitamina B12 (205). En el primer caso, WGA unido covalente-

mente a nanopartículas lipídicas sólidas permitió disminuir los niveles sanguíneos de glucosa de forma remarcable, multiplicando por 2 el efecto farmacológico frente a las nanopartículas convencionales. Por otra parte, la biodisponibilidad relativa (comparada con una administración subcutánea de insulina) fue del 7% para dicha formulación (204).

En el segundo caso, la unión de un derivado de vitamina B12 a la superficie de nanopartículas de dextrano permitió reducir la glucemia de los animales de forma bifásica. Primeramente, se observó una fase caracterizada por una fuerte reducción de la glucemia de los animales (con un máximo a las 5 h) volviendo a los niveles basales a las 8-10 h tras la administración. Posteriormente, se pudo observar una segunda fase de reducción de los niveles de glucosa en sangre que se mantenía durante 2,5 días. El efecto farmacológico fue 3 veces superior con las nanopartículas funcionalizadas con el derivado de vitamina B12 que con las nanopartículas convencionales (205).

Tratamiento de la osteoporosis

Calcitonina (CT), una hormona polipeptídica endógena compuesta por 32 aminoácidos, juega un papel crucial en la homeostasis del calcio y en el remodelado del hueso. Normalmente, calcitonina es usada para tratar la osteoporosis y la enfermedad de Paget. De acuerdo con los datos de la Fundación Americana de Osteoporosis, esta enfermedad afectaría a aproximadamente 55 millones de ciudadanos de EEUU o al 55% de la población mayor de 50 años (216). En España, según la Sociedad Española de Reumatología, esta enfermedad afectaría a unos 2,5 millones de personas (217).

En principio, cuatro formas diferentes de CT son usadas en clínica: CT humana sintética (hCT), CT sintética de salmón (sCT), CT natural porcina (pCT) y un análogo de CT de anguila (Elcatonina). CT es degradada de forma intensa en el tracto gastrointestinal y su administración por vía oral implica la administración de grandes dosis. Por ello, el empleo de nanotecnologías es una estrategia interesante para favorecer e incrementar la biodisponibilidad oral de este péptido.

La Tabla 10.5 muestra algunos ejemplos relativos al uso de nanopartículas poliméricas para la administración oral de calcitonina. Entre los tipos de nanopartículas utilizadas destacan las basadas en poli(alquilmcianoacrilatos), derivados de poli(estireno), poli(ésteres) y quitosano.

TABLA 10.5. *Ejemplos representativos de las nanopartículas empleadas para la administración oral de calcitonina.*

Formulación Referencia	Descripción	Características	Animal	Resultados
NP PLGA 218	PLGA 50:50; MW 8000 Complejo oleato-sCT	170-320 nm 9-27 mg/mg EE: 53-95%	Rata SD hembra Dosis: 60 mg/kg	Biodisponibilidad del 0,4%
NP PS-PNIPAA 219-221	sCT	895 nm EA: 15%	Rata SD macho	Reducción AUC frente a control (NP PNIPAA)
NP PS-PNIPAA-PVA		386 nm EA: 30%		AUC 3 veces menor que para control
NP PS-PNIPAA-PMAA		540 nm EA: 100%		Similar AUC que control
NP PS-PVA-PMAA		318 nm EA: 92%		AUC 1,3 veces menor que control
NP PLGA recubiertas con quitosano 222	PLGA 75:25 MW: 20000 Elcatonina	650 nm 14 mg/mg EE: 62%	Rata Wistar macho Dosis: 500 IU/kg	Máxima reducción de nivel de Ca ²⁺ : 25% Respuesta de hipocalcemia prolongada (aprox. 36 h.)
Nanocápsulas quitosano 223	sCT	270 nm EE: 44%	Rata SD macho Dosis: 500 IU/kg	Máxima reducción de nivel de Ca ²⁺ : 30% Respuesta de hipocalcemia prolongada (aprox. 24 h.)
Nanopartículas lipídicas recubiertas de quitosano 224	sCT	537 nm EE: 31%	Rata SD macho Dosis: 500 IU/kg	Máxima reducción de nivel de Ca ²⁺ : 30% Respuesta de hipocalcemia prolongada (aprox. 24 h.)
Nanocápsulas pegiladas de quitosano 225	sCT	250 nm EE: 44-52%	Rata SD macho Dosis: 500 IU/kg	Máxima reducción de nivel de Ca ²⁺ : 30% Respuesta de hipocalcemia prolongada (aprox. 24 h.)

NP: nanopartículas; PLGA: poli(láctico-co-glicólico); PS: poli(estireno); PNIPAA: poly(N-isopropilacrilamida); PMAA: ácido poli(metacrílico); PVA: poli(vinilamina); MW: peso molecular; sCT: calcitonina sintética de salmón; EA: eficacia de asociación (%); EE: eficacia de encapsulación (%); SD: Sprague-Dawley; AUC: area bajo la curva de los niveles de calcio en sangre en función del tiempo.

Lowe y Temple (226) describieron la encapsulación de hCT en nanocápsulas de PIBCA. Aunque, el péptido se asociaba de forma eficiente a las nanopartículas, este era liberado muy rápidamente en los medios digestivos y no se pudo observar aumentos importantes en su biodisponibilidad. Mas tarde, calcitonina fue incorporado en el núcleo acuoso de nanocápsulas de poli(isobutilcianoacrilato). Tras su administración a dosis única en ratas, el efecto hipocalémico observado representaba el 45% del efecto obtenido tras la administración intravenosa de una dosis similar de sCT. La biodisponibilidad oral calculada fue del 40% (227).

En otro interesante trabajo, Sakuma y colaboradores propusieron la utilización de nanopartículas de poli(estireno) recubiertas en superficie con diferentes cadenas poliméricas hidrofílicas (219, 220). Tras optimización, estos autores propusieron nanopartículas recubiertas con poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAA) como vehículos para la administración oral de calcitonina. A pesar de que la sCT fue adsorbida a la superficie de estas nanopartículas, la formulación mostró un elevado efecto hipocalémico que se correlacionó con su gran potencial para desarrollar interacciones bioadhesivas en el tracto gastrointestinal (219, 220). Mas recientemente, el mismo grupo ha propuesto la introducción de poli(vinilamida) (PVA) y/o ácido poli(metacrílico) en la superficie de estas nanopartículas para compensar la baja incorporación de sCT y aumentar la protección de la calcitonina frente a tripsina. La mejor solución parece ser la combinación de PNIPAA con PVA, puesto que dicha asociación permite obtener nanopartículas con más calcitonina incorporada en las nanopartículas y con un potencial bastante superior para reducir los niveles plasmáticos de calcio (221).

Por otra parte, San Yoo y Park (218) formularon complejos entre oleato sódico y sCT en nanopartículas de PLGA con el fin de incrementar la eficacia de encapsulación en este tipo de nanopartículas. Estas fueron administradas por vía oral en ratas y las concentraciones sanguíneas de calcio fueron cuantificadas en función del tiempo. Dos horas después de la administración de la dosis de nanopartículas los niveles de calcio comenzaron a descender. Sin embargo, únicamente cantidades ínfimas de sCT pudieron ser cuantificadas y la biodisponibilidad oral calculada fue del 0,4%. Este valor es relativamente bajo comparado con otros previamente descritos (desde 0,5% al 3%), tras la administración de sCT en el yeyuno de perros (228) o en la región colónica de ratas (229).

Otra estrategia empleada para aumentar la biodisponibilidad oral de calcitonina es el recubrimiento de nanopartículas con polímeros mucoadhesivos. En este contexto Elcatonina encapsulada en nanopartículas de PLGA fueron recubiertas con un polímero bioadhesivo como quitosano, ácido poliacrílico o algi-

nato sódico. Las nanopartículas recubiertas con quitosano mostraron la mayor capacidad adhesiva en un modelo *ex vivo*. Cuando las diferentes formulaciones se administraron por vía oral en ratas, de nuevo las nanopartículas recubiertas con quitosano mostraron el mayor efecto hipocalcémico. El nivel de calcio disminuyó temporalmente hasta el 80-85% durante la primera hora tras la administración. Además, una significativa y prolongada reducción de los niveles plasmáticos de calcio fué observada durante las primeras 12 horas tras su administración. A la máxima dosis administrada (500 UI/kg), se observó una reducción muy fuerte y prolongada de aproximadamente 36 horas, de los niveles de calcio. Para las nanopartículas convencionales o no recubiertas, el efecto farmacológico fue significativamente menor (222).

En una estrategia similar, nanopartículas lipídicas y liposomas fueron también recubiertos con quitosano y evaluados como vehículos para la administración oral de calcitonina. Así, en un trabajo reciente, nanopartículas lipídicas recubiertas con quitosano fueron comparadas con nanocápsulas de quitosano conteniendo sCT (223). Ambas formulaciones mostraron una rápida y drástica reducción de los niveles séricos de calcio tras la administración de una dosis única de 500 UI/kg. Además, esta baja calcemia se mantuvo durante al menos 24 h. Estos niveles de reducción son similares a los descritos para otros sistemas similares como liposomas recubiertos con quitosano (230) o nanopartículas recubiertas con poli(N-isopropilacrilamida) (221).

Sin embargo, la habilidad de las nanocápsulas de quitosano para prolongar la respuesta farmacológica es superior a la descrita por otros sistemas y vehículos. Parece ser que la habilidad de estas nanopartículas sería debido a una superior capacidad para desarrollar interacciones bioadhesivas en el tracto gastrointestinal y facilitar el transporte paracelular de macromoléculas (230-232). Más recientemente, nanocápsulas pegiladas de quitosano han mostrado también importantes descensos en la calcemia de animales de laboratorio durante al menos 24 h (225). Sin embargo, esta respuesta sería muy similar a la que se ha observado con nanocápsulas convencionales de quitosano por lo que la pegilación no aportaría, en este caso, ventajas adicionales.

Administración de macromoléculas por las vías nasal y pulmonar

La administración de insulina y calcitonina por las rutas nasal y pulmonar ha sido también objeto de un gran interés. Esto es debido a la elevada permeabilidad y baja actividad enzimática de estas mucosas en comparación con la del tracto

gastrointestinal. Así, nanopartículas de quitosano conteniendo insulina fueron capaces de reducir a la mitad la glucemia de conejos, 30 minutos después de su administración (233). La amplitud de dicho efecto fue mucho menos pronunciada con una solución de insulina conteniendo quitosano. Recientemente, ha sido demostrado el transporte de nanopartículas pegiladas de PLA a través de la mucosa nasal (234). Los factores que parecen condicionar dicho paso de la mucosa nasal son el tamaño y la densidad del recubrimiento de PEG. Por otra parte, nanocomplejos de insulina obtenidos con un copolímero de PLA y poli(vinilalcohol) también aumentaron la biodisponibilidad de la insulina dando lugar a una reducción de la glucemia tanto en ratas sanas como en ratas diabéticas (235). En general cuanto más hidrofílicos eran los nanocomplejos, más elevada fue la absorción.

