



ACADEMIA DE FARMACIA DE LA COMUNITAT VALENCIANA

LIPOSOMAS EN LAS TERAPIAS DEL SIGLO XXI

Discurso de presentación del Académico Numerario

Ilmo. Sr. Dr. Agustín Llopis González

Discurso de recepción como Académica correspondiente

Dr. D. Octavio Díez Sales

Leídos en Valencia el día 11 de noviembre de 2019

DISCURSO DE PRESENTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO

ILMO. SR. DR. AGUSTIN LLOPIS GONZÁLEZ

Ilma Sra. Presidenta e Ilmos. Sres. Presidentes de los Colegios
Oficiales de Farmacéuticos de la Comunidad Valenciana

Excmos e Ilmos. Señoras y Señores Académicos

Excmas. e Ilmas Autoridades

Compañeros y amigos

Señoras y Señores

La recepción de un nuevo académico es siempre un acto de especial relieve y de los más importantes entre los muchos que desarrolla la Academia de Farmacia de la Comunidad Valenciana. Es costumbre de las Academias y Reales Academias que el discurso de ingreso de los nuevos Académicos Correspondientes lo lleve a cabo un Académico de Número, y en este sentido quiero que mis primeras sean de agradecimiento a los Excmos e Ilmos. Señores Académicos de la Academia de

Farmacia de la Comunidad Valenciana por brindarme la oportunidad de proceder en este sentido con el nuevo académico don Octavio Díez Sales.

Nació en Xativa (Valencia), llega con 16 años a Valencia y cursa los estudios de la Licenciatura de Ciencias Biológicas en la Universidad de Valencia, que termina con la tercera promoción (1974 – 1975). En 1975 inicia los estudios de la Licenciatura de Farmacia en la Universidad de Granada y finaliza dichos estudios con el Grado de Licenciado en Farmacia (modalidad examen) en el curso 1978 -1979.

En 1989 defiende la Tesis Doctoral “Aportación a los estudios sobre absorción percutánea: métodos in vitro”, dirigida por la Prof. Dra Marina Herráez Domínguez y Prof. Dr. Jose M^a Plá Delfina, en la Universidad de Valencia.

Adquiere el Título de Farmacéutico Especialista en Análisis Clínicos en 1989 por el Ministerio De Educación y Ciencia.

Inicia la actividad docente en Centros de Enseñanza Secundaria (MEC) como Profesor Númerario de Enseñanza Secundaria, con el número uno de la oposición libre (1982). Adquiere la condición de Catedrático de Enseñanza Secundaria en 1989, título obtenido por concurso – oposición (Consellería de Cultura, Educación y Ciencia, Generalidad Valenciana).

La actividad docente universitaria comienza en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia (Universidad de Valencia), como Profesor Asociado, desde el curso 1991 – 1992 hasta el curso 1996 – 1997. Asimismo, participa como Profesor Invitado en diferentes actividades docentes de dicho departamento durante los cursos 1997- 1998 y 1998 – 1999. En la actualidad es Profesor Titular, desde el año 2003, en el Departamento de Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Parasitología de La Facultad de Farmacia (Universidad de Valencia).

Durante este periodo ha participado en numero proyectos de investigación financiados, contratado como técnico superior de investigación (2002) en Hospital Universitario Dr. Peset (Coselleria de Sanidad). Ha dirigido diez tesis de licenciatura y ocho tesis doctorales, una de ellas de ámbito Europeo. Asimismo, ha participado en numerosos

congresos nacionales e internacionales (comunicaciones y ponencias) y publicado más de cien trabajos de ámbito internacional.

También ha publicado capítulos de libros, con dos monografías sobre Formas de administración sobre la piel y Formas Farmacéuticas rectales y vaginales (1993), un capítulo sobre métodos alternativos al uso de animales de laboratorio (Analysis of Cosmetic Products, Elsevier 2007 y 2018), publicaciones en libros de congresos (10), un libro manual de cosmetología, cuadernos formativos para la elaboración de productos cosméticos y un CD-ROM sobre un laboratorio virtual para la elaboración de productos cosméticos.

En la actualidad participa como co-director en una Master de Industria cosmética (5ª Edición) desde el año 2015, con una gran aceptación por parte del alumnado y en un Master de Productos Sanitarios (1ª Edición) que se inicia en el presente curso. El objetivo es abrir puertas y facilitar a los alumnos de Farmacia la incorporación al mundo profesional.