La administración intranasal de nanopartículas de insulina parece muy interesante en cuanto da lugar a una rápida absorción, aunque el efecto es poco duradero (1,5-2 horas). Para conseguir una forma más sostenida de liberación de insulina, Tanaka y colaboradores (236) sugirieron la administración del gen de la insulina por vía nasal utilizando liposomas como vehículo. La producción sostenida de insulina se obtuvo en ratones diabéticos siguiendo tratamientos diarios gracias a la transfección de las células epiteliales alveolares de los pulmones. En este estudio, los pulmones parecen el principal tejido en el cual tiene lugar la expresión génica tras la administración nasal de estos liposomas (236). En cualquier caso, el nivel de insulina producida fue suficiente para corregir la hiperglucemia de los ratones diabéticos sin producir hipoglucemia u otro tipo de efectos adversos. En otros trabajos también se ha demostrado la viabilidad de los liposomas para la administración pulmonar de insulina (237) o para promover su absorción (238). De todas formas, aunque el epitelio pulmonar representa un lugar atractivo para la administración de principios activos, ya que su superficie es de aproximadamente 80 m², hay que recordar que su función principal no es la absorción. Así, en el momento actual, todos los nanosistemas empleados para aumentar la absorción de fármacos a través de la mucosa pulmonar (y nasal) pueden ser sospechosos de peligroso para la salud (237), cuando además hay poco conocimiento acerca de los hipotéticos efectos tóxicos de un uso prolongado.

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO DE ÓRGANOS

La terapéutica más usual, tanto para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como para la prevención del rechazo de órganos, está basada en la

modulación de la respuesta inmune mediante el uso de fármacos inmunosupresores. El fármaco representativo y más utilizado es la ciclosporina A (CA). Por vía oral, CA es utilizado para prevenir el rechazo, mientras que por vía tópica se utiliza para controlar la progresión de las enfermedades oftálmicas autoinmunes. En general, el fármaco muestra una baja biodisponibilidad debido a su baja permeabilidad y a ser sustrato de la P-glicoproteína y de otros complejos enzimáticos.

En administración oral, la mayoría de los intentos realizados utilizando liposomas o nanopartículas poliméricas han dado lugar a valores de biodisponibilidad relativa significativamente menores a los obtenidos con la formulación utilizada en clínica basada en la incorporación del fármaco en una microemulsión (239-241). Tal vez, una de las pocas excepciones hayan sido las nanopartículas de poli(épsilon-caprolactona) desarrolladas por Molpeceres y colaboradores. En este caso, el área bajo la curva de concentración plasmática de CA en función del tiempo fue 2 veces mayor para las nanopartículas que para la microemulsión comercial Sandimmun® Neoral (242, 243). En otro trabajo del mismo grupo, se cuantificó una mayor concentración del fármaco en tejidos y sangre tras la administración del inmunomodulador en nanopartículas de PEC que cuando se administraba bajo forma de la microemulsión comercial. Sin embargo, y a pesar de la mayor concentración sanguínea, la toxicidad renal del fármaco de ambas formulaciones fue similar (244).

Por otra parte, timopentina (TP5) es un pentapéptido (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr) que constituye el segmento 32-36 de la timopoiatina (245). Como agente inmunomodulador, TP5 se utiliza en los tratamientos como la dermatitis atópica, el síndrome de Sezary, la artritis reumatoide así como para disminuir la inmunocompetencia en ciertos pacientes (246, 247). Debido a su baja permeabilidad a través de membranas, metabolismo en el tracto gastrointestinal y extremadamente baja vida media en el organismo (inferior a 30 segundos), la administración de TP5 requiere inyecciones repetidas frecuentemente o perfusión intravenosa, lo cual restringe mucho sus posibles aplicaciones clínicas (248).

Timopentina se incorporó en nanopartículas de PLGA y en nanopartículas de PLGA funcionalizadas con WGA (249). En un modelo de ratas inmunosuprimidas con ciclofosfamida, se administró por vía oral dichas nanopartículas y se retiraron muestras de sangre para analizar las poblaciones de linfocitos por citometría de flujo. Para las nanopartículas recubiertas con la lectinas, los valores de cociente entre CD4⁺ y CD8⁺ fueron significativamente mayores que para las nanopartículas convencionales (249). Este efecto se correlacionó con el hecho de que la unión de WGA a la superficie de las nanopartículas de PLGA au-

mentaba de forma significativa la absorción oral de TP5 debido a un fenómeno de bioadhesión específico en la membrana intestinal.

En otro interesante trabajo, nanopartículas de quitosano trimetilado conteniendo TP5 se administraron en animales de laboratorio. En este caso, el cociente entre CD4⁺ y CD8⁺ fue 2,6 veces mayor que el obtenido para el grupo control (250). Resultados similares fueron obtenidos por Zheng y colaboradores (251) utilizando nanopartículas de quitosano recubiertas con Eudragit S con el fin de protegerlas del pH estomacal (251).

Por lo que respecta al tratamiento de las enfermedades autoinmunes oftálmicas, existe un real interés en la administración de ciclosporina A mediante el uso de liposomas y/o nanopartículas. Los sistemas nanoparticulados actúan como reservorios del fármaco, permitiendo la liberación sostenida de CA, incrementando el tiempo de residencia en contacto con la superficie del ojo y, en algunos casos, promoviendo su penetración intraocular (252-255).

Por una parte, los liposomas han mostrado una elevada capacidad para aumentar la biodisponibilidad intraocular de ciclosporina A sin inducir toxicidad en la retina (256). Por otra parte, utilizando nanopartículas de quitosano se pudo determinar que la concentración terapéutica de ciclosporina A se mantenía durante, al menos, 48 horas en la superficie ocular, principalmente en la córnea y en la conjuntiva. Además no se pudieron cuantificar niveles de fármaco en las estructuras internas oculares (iris, cuerpo ciliar y humor acuoso) ni en sangre (257). En cualquier caso, de entre los distintos sistemas propuestos y evaluados, aquellos basados en el uso de quitosano han presentado el mayor potencial para la administración de ciclosporina A en el tejido periocular (240, 258).

Para el tratamiento de la uveítis ocular, el uso de tamoxifeno asociado a nanopartículas pegiladas de poli(alquilcianoacrilatos) [copolímero de polietilenglicol-cianoacrilato y hexadecilcianoacrilato] mostró una dramática reducción del proceso inflamatorio. Administradas por la vía intraocular, la concentración de tamoxifeno pudo ser mantenida de forma sostenida durante un largo periodo de tiempo (259).

Otros compuestos como los glucocorticoides también han sido asociados a las nanopartículas para controlar las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, liposomas pegilados han sido utilizados para administrar elevadas concentraciones de metilprednisolona al cerebro para el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos, que parecen ser debidos a la aparición de enfermedades autoinmunes (260).

Merodio y colaboradores estudiaron la distribución de nanopartículas de albúmina en un modelo de enfermedad autoinmune en el sistema nervios central

con el fin de evaluar el potencial de estos vehículos para atravesar la barrera hematoencefálica (261). La barrera hematoencefálica es una membrana formada por células endoteliales, células de la glía (astrocitos y pericitos) y la membrana basal (262), caracterizada por la ausencia de pequeños poros o fenestraciones en los capilares que alcanzan el sistema nervioso central (263). El resultado es un obstáculo formidable y complejo para numerosos fármacos. Ciertas enfermedades neurológicas están caracterizadas por alteraciones significativas en esta barrera como pueden ser la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, ciertos tumores o, incluso, infecciones por citomegalovirus o VIH (264). En el caso de la esclerosis múltiple, esta enfermedad está siendo ampliamente estudiada en el modelo ratón de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (265). En el caso de las nanopartículas de albúmina se pudo observar que cuando se administraban por vía parenteral, estas se localizaban en las áreas afectadas por este trastorno en el sistema nervioso central, principalmente la porción lumbar de la médula espinal, el quiasma óptico y los lóbulos del cerebelo (261). Por otra parte, estudios inmunocitoquímicos revelaron que los macrófago circulantes, que migran a las áreas dañadas del sistema nervioso central, y células de microglía residentes eran las responsables de la distribución de las nanopartículas de albúmina en el modelo de EAE. De la misma manera, nanopartículas pegiladas de poli(alquilcianoacrolato) también fueron capaces de alcanzar el tejido cerebral de ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental y mostraron una distribución similar a la observada con las nanopartículas de albúmina (266).

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN EL TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN

Uno de los principales inconvenientes de los fármacos antiinflamatorios, por ejemplo, diclofenaco o indometacina, es su toxicidad local en contacto con los tejidos. Estos fármacos inducen úlceras en la mucosa gastrointestinal cuando son administrados por vía oral y pueden inducir daño en el epitelio córneo tras su instilación o en el tejido muscular tras su inyección. La toxicidad local puede reducirse de forma considerable mediante encapsulación de estos fármacos en nanocápsulas o liposomas, manteniendo intacta la actividad del fármaco (267-270).

Tras administración oral, las formulaciones de nanocápsulas exhiben perfiles farmacocinéticos similares a aquellos obtenidos con el fármaco libre, minimizando los efectos tóxicos. Este efecto puede ser explicado por la mejor repartición de las nanopartículas a lo largo del tracto gastrointestinal, con lo que

las concentraciones locales serían mucho más bajas y se reducirían los efectos ulcerativos (271).

Tras inyección intramuscular, la protección frente a la toxicidad del fármaco parece ser dependiente de la naturaleza del aceite encapsulado en el núcleo de la nanocápsula. Así nanocapsulas conteniendo diclofenaco incorporado en benclbenzoato fueron tan tóxicas como el principio activo libre. Por el contrario, diclofenaco incorporado en nanocapsulas conteniendo Miglyol fueron capaces de reducir considerablemente el daño muscular causado por diclofenaco (272).

En el caso de tratamientos oculares, un importante incremento en la biodisponibilidad de la indometacina fue descrito al incorporar este fármaco en nanocápsulas de poli(épsilon-caprolactona) (273). Mediante microscopía confocal, se pudo demostrar que la formulación de nanocápsulas aumentaba la penetración del principio activo en el epitelio de la córnea por un mecanismo de endocitosis. Un trabajo similar utilizando ibuprofeno encapsulado en nanopartículas de Eudragit también demostró de forma concluyente que estos nanosistemas aumentaban la biodisponibilidad del antiinflamatorio y la eficacia de su actividad farmacológica [274]. Resultados similares se han obtenido recientemente con indometacina encapsulada en nanopartículas de quitosano (275).

Por otra parte, los tratamientos con antiinflamatorios también se ven dificultados por la pobre solubilidad de muchos fármacos, como ibuprofeno o naproxeno. La utilización de la nanotecnología permite aumentar de forma exponencial la superficie de intercambio entre la molécula activa y el medio biológico que la rodea. Esto favorece la disolución del fármaco, así como mejorar su llegada a diferentes lugares del organismo (276-278).

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA AL TRATAMIENTO DEL DOLOR

Recientemente, los liposomas han atraído la atención acerca de su potencial para el tratamiento y control del dolor, principalmente como vehículos capaces de sostener la liberación de compuestos anestésicos. Estos vehículos pueden ser utilizados por vía tópica (279, 280) o por inyección directa en el momento de la intervención quirúrgica (281, 282). Para anestesia local, la formulación de liposomas conteniendo anestésicos (lidocaína, tetracaina, etc...) se incorporó en una crema que fue aplicada sobre la superficie de la piel (283). La eficacia de este sistema fue evaluado en ensayos clínicos, concluyendo que los liposomas (tanto conteniendo tetracaina como lidocaína) fueron al menos tan

eficaces como las mezclas eutécticas de dichos anestésicos locales. Estas formulaciones permitían una administración eficaz y mostraban un inicio de la acción comparable a otras formulaciones en uso. Hoy en día, esta rutina parece ser de menor coste que las mezclas eutécticas de los anestésicos locales. Por otra parte, de acuerdo con otros ensayos clínicos más recientes, se ha sugerido que la formulación liposomal de lidocaína debería ser el nuevo tratamiento estándar para anestesia cutánea en niños (280).

Los liposomas también forman parte de las técnicas emergentes para analgesia post-operatoria en cirugía ortopédica (281, 282). Se han propuesto para la administración de morfina como una alternativa a los otros tratamientos convencional del dolor con este fármaco (281, 284). La formulación liposomal de morfina propuesta para el control post-operatorio del dolor es una formulación de liberación extendida de administración epidural. La tecnología de los liposomas consiste en partículas lipídicas con cámaras internas estrechamente empaquetadas y separadas por una membrana lipídica (Depodur[®], Skye Pharma Inc, Endo Pharmaceuticals USA). El resultado del ensayo clínico Fase III concluyó que cuando estos liposomas eran administrados en el espacio epidural, se obtenía hasta 48 h de alivio del dolor (282, 285).

Además de los liposomas, un estudio reciente ha demostrado la eficiencia de las nanocápsulas lipídicas sólidas con ibuprofeno para el tratamiento y control del dolor (286). Administradas a animales de laboratorio por la vía oral o por la ruta intravenosa, estas nanocápsulas inducían un alivio del dolor durante un periodo prolongado. Una ventaja de esta formulación es que ofrece un vehículo inyectable de ibuprofeno, lo cual es una alternativa interesante a las formulaciones convencionales con elevadas cantidades de tensioactivos o co-solventes.

En la misma línea, Betbeder y colaboradores (287) mostraron que puede ser posible administrar morfina al cerebro mediante la administración intranasal de SupraMolecular BioVector[®], gracias a la posible existencia de un camino directo entre la mucosa olfativa y el sistema nervioso central (288). De forma adicional, aunque los nanosistemas pueden ser optimizados en cuanto a su tamaño y potencial bioadhesivo para la administración intranasal de fármacos (223), el diseño de tecnología para poder administrar fármacos y atravesar la barrera hematoencefálica está menos avanzado (289, 290). Hasta el momento se han sugerido dos posibles tipos de nanosistemas: aquellos basados en el transporte mediado por receptor y los sistemas basados en el recubrimiento con tensioactivos. En el primer caso, se han propuesto la utilización del receptor de transferrina (291, 292) o el de insulina (290) para poder incrementar la eficacia de liberación de fármacos en el cerebro. En el segundo caso, se ha postulado que nano-

partículas recubiertas con diferentes tensioactivos (poloxamer o polisorbatos) serían endocitadas por el receptor de lipoproteínas de baja densidad de las células endoteliales de los capilares de la barrera hematoencefálica (293, 294).

CONCLUSIONES

La introducción de la nanotecnología en la farmacología ha revolucionado la administración de fármacos, permitiendo la aparición de nuevos tratamientos con mayor especificidad. En principio, la nanotecnología ha permitido aumentar el rendimiento biológico y farmacológico de diferentes principios activos y ofrecer alternativas interesantes para formular las nuevas moléculas originarias de la biotecnología. Todo ello ha permitido que, a nivel experimental, hayan sido desarrollado sistemas originales que prolonguen y mantengan la concentración del antiinfeccioso en el lugar exacto donde se localiza el microorganismo en el interior de las células del huésped. Igualmente, la nanotecnología ha permitido que se proponga la utilización de nuevas vías de administración, impensables con las formas farmacéuticas convencionales, para macromoléculas terapéuticas como los péptidos y proteínas de uso en enfermedades metabólicas. Por último, la nanotecnología ofrece una herramienta poderosa para el desarrollo de nuevos sistemas galénicos terapéuticos destinados al tratamiento de las enfermedades autoinmunes, la inflamación y el dolor.

Sin embargo, hasta el presente, no se ha conseguido todavía de forma notable una trasposición fluida y adecuada de los desarrollos y trabajos realizados en el plano experimental preclínico hacia la clínica. Es cierto que, en muchos aspectos, queda todavía una cantidad importante de trabajo experimental a realizar para acabar de comprender y elucidar el comportamiento de las nanopartículas en el organismo, así como, de las implicaciones toxicológicas de una administración crónica de tratamientos basados en estos vehículos.

Por todo ello, y teniendo en cuenta que la nanotecnología no es la panacea que permitirá resolver todos los problemas ligados a la administración de fármacos, esta nueva estrategia parece muy prometedora para mejorar a corto y medio plazo la terapéutica de algunas de los temas tratados en este capítulo.

Abreviaturas:

CA: ciclosporina A; **CMVH:** citomegalovirus humano; **sCT:** calcitonina sintética de salmón; **EA:** eficacia de asociación (%); **EAE:** encefalomiелitis autoinmune experi-

mental; **EE**: eficacia de encapsulación (%); **EF**: eficacia farmacológica; **FR**: biodisponibilidad relativa; **FAO**: oligómero de anhídrido fumárico; **Fe**: tetraóxido de hierro; **GEN**: gentamicina; **HP55**: phtalato de celulosa; **HPCD**: hidroxipropil-beta-ciclodextrina; **MAC**: complejo *Mycobacterium avium* - *Micobacterium intrcellulare*; **MW**: peso molecular; **NP**: nanopartículas; **OPM**: O-palmitoil-manano; **PAM**: p-aminofenil-manopiranosido; **PEC**: poli(épsilon-caprolactona); **PEG**: polietilenglicol; **PGA**: ácido poli(glutámico); **PIBCA**: poli(isobutil-2-cianoacrilato); **PLGA**: poli(láctico-co-glicólico); **PMAA**: ácido poli(metacrílico); **PNIPAA**: poly(N-isopropilacrilamida); **PS**: poli(estireno); **PVA**: poli(vinilamina); **SBECD**: sulfobutiléter-beta-ciclodextrina; **SD**: ratas Sprague-Dawley; **STZ**: estreptozotocina; **TAT**: péptido activador (NH₂-YGRKKRRQRRR); **TP5**: timopentina; **UFC**: unidad formadora de colonias; **VIH**: virus de inmunodeficiencia humana; **WGA**: lectina de germen de trigo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Heym, B. & Cole, S.T. (1997) Multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 8: 61-70.
- (2) Lboutounne, H., Chaulet, J.F., Ploton, C., Falson, F. & Piro, F. (2002) Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J. Control. Release*. 82: 319-334.
- (3) Beyth N., Yudovin-Farber, I., Bahir, R., Domb, A.J. & Weiss, E.I. (2006) Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials*. 27: 3995-4002.
- (4) Turos, E., Reddy, G.S., Greenhalgh, K., Ramaraju, P., Abeylath, S.C., Jang, S., Dickey, S. & Lim, D.V. (2007) Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: restoring the activity of beta-lactam antibiotics against MRSA. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 17: 3468-3472.
- (5) Beyth, N., Hourri-Haddad, Y., Baraness-Hadar, L., Yudovin-Farber, I., Domb, A.J. & Weiss, E.I. (2008) Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethylenimine nanoparticles. *Biomaterials*. 29: 4157-4163.
- (6) van den Broek, P.J. (1989) Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes. *Rev. Infect. Dis*. 11: 213-245.
- (7) Tulkens, P.M. (1991) Intracellular distribution and activity of antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 10: 100-106.
- (8) Kaprelyants, A.S., Gottschal, J.C. & Kell, D.B. (1993) Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*. 104: 271-286.

- (9) Gilbert, P., Collier, P.J. & Brown, M.R.W. (1990) Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1865-1868.
- (10) Poste, G. (1983) Liposomes targeting in vivo: problems and opportunities. *Biol. Cell.* 47: 19-39.
- (11) Grislain, L., Couvreur, P., Lenaerts, V., Roland, M., Deprez-Decampeneere, A. & Speiser, P. (1983) Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier. *Int. J. Pharm.* 15: 335-345.
- (12) Pinto-Alphandary, H., Andremnot, A. & Couvreur, P. (2000) Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 13: 155-168.
- (13) Couvreur, P. & Vauthier, C. (2006) Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharm. Res.* 23: 1417-1450.
- (14) Dupont, B. (2002) Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 31-36.
- (15) Ringden, O. (2002) Ten years' experience with liposomal amphotericin B in transplant recipients at Huddinge University Hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 51-55.
- (16) Croft, S.L. & Coombs, G.H. (2003) Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 19: 502-508.
- (17) Ng, A.W.K. & Wasan, K.M. (2003) Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. *J. Pharm. Sci.* 6: 67-83.
- (18) Gibbs, W.J., Drew, R.H. & Perfect, J.R. (2005) Liposomal amphotericin B: clinical experience and perspectives. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* 3: 167-181.
- (19) Owais, M., Varshney, G.C., Choudhury, A., Chandra, S. & Gupta, C.M. (1995) Chloroquine encapsulated in malaria-infected erythrocyte-specific antibody-bearing liposomes effectively controls chloroquine-resistant *Plasmodium berghei* infections in mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 180-184.
- (20) Graybill, J.R., Craven, P.C., Taylor, R.L., Williams, D.M. & Magee, W.E. (1982) Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin B. *J. Infect. Dis.* 145: 748-752.
- (21) Taylor, R.L., Williams, D.M., Craven, P.C., Graybill, J.R., Drutz, D.J. & Magee, W.E. (1982) Amphotericin B in liposomes: a novel therapy for histoplasmosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 125: 610-611.
- (22) Adler-Moore, J. & Proffitt, R.T. (2002) AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 21-30.

- (23) Chakraborty, K.K. & Naik S.R. (2003) Therapeutic and hemolytic evaluation of in-situ liposomal preparation containing amphotericin-beta complexed with different chemically modified beta-cyclodextrins. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6: 231-237.
- (24) van Etten, E.W., van Vianen, W., Hak, J. & Bakker-Woudenberg, I.A. (1988) Activity of liposomal amphotericin B with prolonged circulation in blood versus those of AmBisome and fungizone against intracellular *Candida albicans* in murine peritoneal macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2437-2439.
- (25) Vyas, S.P., Katare, Y.K., Mishra, V. & Sihorkar, V. (2000). Ligand directed macrophage targeting of amphotericin B loaded liposomes. *Int. J. Pharm.* 210: 1-14.
- (26) Espuelas, M.S., Legrand, P., Campanero, M.A., Appel, M., ChéÈron, M., Gama-zo, C., Barratt, G. & Irache, J.M. (2003) Polymeric carriers for amphotericin B: in vitro activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic Candidiasis in neutropenic mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 419-427.
- (27) Fukui, H., Koike, T., Nakagawa, T., Saheki, A., Sonoke, S., Tomii, Y. & Seki, J. (2003) Comparison of LNS-AmB, a novel low-dose formulation of amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS), with commercial lipid-based formulations. *Int. J. Pharm.* 267: 101-112.
- (28) Johnson, E.M., Ojwang, J.O., Szekely, A., Wallace, T.L. & Warnock, D.W. (1988) Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1412-1416.
- (29) Oakley, K.L., Moore, C.B. & Denning, D.W. (1999) Comparison of in vitro activity of liposomal nystatin against *Aspergillus* species with those of nystatin, amphotericin B (AB) deoxycholate, AB colloidal dispersion, liposomal AB, AB lipid complex, and itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1264-1266.
- (30) Wallace, T.L., Paetznick, V., Cossum, P.A., Lopez-Berestein, G., Rex, J.H. & Anaissie, E. (1997) Activity of liposomal nystatin against disseminated *Aspergillus fumigatus* infection in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2238-2243.
- (31) Nasti, T.H., Khan, M.A. & Owais, M. (2006) Enhanced efficacy of pH-sensitive nystatin liposomes against *Cryptococcus neoformans* in murine model. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 349-352.
- (32) Adler-Moore, J.P. & Proffitt, R.T. (1993) Development, characterization, efficacy and mode of action of Ambisome, a unilamellar liposome formulation of amphotericin B. *J. Liposome Res.* 3: 429-450.
- (33) Walsh, T.J., Goodman, J.L., Pappas, P., Bekersky, I., Buell, D.N., Roden, M., Barrett, J. & Anaissie, E.J. (2001) Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3487-3496.

- (34) Murray, H.W. (2004) Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* 2: 279-292.
- (35) Murray, H.W. (2004) Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71: 787-794.
- (36) Wingard, J.R., White, M.R., Anaissie, E., Raffalli, J., Goodman, J. & Arrieta, A. (2000) A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. *Clin. Infect. Dis.* 31: 1155-1163.
- (37) Fortún, J., Martín-Dávila, P., Moreno, S., Barcena, R., de Vicente, E. & Honrubia, A. (2003) Prevention of invasive fungal infections in liver transplant recipients: The role of prophylaxis with lipids formulations of amphotericin B in high risks patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 813-819.
- (38) Monforte, V., Gavaldá, J., Román, A., López, R., Bravo, C., Pou, I., Len, O., Morrell, F. & Pahissa, A. (2004) Pharmacokinetics and efficacy of nebulized AmBisome® (N-LAB) in lung transplantation (LT) ICAAC 2004.
- (39) Cagnoni, P.J., Walsh, T.J., Prendergast, M.M., Bodensteiner, D., Hiemenz, S., Greenberg, R.N., Arndt, C., Schuster, M., Seibel, N., Yeldandi, V. & Tong, K.B. (2000) Pharmacoeconomic analysis of liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistent febrile neutropenic patients. *J. Clin. Oncol.* 18: 2476-2483.
- (40) Larabi, M., Yardley, V., Loiseau, P.M., Appel, M., Legrand, P., Gulik, A., Boris, C., Croft, S. & Barratt, G. (2003) Toxicity and antileishmanial activity of a new stable lipid suspension of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3774-3779.
- (41) Espuelas, M.S., Legrand, P., Cheron, M., Barratt, G., Puisieux, F., Devissaguet, J.Ph. & Irache, J.M. (1988) Interaction of amphotericin B with polymeric colloids: 1. A spectroscopy study. *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* 11: 141-151.
- (42) Espuelas, M.S., Legrand, P., Cheron, M., Barratt, G., Puisieux, F., Renedo, M.J., Devissaguet, J.Ph. & Irache, J.M. (1988). Interaction of amphotericin B with polymeric colloids: 2. Effect of poloxamer on the adsorption of amphotericin B onto poly(e-caprolactone) nanospheres. *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* 11: 203-212.
- (43) Espuelas, S., Legrand, P., Loiseau, P.M., Bories, C., Barratt, G. & Irache, J.M. (2002) In vitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(e-caprolactone) nanospheres. *J. Drug Target.* 10: 593-599.
- (44) Espuelas, S., Legrand, P., Loiseau, P.M., Bories, C., Barratt, G. & Irache, J.M. (2000) In vitro reversion of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* by poloxamer 188. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2190-2192.

- (45) Gaspar, R., Preat, V., Opperdoes, F.R. & Rolland, M. (1992) Macrophage activation by polymeric nanoparticles of polyalkylcyanoacrylates: activity against intracellular *Leishmania donovani* associated with hydrogen peroxide production. *Pharm. Res.* 9: 782-787.
- (46) Mullen, A.B., Baillie, A.J. & Carter, K.C. (1998) Visceral leishmaniasis in the BALB/c mouse: a comparison of the efficacy of a nonionic surfactant formulation of sodium stibogluconate with those of three proprietary formulations of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2722-2725.
- (47) Carter, K.C., Mullen, A.B., Sundar, S. & Kenney, R.T. (2001) Efficacies of vesicular and free sodium stibogluconate formulations against clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3555-3559.
- (48) Medda, S., Mukhopadhyay, S. & Basu, M.K. (1999) Evaluation of the in-vivo activity and toxicity of amarogetin, an antileishmanial agent, in both liposomal and niosomal forms. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 791-794.
- (49) Sinha, J., Mukhopadhyay, S., Das, N. & Basu, M.K. (2000) Targeting of liposomal andrographolide to *L. donovani*-infected macrophages in vivo. *Drug Deliv.* 7: 209-213.
- (50) Fouarge, M., Dewulf, M., Couvreur, P., Rolland, M. & Vranckx, H. (1989) Development of dehydroemetine nanoparticles for the treatment of visceral leishmaniasis. *J. Microencapsul.* 6: 29-34.
- (51) Tyagi, R., Lala, S., Verma, A.K., Nandy, A.K., Mahato, S.B., Maitra, A. & Basu, M.K. (2005) Targeted delivery of arjunglucoside I using surface hydrophilic and hydrophobic nanocarriers to combat experimental leishmaniasis. *J. Drug Target.* 13: 161-171.
- (52) Mosqueira, V.C.F., Loiseau, P.M., Bories, C., Legrand, P., Devissaguet, J.P. & Barratt, G. (2004) Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1222-1228.
- (53) Bakker-Woudenberg, I.A. (2002) Long-circulating sterically stabilized liposomes as carriers of agents for treatment of infection or for imaging infectious foci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 19: 299-311.
- (54) Banerjee, G., Nandi, G., Mahato, S.B., Pakrashi, A. & Basu, M.K. (1996) Drug delivery system: targeting of pentamidines to specific sites using sugar grafted liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 145-150.
- (55) Agrawal, A.K. & Gupta, C.M. (2000) Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41: 135-146.
- (56) Gupta, C.M. & Haq, W. (2005) Tuftsin-bearing liposomes as antibiotic carriers in treatment of macrophage infections. *Methods Enzymol.* 391: 291-304.

- (57) Agrawal, A.K., Agrawal, A., Pal, A., Guru, P.Y. & Gupta, C.M. (2002) Superior chemotherapeutic efficacy of amphotericin B in tuftsin-bearing liposomes against *Leishmania donovani* infection in hamsters. *J. Drug Target.* 10: 41-45.
- (58) Alborzi, A., Pourabbas, B., Shahian, F., Mardaneh, J., Pouladfar, G.R. & Ziyaeyan, M. (2008). Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in the whole blood of asymptomatic individuals by PCR-ELISA and comparison with other infection markers in endemic areas, southern Iran. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79: 839-842.
- (59) Paul, M., Durand, R., Fessi, H., Rivollet, D., Houin, R., Astier, A. & Deniau, M. (1997). Activity of a new liposomal formulation of amphotericin B against two strains of *Leishmania infantum* in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1731-1734.
- (60) Gómez-Flores, R., Hsia, R., Tamez-Guerra, R. & Mehta, R.T. (1996) Enhanced intramacrophage activity of resorcinomycin A against *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex after liposome encapsulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2545-2549.
- (61) Mehta, R.T., Keyhani, A., McQueen, T.J., Rosenbaum, B., Rolston, K.V. & Tarrand, J.J. (1993) In vitro activities of free and liposomal drugs against *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex and *M. tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2584-2587.
- (62) Karlowsky, J.A. & Zhanel, G.G. (1992) Concepts on the use of liposomal antimicrobial agents: applications for aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 15: 654-667.
- (63) Donald, P.R., Sirgel, F.A., Venter, A., Smit, E., Parkin, D.P., van de Wal, B.W. & Mitchison, D.A. (2001) The early bactericidal activity of a low-clearance liposomal amikacin in pulmonary tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 877-880.
- (64) Fielding, R.M., Lewis, R.O. & Moon-McDermott, L. (1998) Altered tissue distribution and elimination of amikacin encapsulated in unilamellar, low clearance liposomes (Mikasome). *Pharm. Res.* 15: 1775-1781.
- (65) Fielding, R.M., Moon-McDermott, L., Lewis, R.O. & Horner, M.J. (1999) Pharmacokinetics and urinary excretion of amikacin in low-clearance unilamellar liposomes after a single or repeated intravenous administration in the rhesus monkey. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 503-509.
- (66) Cynamon, M.H., Swenson, C.E., Palmer, G.S. & Ginsberg, R.S. (1989) Liposome-encapsulated amikacin therapy of *Mycobacterium avium* complex in beige mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1179-1183.
- (67) Duzgunes, N., Perumal, V.K., Kesavalu, L., Goldstein, J.A., Debs, R.J. & Gangadharam, P.R.J. (1988) Enhanced effect of liposome encapsulated amikacin on *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex infection in beige mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1404-1411.

- (68) Bermudez, L.E.M., Yau-Young, A.O., Lin, J.P., Cogger, J. & Young, L.S. (1990) Treatment of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection of beige mice with liposome-encapsulated aminoglycosides. *J. Infect. Dis.* 161: 1262-1268.
- (69) Vladimirsky, M.A. & Ladigina, G.A. (1982) Antibacterial activity of liposome-entrapped streptomycin in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Bio-medicine*. 36: 375-377.
- (70) Duzgunes, N., Ashtekar, D.R., Flasher, D.L., Gori, N., Debs, R.J., Friend, D.S. & Gangadharam, P.R.J. (1991) Treatment of *Mycobacterium avium*-M. intracellulare complex infection in beige mice with free and liposome-encapsulated streptomycin: role of liposome type and duration of treatment. *J. Infect. Dis.* 164: 143-151
- (71) Tomioka, H., Saito, H., Sato, K. & Yoneyama, T. (1991) Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated kanamycin against *Mycobacterium intracellulare* infection induced in mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144: 575-579.
- (72) Gangadharam, P.R.J., Ashtekar, D.A., Ghori, N., Goldstein, J.A., Debs, R.J. & Duzgunes, N. (1991) Chemotherapeutic potential of free and liposome-encapsulated streptomycin against experimental *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 425-429.
- (73) Swenson, C.E., Popescu, M.C. & Ginsberg, R.S. (1988) Preparation and use of liposomes in the treatment of microbial infections. *Crit. Rev. Microbiol.* 15: S1-S31.
- (74) Onyeji, C.O., Nightingale, C.H., Nicolau, D.P. & Quintiliani, R. (1994) Efficacies of liposome-encapsulated clarithromycin and ofloxacin against *Mycobacterium avium*-M. intracellulare complex in human macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 523-527.
- (75) Duzgunes, N., Flasher, D., Reddy, M.V., Luna-Herrera, J. & Gangadharam, P.R. (1996) Treatment of intracellular *Mycobacterium avium* complex infection by free and liposome-encapsulated sparfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2618-2621.
- (76) Deol, P., Khuller, G.K. & Joshi, K. (1997) Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1211-1214.
- (77) Yanagihara, K. (2002) Design of anti-bacterial drug and anti-mycobacterial drug for drug delivery system. *Curr. Pharm. Des.* 8: 475-482.
- (78) Domurado, D., Balazuc, A.M., Lagranderie, M., Pescher, P., Chavarot, P., Roseeuw, E., Coessens, V., Stern, S., Schacht, E. & Marchal, G. (2005) Targeted norfloxacin is active in vivo against persistent *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Control. Release.* 10: 343-345.

- (79) Zhang, Y. (2005) The magic bullets and tuberculosis targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 529-564.
- (80) Vyas, S.P., Kannan, M.E., Jain, S., Mishra, V. & Singh, P. (2004) Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages. *Int. J. Pharm.* 269: 37-49.
- (81) Pandey, R. & Khuller, G.K. (2005) Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. *J. Antimicrob. Chemother.* 55: 430-435.
- (82) Lahnstein, K., Schmehl, T., Rüs, U., Rieger, M., Seeger, W. & Gessler, T. (2008) Pulmonary absorption of aerosolized fluorescent markers in the isolated rabbit lung. *Int. J. Pharm.* 351: 158-164.
- (83) Fattal, E., Rojas, J., Youssef, M., Couvreur, P. & Andremont, A. (1991) Liposome-entrapped ampicillin in the treatment of experimental murine listeriosis and salmonellosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 770-772.
- (84) Fattal, E., Youssef, M., Couvreur, P. & Andremont, A. (1989) Treatment of experimental salmonellosis in mice with ampicillin-bound nanoparticles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1540-1543.
- (85) Fattal, E., Balland, O., Alphan, H., Pecquet, S., Puisieux, F., Couvreur, P. & Andremont, A. (1993) Colloidal carriers of antibiotics as an alternative approach for the treatment of intracellular infections. In D. Raoult (ed.), *Antimicrobial Agents and Intracellular Pathogens*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 63-72.
- (86) Legrand, P., Barratt, G., Mosqueira, V., Fessi, H. & Devissaguet, J.P. (1999) Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. *Sci. Tech. Pharm.* 9: 411-418.
- (87) Tadakuma, T., Ikewaki, N., Yasuda, T., Tsutsumi, M., Saito, S. & Saito, K. (1985) Treatment of experimental salmonellosis in mice with streptomycin entrapped in liposomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 28-32.
- (88) Fierer, J., Hatlen, L., Lin, J.P., Estrella, D., Mihalko, P. & Yau-Young, A. (1990) Successful treatment using gentamicin liposomes of *Salmonella dublin* infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 343-348.
- (89) Swenson, C.E., Stewart, K.A., Hammett, J.L., Fitzsimmons, W.E. & Ginsberg, R.S. (1990) Pharmacokinetics and in vivo activity of liposome-encapsulated gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 235-240.
- (90) Magallanes, M., Dijkstra, J. & Fierer, J. (1993) Liposome-incorporated ciprofloxacin in treatment of murine salmonellosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2293-2297.
- (91) Webb, M.S., Boman, N.L., Wiseman, D.J., Saxon, D., Sutton, K., Wong, K.F., Logan, P. & Hope, M.J. (1998) Antibacterial efficacy against an in vivo *Salmonella typhimurium* infection model and pharmacokinetics of a liposomal ciprofloxacin formulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 45-52.

- (92) Bakker-Woudenberg, I.A., Lokerse, A.F., van Den Berg, J.C., Roedink, F.H. & Michel, M.F. (1985) Free versus liposome-entrapped ampicillin in treatment of *Listeria monocytogenes* in normal and athymic (nude) mice. *J. Inf. Dis.* 151: 917-924.
- (93) Bakker-Woudenberg, I.A., Lokerse, A.F. & Roerdink, F.H. (1998) Effect of lipid composition on activity of liposome-entrapped ampicillin against intracellular *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1560-1564.
- (94) Yousseff, M., Fattal, E., Alonso, M.J., Roblot-Treupel, L., Sauzieres, J., Tancrede, C., Omnes, A., Couvreur, P. & Andreumont, A. (1998) Effectiveness of nanoparticle-bound ampicillin in the treatment of *Listeria monocytogenes* infection in athymic nude mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1204-1207.
- (95) Page-Clisson, M.E., Pinto-Alphandary, H., Chachaty, E., Couvreur, P. & Andreumont, A. (1998) Drug targeting by polyalkylcyanoacrylate is not efficient against persistent *Salmonella*. *Pharm. Res.* 15: 542-547.
- (96) Fountain, M.W., Weiss, S.K., Fountain, A.G., Shen, A. & Lenk, R.P. (1985) Treatment of *Brucella canis* and *Brucella abortus* in vitro and in vivo by stable plurilamellar vesicle-encapsulated aminoglycosides. *J. Infect. Dis.* 152: 529-535.
- (97) Hernandez-Caselles, T., Vera, A., Crespo, F., Villalain, J. & Gomez-Fernandez, J.C. (1989) Treatment of *Brucella melitensis* infection in mice by use of liposome-encapsulated gentamicin. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1486-1488.
- (98) Vitas, A.I., Díláz, R. & Gamazo, C. (1996) Effect of composition and method of preparation of liposomes on their stability and interaction with murine monocytes infected with *Brucella abortus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:146-151.
- (99) Vitas, A.I., Diaz, R. & Gamazo, C. (1997) Protective effect of liposomal gentamicin against systemic acute murine brucellosis. *Chemotherapy.* 43: 204-210.
- (100) Prior, S., Gamazo, C., Irache, J.M., Merkle, H.P. & Gander, B. (2000) Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating *Brucella* infections. *Int. J. Pharm.* 196: 115-125.
- (101) Prior, S., Gander, B., Blarer, N., Merkle, H.P., Subira, M.L., Irache, J.M. & Gamazo, C. (2002) In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15: 197-207.
- (102) Prior, S., Gander, B., Lecaroz, C., Irache, J.M. & Gamazo, C. (2004) Gentamicin-loaded microspheres for reducing the intracellular *Brucella abortus* load in infected monocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 981-988.
- (103) Lecaroz, C., Blanco-Prieto, M.J., Burell, M.A. & Gamazo, C. (2006) Intracellular killing of *Brucella melitensis* in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 549-556.

- (104) Kumar, P.V., Asthana, A., Dutta, T. & Jain, N.K. (2006) Intracellular macrophage uptake of rifampicin loaded mannosylated dendrimers. *J. Drug Target.* 14: 546-556.
- (105) Chowdhury, M.K.R., Goswami, R. & Chakrabarti, P. (1981) Liposome-entrapped penicillins and growth inhibition in some penicillin-resistant bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 51: 223-227.
- (106) Mimoso, I.M., Francisco, A.P.G. & Cruz, M.E.M. (1997) Liposomal formulation of netilmicin. *Int. J. Pharm.* 147:109-117.
- (107) Leitzke S., Bucke W., Borner K., Muller R., Hahn H., Ehlers S. (1998). Rationale for and efficacy of prolonged-interval treatment using liposome-encapsulated amikacin in experimental *Mycobacterium avium* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:459-461.
- (108) Umamaheshwari, R.B., Ramteke, S. & Jain, N.K. (2004). Anti-*Helicobacter pylori* effect of mucoadhesive nanoparticles bearing amoxicillin in experimental gerbils model. *AAPS PharmSciTech.* 5:e32.
- (109) Jikia, D., Chkhaidze, N., Imedashvili, E., Mgaloblishvili, I., Tsitlanadze G., Katsarava, R., Morris, J.G. & Sulakvelidze, A. (2005) The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infection local radiation injuries caused by exposure to Sr 90. *Clin. Exp. Dermatol.* 30: 23-26.
- (110) Lecaroz, M.C., Blanco-Prieto, M.J., Campanero, M.A., Salman, H. & Gamazo, C. (2007) Poly(D,L-lactide-co-glycolide) particles containing gentamicin: pharmacokinetics and pharmacodynamics in *Brucella melitensis*-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1185-1190.
- (111) Jeong, Y.I., Na, H.S., Seo, D.H., Kim, D.G., Lee, H.C., Jang, M.K., Na, S.K., Roh, S.H., Kim, S.I. & Nah, J.W. (2008) Ciprofloxacin-encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *Int. J. Pharm.* 352: 317-323.
- (112) Liu, L., Venkatraman, S.S., Yang, Y.Y., Guo, K., Lu, J., He, B., Mólchala, S. & Kan, L. (2008) Polymeric micelles anchored with TAT for delivery of antibiotics across the blood-brain barrier. *Biopolymers.* 90: 617-623.
- (113) Price, C.I., Horton, J.W. & Baxter, C.R. (1994) Liposome encapsulation: a method for enhancing the effectiveness of local antibiotics. *Surgery.* 115: 480-487.
- (114) Castro, G.A. & Ferreira, L.A. (2008) Novel vesicular and particulate drug delivery systems for topical treatment of acne. *Expert Opin. Drug Deliv.* 5: 665-679.
- (115) Losa, C., Calvo, P., Castro, E., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1991) Improvement of ocular penetration of amikacin sulphate by association to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* 43: 548-552.

- (116) Frucht-Perry, J., Assil, K.K., Ziegler, E., Douglas, H., Brown, S.I., Schanzlin, D.J. & Weinreb, R.N. (1992) Fibrin-enmeshed tobramycin liposomes: single application topical therapy of *Pseudomonas keratitis*. *Cornea*. 11: 393-397.
- (117) Cavalli, R., Gasco, M.R., Chetoni, P., Burgalassi, S. & Saettone, M.F. (2002) Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharm.* 238: 241-245.
- (118) Motwani, S.K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F.J. & Khar, R.K. (2008) Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and in vitro characterisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68: 513-525.
- (119) Rauschmann, M.A., Wichelhous, T.A., Stirnal, V., Dingeldein, E., Zichner, L., Schnettle, R. & Alt, V. (2005) Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials*. 26: 2677-2684.
- (120) Putnam, D.A. (1996) Antisense strategies and therapeutic applications. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 52: 151-160.
- (121) Duzgunes, N., Pretzer, E., Simoes, S., Slepshkin, V., Konopka, K., Flasher, D. & Pedroso de Lima, M.C. (1999) Liposome-mediated delivery of antiviral agents to human immunodeficiency virus infected cells. *Mol. Membr. Biol.* 16: 111-118.
- (122) Martinand-Mari, C., Lebleu, B. & Robbins, I. (2003) Oligonucleotide- based strategies to inhibit human hepatitis C virus. *Oligonucleotides*. 13: 348-539.
- (123) Maggon, K. & Barik, S. (2004) New drugs and treatment for respiratory syncytial virus. *Rev. Med. Virol.* 14: 149-168.
- (124) Irache, J.M., Merodio, M., Arnedo, A., Camapanero, M.A., Mirchahi, M. & Espuelas, S. (2005) Albumin nanoparticles for the intravitreal delivery of anticytomegaloviral drugs. *Mini Rev. Med. Chem.* 5: 293-305.
- (125) Markosian, M. & Hyde, R.M. (2005) Oligonucleotides and polyribonucleotides: a review of antiviral activity. *Antivir. Chem. Chemother.* 16: 91-102.
- (126) Boeckh, M. & Boivin, G. (1998) Quantitation of cytomegalovirus: methodological aspects and clinical applications. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 533-554.
- (127) Grundy, J.E., Lui, S.F., Super, M., Berry, N.J., Sweny, P., Fernando, O.N., Moorhead, J. & Griffiths, P.D. (1988) Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus. *Lancet*. 2(8603): 132-135.
- (128) Detrick, B., Nagineni, C.N., Grillone, L.R., Anderson, K.P., Henry, S.P. & Hocks, J.J. (2001) Inhibition of human cytomegalovirus replication in a human re-

- tinal epithelial cell model by antisense oligonucleotides. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 163-169.
- (129) Meyers, J.D., Ljungman, P. & Fisher, L.D. (1990) Cytomegalovirus excretion as predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J. Infect. Dis.* 162: 373-380.
- (130) Giannavola, C., Bucolo, C., Maltese, A., Paolino, D., Vandelli, M.A., Puglisi, G., Lee, V.H. & Fresta, M. (2003) Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-d,l-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm Res.* 20: 584-590.
- (131) Fresta, M., Fontana, G., Bucolo, C., Cavallo, G., Giammona, G. & Puglisi, G. (2001) Ocular tolerability and in vivo bioavailability of poly(ethylene glycol) (PEG)-coated polyethyl-2-cyanoacrylate nanosphere-encapsulated acyclovir. *J. Pharm. Sci.* 9: 288-297.
- (132) Merodio, M., Arnedo, A., Renedo, M.J. & Irache, J.M. (2001) Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12: 251-259.
- (133) Hodge, W.G., Lalonde, R.G., Sampalis, J. & Deschenes, J. (1996) Once-weekly intraocular injections of ganciclovir for maintenance therapy of cytomegalovirus retinitis: clinical and ocular outcome. *J. Infect. Dis.* 174: 393-396.
- (134) Cochereau-Massin, I., Lehoang, P., Lautier-Frau, M., Zazoun, L., Marcel, P., Robinet, M., Matheron, S., Katlama, C., Gharakhanian, S. & Rozenbaum, W. (1991) Efficacy and tolerance of intravitreal ganciclovir in cytomegalovirus retinitis in AIDS. *Ophthalmology.* 98: 1348-1355.
- (135) Arnedo, A., Espuelas, S. & Irache, J.M. (2002) Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int. J. Pharm.* 244: 59-72.
- (136) Merodio, M., Espuelas, M.S., Mirshahi, M., Arnedo, A. & Irache, J.M. (2002) Efficacy of ganciclovir-loaded nanoparticles in human cytomegalovirus (HCMV) infected cells. *J. Drug Target.* 10: 231-238.
- (137) Mutwiri, G.W., Nichano, A.K., Babiuk, S. & Babiuk, L.A. (2004) Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J. Control. Release.* 97: 1-17.
- (138) Arnedo, A., Irache, J.M., Merodio, M. & Espuelas, S. (2004) Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide. *J. Control. Release.* 94: 217-227.
- (139) Merodio, M., Irache, J.M., Valamanesh, F. & Mirshahi, M. (2002) Ocular disposition and tolerance of ganciclovir-loaded albumin nanoparticles after intravitreal injection in rats. *Biomaterials.* 23: 1587-1594.

- (140) Bochot, A., Fattal, E., Boutet, V., Deverre, J.R., Jeanny, J.C., Chacun, H. & Couvreur, P. (2002) Intravitreal delivery of oligonucleotides by sterically stabilized liposomes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 253-259.
- (141) Fatal, E., De Rosa, G. & Bochot, A. (2004) Gel and solid matrix systems for the controlled delivery of drug carrier-associated nucleic acids. *Int. J. Pharm.* 277: 25-30.
- (142) Hu, J., Liu, H. & Wang, L. (2000) Enhanced delivery of AZT to macrophages via acetylated LDL. *J. Control. Release.* 69: 327-335.
- (143) Fraternali, A., Casabianca, A., Orlandi, C., Cerasi, A., Chiarantini, L., Brandi, G. & Magnani, M. (2002) Macrophage protection by addition of glutathione (GSH)-loaded erythrocytes to AZT and DDI in a murine AIDS model. *Antiviral Res.* 56: 263-272.
- (144) Von Briesen, H., Ramge, P. & Krueter, J. (2000) Controlled release of antiretroviral drugs. *AIDS Rev.* 2: 31-38.
- (145) Löbenberg, R., Araujo, L. & Krueter, J. (1997) Body distribution of azidothymidine bound to nanoparticles after oral administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 44: 127-132
- (146) Lanao, J.M., Briones, E. & Colino, C.I. (2007) Recent advances in delivery systems for anti-HIV1 therapy. *J. Drug Target.* 15: 21-36.
- (147) Katragadda, A., Bridgman, R. & Betageri, G. (2000) Effect of liposome composition and cholesterol on the cellular uptake of stavudine by human monocyte/macrophages. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 5: 483-493.
- (148) Oussoren, C., Magnani, M., Fraternali, A., Casabianca, A., Chiarantini, L., Ingebrigsten, R., Underberg, W.J. & Storm, G. (1999) Liposomes as carriers of the antiretroviral agent dideoxycytidine-5'-triphosphate. *Int. J. Pharm.* 180: 261-270.
- (149) Bender, A.R., von Briesen, H., Kreuter, J., Duncan, I.B. & Rubsamen-Waigmann, H. (1996) Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1467-1471.
- (150) Raulin, J. (2002) Human immunodeficiency virus and host cell lipids. Interesting pathways in research for a new HIV therapy. *Prog. Lipid. Res.* 41: 27-65.
- (151) Duzgunes, N., Simoes, S., Slepshkin, V., Pretzer, E., De Clerq, E., Antao, V.P., Collins, M.L. & Pedroso de Lima, M.C. (2001) Enhanced inhibition of HIV-1 replication in macrophages by antisense oligonucleotides, ribozymes and acyclic nucleoside phosphonate analogs delivered in pH sensitive liposomes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 20: 515-523.

- (152) Berton, M., Turelli, P., Trono, D., Stein, C.A., Allemann, E. & Gurny, R. (2001) Inhibition of HIV-1 in cell culture by oligonucleotide-loaded nanoparticles. *Pharm. Res.* 18: 1096-1101.
- (153) Lambert, G., Fattal, E. & Couvreur, P. (2001) Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 99-112.
- (154) Hu, Q., Shew, C.R., Bally, M.B. & Madden, T.D. (2001) Programmable fusogenic vesicles for intracellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides: enhanced cellular uptake and biological effects. *Biochim. Biophys. Acta.* 1514: 1-13.
- (155) Kunizawa, J., Masuda, T., Katayama, K., Yoshikawa, T., Tsutsumi, Y., Akashi, M., Mayumi, T. & Nakagawa, S. (2005) Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release. *J. Control. Release.* 105: 344-353.
- (156) Dembri, A., Montisci, M.J., Gantier, J.C., Chacun, H. & Ponchel, G. (2001) Targeting of 30-azido 30-deoxythymidine (AZT)-loaded poly(isohexylcyanoacrylate) nanospheres to the gastrointestinal mucosa and associated lymphoid tissues. *Pharm. Res.* 18: 467-473.
- (157) Boudad, H., Legrand, P., Appel, M., Coconier, M.H. & Ponchel, G. (2001) Formulation and cytotoxicity of combined cyclodextrin poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles on Caco-2 cells monolayers intended for oral administration of saquinavir. *STP Pharm. Sci.* 11: 369-375.
- (158) De Jaeghere, F., Allemann, E., Kubel, F., Galli, B., Cozens, R., Doelker, E. & Gurny, R. (2000) Oral bioavailability of a poorly water soluble HIV-1 protease inhibitor incorporated into pH-sensitive particles: effect of the particle size and nutritional state. *J. Control. Release.* 68: 291-298.
- (159) Hugle, T. & Cerny, A. (2003) Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis. *Crit. Rev. Med. Virol.* 13: 361-371.
- (160) Sookoian, S.C. (2003) New therapies on the horizon for hepatitis C. *Ann. Hepatol.* 2: 164-170.
- (161) Papatheodoridis, G.V. & Cholongitas, E. (2004) Chronic hepatitis C and no response to antiviral therapy: potential current and future therapeutic options. *J. Viral Hepatitis.* 11: 287-296.
- (162) Shiffman, M.L. (2004) Retreatment of patients who do not respond to initial therapy for chronic hepatitis C. *Clevel. Clin. J. Med.* 71: S13-S16.
- (163) Segura, S., Gamazo, C., Irache, J.M. & Espuelas, S. (2007) Gamma interferon loaded onto albumin nanoparticles: in vitro and in vivo activities against *Bruceella abortus*. *Antimicrob. Agent Chemother.* 51: 1310-1314

- (164) World Health Organisation. Diabetes, <http://www.who.int/>, (acceso el 26/12/2008).
- (165) Tanaka, S.I., Yamakawa, T., Aoki, I., Okuda, K. & Mobbs, C. (2004) Daily nasal inoculation with the insulin gene ameliorates diabetes in mice. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 63: 1-9.
- (166) Gomez-Perez, F. & Rull, J.A. (2005) Insulin therapy: current alternatives. *Arch. Med. Res.* 36: 258-72.
- (167) Muñoz-Torres, M., Alonso, G. & Raya, M.P. (2004) Calcitonin therapy in osteoporosis. *Treat. Endocrinol.* 3: 117-132.
- (168) Cao, Y. & Lam, L. (2002) Projections for insulin treatment for diabetics. *Drugs Today.* 38: 419-427.
- (169) Prego, C., Garcia, M., Torres, D. & Alonso, M.L. (2005) Transmucosal macromolecular drug delivery. *J. Control. Release.* 101: 151-162.
- (170) Saffran, M., Pansky, B., Budd, G. & Williams, F.E. (1997) Insulin and the gastrointestinal tract. *J. Control. Release.* 46: 89-98.
- (171) Dapergolas, G. & Gregoriadis, G. (1976) Hypoglycemic effect of liposome-entrapped insulin administered intragastrically into rats. *Lancet.* 2: 824-827.
- (172) Patel, H.M. & Ryman, B.E. (1976) Oral administration of insulin by encapsulation in liposomes. *FEBS Lett.* 62: 60-63.
- (173) Couvreur, P., Lenaerts, V., Kante, B., Roland, M. & Speiser, P. (1980) Oral and parenteral administration of insulin associated to hydrolysable nanoparticles. *Acta Pharm. Tech.* 26: 220-222.
- (174) Kisel, M.A., Kulik, L.N., Tsybovsky, I.S., Vlasov, A.P., Vorobyov, M.S., Kholodava, E.A. & Zabarovskaya, Z.V. (2001) Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *Int. J. Pharm.* 216: 105-114.
- (175) Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P. & Vauthier, C. (2002) Nanocapsule technology: a review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 19: 99-134.
- (176) Katayama, K., Kato, Y., Onishi, H., Nagai, T. & Machida, Y. (2003) Double liposomes: hypoglycemic effects of liposomal insulin on normal rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29: 725-731.
- (177) Csaba, N., Gonzalez, L., Sanchez, A. & Alonso, M.J. (2004) Design and characterisation of new nanoparticulate polymer blends for drug delivery. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15: 1137-1151.
- (178) Simon, M., Wittmar, M., Kissel, T. & Linn, T. (2005) Insulin containing nano-complexes formed by self-assembly from biodegradable amine-modified

- poly(vinyl alcohol)-graftpoly(L-lactide): bioavailability and nasal tolerability in rats. *Pharm. Res.* 22: 1879-1886.
- (179) Mao, S., Germerhaus, O., Fischer, D., Linn, T., Schnepf, R. & Kissel, T. (2005) Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer-insulin nano-complexes by epithelial cells. *Pharm. Res.* 22: 2058-2068.
- (180) Garcia-Fuentes, M., Torres, D & Alonso, M.J. (2005) New surface modified lipid nanoparticles as delivery vehicle for salmon calcitonin. *Int. J. Pharm.* 296: 122-132.
- (181) Arbos, P., Campanero, M.A., Arangoa, M.A. & Irache, J.M. (2004) Nanoparticles with specific bioadhesive properties to circumvent the pre-systemic degradation of fluorinated pyrimidines. *J. Control. Release.* 96: 55-65.
- (182) Salman, H. Gamazo, C., Campanero, M.A. & Irache, J.M. (2006) Bioadhesive mannosylated nanoparticles for oral drug delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 3203-3209.
- (183) Pinto-Alphandary, H., Aboubakar, M., Jaillard, D., Couvreur, P. & Vauthier, C. (2003) Visualization of insulin-loaded nanocapsules: In vitro and in vivo studies after oral administration to rats. *Pharm. Res.* 20: 1071-1084.
- (184) Florence, A.T., Hillery, A.M., Hussain, N. & Jani, P.U. (1995) Factors affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles: histological and analytical evidence. *J. Drug Target.* 3: 65-70.
- (185) Yin, Y., Chen, D., Qiao, M., Wei, X. & Hu, H. (2007) Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution. *J. Control. Release.* 123: 27-38.
- (186) Woitiski, C.B., Carvalho, R.A., Ribeiro, A.J., Neufeld, R.J. & Veiga, F. (2008) Strategies toward the improved oral delivery of insulin nanoparticles via gastrointestinal uptake and translocation. *BioDrugs.* 22: 223-237.
- (187) Zhang, N., Ping, Q.N., Huang, G.H. & Xu, W.F. (2005) Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *Int. J. Pharm.* 294: 247-259.
- (188) Centelles, M., Qiang, C., Campanero, M.A. & Irache, J.M. (2008) New methodologies to characterize the effectiveness of the gene transfer mediated by DNA-chitosan nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* On line early 08/10/2008.
- (189) Ferraris, R.P., Villenas, S.A. & Diamond, J. (1992) Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. *Am. J. Physiol.* 262: 1047-1059.
- (190) Sayani, A.P. & Chien, Y.W. (1996) Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 13: 85-184.

- (191) Foster, K.J., Griffith, A.H., Dewbury, K., Price, C.P. & Wright, R. (1980) Liver disease in patients with diabetes mellitus. *Postgrad. Med. J.* 56: 767-772.
- (192) Zhu, Y.Y., Zhang, Y., Hong, X.L., Dong, J.F. & Xia, B.L. (2006) Influence of Emulsifiers on the Synthesis of Insulin-loaded Nanocapsules in Double Emulsion. *Chin. J. Chem.* 24: 109-113.
- (193) Lin, Y.H., Mi, F.L., Chen, C.T., Chang, W.C., Peng, S.F., Liang, H.F. & Sung, H.W. (2007) Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules.* 8: 146-152.
- (194) Damge, C., Michel, C., Aprahamian, M. & Couvreur, P. (1988) New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes.* 37: 246-251.
- (195) Damge, C., Vranckx, H., Balschmidt, P. & Couvreur, P. (1997) Poly(alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. *J. Pharm. Sci.* 86: 1403-1409.
- (196) Mesiha, M.S., Sidhom, M.B. & Fasipe, B. (2005) Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 288: 289-293.
- (197) Hou, Z.Q., Zhang, Z.X., Xu, Z.H., Zhang, H., Tong, Z.F. & Leng, Y.S. (2005) The stability of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles in an oily medium and the hypoglycemic effect in diabetic rats. *Yao Xue Xue Bao.* 40: 57-64.
- (198) Carino, G.P., Jacob, J. S. & Mathiowitz, E. (2000) Nanosphere based oral insulin delivery. *J. Control. Release.* 65: 261-269.
- (199) Cui, F., Shi, K., Zhang, L., Tao, A. & Kawashima, Y. (2006) Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J. Control. Release.* 114: 242-250.
- (200) Cui, F.D., Tao, A.J., Cun, D.M., Zhang, L.Q. & Shi, K. (2007) Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. *J. Pharm. Sci.* 96: 421-427.
- (201) Ma, Z., Lim, T.M. & Lim, L.Y. (2005) Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. *Int. J. Pharm.* 293: 271-280.
- (202) Pan, Y., Li, Y.J., Zhao, H.Y., Zheng, J.M., Xu, H., Wei, G., Hao, J.S. & Cui, F.D. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 249: 139-147.
- (203) Pan, Y., Zheng, J.M., Zhao, H.Y., Li, Y.J., Xu, H. & Wei, G. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 249: 139-147.

- (204) Zhang, N., Ping, Q., Huang, G., Xu, W., Chen, Y. & Han, X. (2006) Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *Int. J. Pharm.* 327: 153-159.
- (205) Chalasani, K.B., Russell-Jones, G.J., Yandrapu, S.K., Diwan, P.V. & Jain, S.J. (2007). A novel vitamin B12-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin. *J. Control. Release.* 117: 421-429.
- (206) Damge, C., Maincent, P. & Ubrich, N. (2007) Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J. Control. Release.* 117: 163-170.
- (207) Damge, C., Michel, C., Aprahamian, M., Couvreur, P. & Devissaguet, J.P. (1990) Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. *J. Control. Release.* 13: 233-239.
- (208) Damge, C., Hillaire-Buys, D., Puech, R., Hoeltzel, A., Michel, C. & Ribes, G. (1995) Effects of orally administered insulin nanocapsules in normal and diabetic dogs. *Diabetes Nutr. Metab.* 8: 3-9.
- (209) Watnasirichaikul, S., Rades, T., Tucker, I.G. & Davies, N.M. (2002) In-vitro release and oral bioactivity of insulin in diabetic rats using nanocapsules dispersed in biocompatible microemulsion. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 473-480.
- (210) Sai, P., Damage, C., Rivereau, A.S., Hoeltzel, A. & Gouin, E. (1996) Prophylactic oral administration of metabolically active insulin entrapped in isobutylycyanoacrylate nanocapsules reduces the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Autoimmun.* 9: 713-722.
- (211) Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H. & Couvreur, P. (2003) Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 519-548.
- (212) Aboubakar, M., Puisieux, F., Couvreur, P. & Vauthier, C. (1999) Physico-chemical characterization of insulin-loaded poly(isobutylycyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization. *Int. J. Pharm.* 183: 63-66.
- (213) Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K. & Nagai, T. (1999) Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25: 471-476.
- (214) Santos, C.A., Freedman, B.D., Leach, K.J., Press, D.L., Scarpulla, M. & Mathiowitz, E. (1999) Poly(fumaric-co-sebacic anhydride) A degradation study as evaluated by FTIR, DSC, GPC and X-ray diffraction. *J. Control. Release.* 60: 11-22.
- (215) Thanou, M., Verhoef, J.C. & Junginger, H.E. (2001) Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52: 117-126.

- (216) Anónimo. (2008) Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 15: 584-602.
- (217) Sociedad Española de Reumatología. <http://www.ser.es/> (acceso el 8/01/2009)
- (218) San, Yoo H. & Park, G.T. (2004) Biodegradable nanoparticles containing protein-fatty acid complexes for oral delivery of salmon calcitonin. *J. Pharm. Sci.* 93: 488-495.
- (219) Sakuma, S., Suzuki, N., Kikuchi, H., Hiwatari, K., Arikawa, K., Kishida, A. & Akashi, M. (1997) Oral peptide delivery using nanoparticles composed of novel graft copolymers having hydrophobic backbone and hydrophilic branches. *Int. J. Pharm.* 149: 93-106.
- (220) Sakuma, S., Suzuki, N., Kikuchi, H., Hiwatari, K., Arikawa, K., Kishida, A. & Akashi, M. (1997) Absorption enhancement of orally administered salmon calcitonin by polystyrene nanoparticles having poly(N-isopropylacrylamide) branches on their surfaces. *Int. J. Pharm.* 158: 69-78.
- (221) Sakuma, S., Suzuki, N., Sudo, R., Hiwatari, K., Kishida, A. & Akashi, M. (2002) Optimized chemical structure of nanoparticles as carriers for oral delivery of salmon calcitonin. *Int. J. Pharm.* 239: 185-195.
- (222) Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H. & Kuno, Y. (2000) Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin. *Pharm. Dev. Technol.* 5: 77-85.
- (223) Prego, C., García, M., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) Transmucosal macromolecular drug delivery. *J. Control. Release.* 101: 151-162.
- (224) Garcia-Fuentes, M., Prego, C., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25: 133-143.
- (225) Prego, C., Torres, D., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoa, E. & Alonso, M.J. (2006) Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery. Effect of chitosan pegylation degree. *J. Control. Release.* 111: 299-308.
- (226) Lowe, P.J. & Tample, C.S. (1994) Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 46:547-552.
- (227) Vranckx, H., Demoustier, M. & Deleers, M. (1996) A new nanocapsule formulation with hydrophilic core: Application to the oral administration of salmon calcitonin in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42: 345-347.

- (228) Sinko, P.J., Lee, Y.H., Makhey, V., Leesman, G.D., Sutyak, J.P., Yu, H., Perry, B., Smith, C.L., Hu, P., Wagner, E.J., Falzone, L.M., McWhorter, L.T., Gilligan, J.P. & Stern, W. (1999) Biopharmaceutical approaches for developing and assessing oral peptide delivery strategies and systems: in vitro permeability and in vivo oral absorption of salmon calcitonin. *Pharm. Res.* 16: 527-533.
- (229) Hastewell, J., Lynch, S., Williamson, I., Fox, R. & Mackay, M. (1992) Absorption of human calcitonin across the rat colon in vivo. *Clin Sci (Lond)*. 82: 589-594.
- (230) Takeuchi, H., Matsui, Y., Yamamoto, H. & Kawashima, Y. (2003) Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. *J. Control. Release.* 86: 235-242.
- (231) Behrens, I., Vila Pena, A.I., Alonso, M.J. & Kissel, T. (2002) Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm. Res.* 19: 1185-1193.
- (232) Prego, C., Fabre, M., Torres, D. & Alonso, M.J. (2006) Efficacy and mechanisms of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. *Pharm. Res.* 23: 549-556.
- (233) Fernandez-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-Lopez, C., Vila-Lato, J.L. & Alonso, M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 16: 1576-1581.
- (234) Vila, A., Gill, H., McCallion, O. & Alonso, M.J. (2004) Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *J. Control. Release.* 98: 231-244.
- (235) Simon, M., Wittmar, M., Kissel, T. & Linn, T. (2005) Insulin containing nanocomplexes formed by self-assembly from biodegradable amine-modified poly(vinyl alcohol)-graftpoly(L-lactide): bioavailability and nasal tolerability in rats. *Pharm. Res.* 22: 1879-1886.
- (236) Tanaka, S.I., Yamakawa, T., Aoki, I., Okuda, K. & Mobbs, C. (2004) Daily nasal inoculation with the insulin gene ameliorates diabetes in mice. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 63: 1-9.
- (237) Vermehren, C., Frokjaer, S., Aurstad, T. & Hansen, J. (2006) Lung surfactant as a drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 307: 89-92.
- (238) Li, Y. & Mitra, A.K. (1996) Effects of phospholipid chain length, concentration, charge and vesicle size on pulmonary insulin absorption. *Pharm. Res.* 13: 76-79.
- (239) Ford, J., Woolfe, J. & Florence, A.T. (1999) Nanospheres of cyclosporin A: poor oral absorption in dogs. *Int. J. Pharm.* 183: 3-6.

- (240) Liu, H., Wang, Y. & Li, S. (2007) Advanced delivery of ciclosporin A: present state and perspective. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 4: 349-358.
- (241) Czogalla, A. (2009) Oral cyclosporine A - the current picture of its liposomal and other delivery systems. *Cell Mol. Biol. Lett.* 14: 139-152.
- (242) Molpeceres, J., Chacón, M., Guzmán, M., Berges, L. & Aberturas, M.R. (1999) A polycaprolactone nanoparticle formulation of cyclosporin-A improves the prediction of area under the curve using a limited sampling strategy. *Int. J. Pharm.* 187: 101-113.
- (243) Molpeceres, J., Chacón, M., Guzmán, M. & Aberturas, M.R. (2000) Dependency of cyclosporine tissue distribution and metabolism on the age and gender of rats after a single intravenous dose. *Int. J. Pharm.* 197: 129-141.
- (244) Varela, M.C., Guzmán, M., Molpeceres, J., Aberturas, M.R., Rodríguez-Puyol, D. & Rodríguez-Puyol, M. (2001) Cyclosporine-loaded polycaprolactone nanoparticles: immunosuppression and nephrotoxicity in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12: 471-478.
- (245) Goldstein, G., Scheid, M.P., Boyse, E.A., Schlesinger, D.H. & Wauwe, V.J. (1979) A synthetic entapeptide with biological activity characteristic of the thymic hormone thymopoietin. *Science.* 204: 1309-1310.
- (246) Colle, R., Ceschia, T., Colatritto, A. & Biffoni, F. (1988) Use of thymopentin in autoimmune hemolytic anemia due to chronic lymphocytic leukemia. *Curr. Ther. Res.* 44: 1045-1049.
- (247) Bernengo, M.G., Doveil, C.G., Meregalli, M., Appino, A. & Massobrio, R. (1988) Immunomodulation and Sezary syndrome: experience with thymopentin (TP-5). *Br. J. Dermatol.* 119: 207-221.
- (248) Faist, M., Ertel, W., Salmen, B., Weiler, A., Ressel, C., Bolla, K. & Heberer, G. (1988) The immune-enhancing effect of perioperative thymopentin administration in elder patients undergoing major surgery. *Arch. Surg.* 123: 1449-1453.
- (249) Yin, Y., Chen, D., Qiao, M., Lu, Z. & Hu, H. (2006) Preparation and evaluation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin. *J. Control. Release.* 116: 337-345.
- (250) Yuan, X.J., Zhang, Z.R., Song, Q.G. & He, Q. (2006) Research on thymopentin loaded oral N-trimethyl chitosan nanoparticles. *Arch. Pharm. Res.* 29: 795-799.
- (251) Zheng, A.P., Wang, J.C., Lu, W.L., Zhang, X., Zhang, H., Wang, X.Q. & Zhang, Q. (2006) Thymopentin-loaded pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral administration: preparation, characterization, and pharmacodynamics. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 2936-2944.

- (252) Lallemand, F., O. Felt-Baeyens, O., K. Bessenghir, K., F. Behar-Cohen, F. & Gurny, R. (2003) Cyclosporin A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56: 307-318.
- (253) Bertelmann, E. & Pleyer, U. (2004) Immunomodulatory therapy in ophthalmology – is there a place for topical application? *Ophthalmologica.* 218: 359-367.
- (254) Yenice, I., Mocan, M.C., Palaska, E., Bochot, A., Bilensoy, E., Vural, I., IrkeçÁ, M. & Hincal, A.A. (2008) Hyaluronic acid coated poly-epsilon-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. *Exp. Eye Res.* 87: 162-167.
- (255) Gokce, E.H., Sandri, G., Bonferoni, M.C., Rossi, S., Ferrari, F., Güneri, T. & Caramella, C. (2008) Cyclosporine A loaded SLNs: evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. *Int. J. Pharm.* 364: 76-86.
- (256) Milani, J.K., Pleyer, U., Dukes, A., Chou, H.J., Lutz, S., Ruckert, D., Schmidt, K.H. & Mondino, B.J. (1993) Prolongation of corneal allograft survival with liposome-encapsulated cyclosporin in the rat eye. *Ophthalmology.* 100: 890-896.
- (257) De Campos, A.M., Sanchez, A. & Alonso, M.J. (2001) Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* 224: 159-168.
- (258) Short, B.G. (2008) Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. *Toxicol Pathol.* 36: 49-62.
- (259) De Kozac, Y., Andrieux, K., Villarroya, H., Klein, C., Thillaye-Goldenberg, B., Naud, M.C., Garcia, E. & Couvreur, P. (2004) Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur. J. Immunol.* 34: 3702-3712.
- (260) Schmidt, J., Metselaar, J.M., Wauben, M.H., Toyka, K.V., Storm, G. & Gold, R. (2003) Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain* 126: 1895-1904.
- (261) Merodio, M., Irache, J. M., Eclancher, F., Mirshahi, M. & Villarroya, H. (2000) Distribution of albumin nanoparticles in animals induced with the experimental allergic encephalomyelitis. *J. Drug Target.* 8: 289-303.
- (262) Cornford, E.M. & Hyman, S. (1999) Blood-brain barrier permeability to small and large molecules. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 36: 145-163.
- (263) Bodor, N. & Buchwald, P. (1999) Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36: 229-254.
- (264) Rousseau, V., Denizot, B., Le Jeune, J.J. & Jallet, P. (1999) Early detection of liposome brain localization in rat experimental allergic encephalomyelitis. *Exp. Brain Res.* 125: 255-264.

- (265) Villarroya, H., Marie, Y., Ouallet, J.C., Le Saux, F., Tchelingierian, J.L. & Baumann, N. (1997) Expression of TNF alpha in central neurons of Lewis rat spinal cord after EAE induction. *J. Neurosci. Res.* 49: 592-599.
- (266) Calvo, P., Gouritin, B., Villarroya, H., Eclancher, F., Giannavola, C., Klein, C., Andreux, J.P. & Couvreur, P. (2002) Quantification and localization of PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles in brain and spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 15: 1317-1326.
- (267) Ammoury, N., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Dubrasquet, M. & Benita, S. (1991) Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(D,L-lactide) and poly(isobutyl-cyanoacrylate) nanocapsules in rats. *Pharm. Res.* 8: 101-105.
- (268) Fawaz, F., Bonini, F., Guyot, M., Laguëny, A.M., Fessi, H. & Devissaguet, J.P. (1993) Influence of poly(DL-lactide) nanocapsules on the biliary clearance and enterohepatic circulation of indomethacin in the rabbit. *Pharm. Res.* 10: 750-756.
- (269) Cattani, V.B., Pohlmann, A.R. & Dalla Costa, T. (2008) Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules. *Int. J. Pharm.* 363: 214-216.
- (270) Bernardi, A., Frozza, R.L., Jäger, E., Figueiró, F., Bavaresco, L., Salbego, C., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. & Battastini, A.M. (2008) Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: an in vitro study. *Eur. J. Pharmacol.* 586: 24-34.
- (271) Guterres, S.S., Fessi, H., Barratt, G., Puisieux, F. & Devissaguet, J.P. (1995) Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing nonsteroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharm. Res.* 12: 1545-1547.
- (272) Guterres, S.S., Fessi, H., Barratt, G., Puisieux, F. & Devissaguet, J.P. (2000) Poly(rac-lactide) nanocapsules containing diclofenac: protection against muscular damage in rats. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11: 1347-1355.
- (273) Calvo, P., Alonso, M.J., Vila-Jato, J.L. & Robinson, R. (1996) Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 1147-1152.
- (274) Bucolo, C., Maltese, A., Plugisi, G. & Pignatello, R. (2002) Enhanced ocular anti-inflammatory activity of ibuprofen carried by an Eudragit RS100 nanoparticle suspension. *Ophthalmic. Res.* 34: 319-323.
- (275) Badawi, A.A., El-Laithy, H.M., El Qidra, R.K., El Mofty, H. & El dally M. (2008) Chitosan based nanocarriers for indomethacin ocular delivery. *Arch. Pharm Res.* 31: 1040-1049.

- (276) Jiang, B., Hu, L., Gao, C. & Shen, J. (2005) Ibuprofen-loaded nanoparticles prepared by a co-precipitation method and their release properties. *Int. J. Pharm.* 304: 220-230.
- (277) Heffernan, M.J. & Murthy, N. (2005) Polyketal nanoparticles: a new pH-sensitive biodegradable drug delivery vehicle. *Bioconjug. Chem.* 16: 1340-1342.
- (278) Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G. & Cooper, E.R. (2003) Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 18: 113-120.
- (279) Eidelman, A., Weiss, J.M., Lau, J. & Carr, D.B. (2005) Topical anaesthetics for dermal instrumentation: a systematic review of randomized, controlled trials. *Ann. Emerg. Med.* 46: 343-351.
- (280) Taddio, A., Soin, H.K., Schuh, S., Koren, G. & Scolnik, D. (2005) Liposomal lidocaine to improve procedural success rates and reduce procedural pain among children: a randomized controlled trial. *CMAJ.* 172: 1691-1695.
- (281) Viscusi, E.R. (2004) Emerging techniques in the treatment of postoperative pain. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 61: S11-S14.
- (282) Viscusi, E.R., Martin, G., Hartrick, C.T., Singla, N. & Manvelian, G. (2005) The EREM Study group Forty-eight hours of postoperative pain relief after total hip arthroplasty with a novel, extended-release epidural morphine formulation. *Anesthesiology.* 102: 1014-1022.
- (283) Grant, S.A. (2002) The holy grail: long acting local anaesthetics and liposomes. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 16: 345-352.
- (284) Mantripragada, S. (2002) A lipid based depot (DepoFoam technology) for sustained release drug delivery. *Prog. Lipid Res.* 41: 392-406.
- (285) Vaughan, C. (2008) Development and implementation of a process to ensure safe use of morphine sulfate extended-release liposome injection. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 65: 458-456.
- (286) Lamprecht, A., Saumet, J.L., Roux, J. & Benoit, J.P. (2004) Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int. J. Pharm.* 278: 407-414.
- (287) Betbeder, D., Sperandio, S., Latapie, J.P., De Nadai, J., Etienn, A., Zajac, J.M. & Frances, B. (2000) Biovector nanoparticles improve antinociceptive efficacy of nasal morphine. *Pharm. Res.* 17: 743-748.
- (288) Wolka, A.M., Huber, J.D. & Davis, T.P. (2003) Pain and the blood-brain barrier: obstacles to drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55: 987-1006.
- (289) Pardridge, W.M. (1999) Vector-mediated drug delivery to the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36: 299-321.

- (290) Pardridge, W.M. (2007) Drug targeting to the brain. *Pharm Res.* 24: 1733-1744.
- (291) Olivie,r J.C. (2005) Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx.* 2: 108-119.
- (292) Patel, M.M., Goyal, B.R., Bhadada, S.V., Bhatt, J.S. & Amin, A.F. (2009). Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. *CNS Drugs.* 23: 35-58.
- (293) Kreuter, J. (2004) Influence of the surface properties on nanoparticle mediated transport of drugs to the brain. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4: 484-488.
- (294) Kreuter, J. & Gelperina, S. (2008) Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tu-mori.* 94: 271-277.



Socios de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia a quien expresamos nuestra sincera gratitud por su mecenazgo:

CAJA MADRID

Farmaindustria

Roche Farma

Laboratorios Janssen-Cilag
Alcaliber S.A.
Almirall, S.A.
Bristol-Myers Squibb, S.L.
Grupo Ferrer Internacional
Laboratorios Esteve
Laboratorios MSD
Laboratorios Rovi
Novartis Farmacéutica
Tedec-Meiji Farma S.A.
Sanofi-Aventis
Laboratorios Menarini

Aragofar

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos
Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid

Colegios Oficiales de Farmacéuticos de: A Coruña, Alicante, Badajoz, Barcelona, Bizkaia, Burgos, Cáceres, Cádiz, Ciudad Real, Girona, Palencia, Principado de Asturias, Santa Cruz de Tenerife, Tarragona, Toledo y Zaragoza.