En el ámbito profesional farmacéutico, en 1979 obtuvo una beca de Galénica y Análisis Clínicos en el MICOV de Valencia y, posteriormente, estuvo al cargo de la Unión de Técnicas Españolas Farmacéuticas (UTEF) como director, durante 1981 a 1982. Del año 1978 a 1983 dirige un laboratorio de análisis clínicos. Más tarde también participó como director de un laboratorio de cosmética, plantas medicinales y dietética (1993 – 1997).

Por otra parte, ha desarrollado su actividad profesional en dos oficinas de farmacia como Farmacéutico Titular en dos periodos separados por el tiempo, durante el año 1980 hasta 1982, y desde 2008 al 2018.

Por último, me gustaría resaltar la importancia que tiene la incorporación a la Academia de Farmacia de profesionales con un perfil amplio investigador, académico y profesional en el campo de la Farmacia. Es muy importante que la profesión farmacéutica recupere el prestigio que se merece.

Dr. D. Octavio Díez Sales

LIPOSOMAS EN LAS TERAPIAS DEL SIGLO XXI

Ilma Sra. Presidenta e Ilmos. Sres. Presidentes de los Colegios
Oficiales de Farmacéuticos de la Comunidad Valenciana

Excmos e Ilmos. Señoras y Señores Académicos

Excmas e Ilmas. Autoridades

Compañeros y amigos

Señoras y Señores

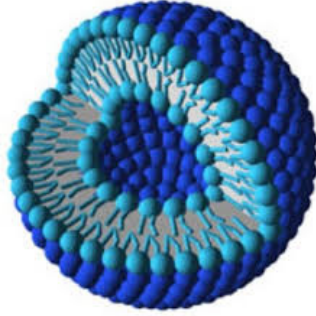
En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a todos los miembros de la Academia de Farmacia de la Comunidad Valenciana y en especial a los académicos que han avalado mi candidatura, el Excelentísimo Presidente y Profesor Dr. D. Fernando Rius Alarcó y los ilustrísimos doctores y profesores D. Agustín LLópez Morales y Jose Bautista Peris Gisbert.

Me considero una persona muy afortunada al haber conocido en el MICO de Valencia a tantos compañeros que siempre me han ayu-

dado como el “*Xiquet de Agna*” (Javier) y el “*gato Felix*” (José Antonio), pero tengo que hacer un especial hincapié en el ilustrísimo Fernando Rius Alarcó con el que me he identificado como modelo para impartir la docencia. Siempre ha sido un excelente profesor y amigo.

En estos momentos, no puedo olvidarme de Marina Herráez que dirigió mi tesis y con la que siempre estaré en deuda. Ella fue la que me inculco el virus de la investigación. Tampoco me puedo olvidar de mis compañeros de fatiga el Dr. José E. Peris, gran investigador y profesor, y la Dra. Nacher, sin ellos no podría llevar a cabo mi trabajo diario. Y por supuesto mi reconocimiento a otros miembros del departamento como Teresa, Virginia, Mati, etc., que permiten que sea fácil la docencia y la investigación.

Finalmente, mi agradecimiento a mi madre Consuelo, mi tía María Rosa y a M^a Angela que siempre me han mostrado su apoyo incondicional.



LIPOSOMAS EN LAS TERAPIAS DEL SIGLO XXI

ÍNDICE:

1. Introducción y antecedentes	13
2. Metodología	22
2.1. Preparación de liposomas	22
2.2. Caracterización de liposomas	23
2.2.1. Tamaño y distribución de tamaños	24
2.2.2. Potencial Z	26
2.2.3. Eficacia de encapsulación	26
2.2.4. Absorción transdérmica	28
2.2.5. Ensayos de liberación “in vitro”	33
3. Aplicaciones	34
3.1. Teràpia anticancerosa	35
3.2. Colitis ulcerosa	39
3.3. Alteraciones de la piel (psoriasis y dermatitis atópicas)	42
4. Futuro de los Liposomas	45
5 Bibliografía	49

1.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los liposomas fueron descubiertos en los años 60 al observar que algunos lípidos forman estructuras membranosas cuando están en un medio acuoso. Inicialmente se denominaron “Bangosomas”, después de que Alec Douglas Bangham (1921-2010), un biofísico inglés, los descubriera (Hernández León A, 2017).

Estas estructuras vesiculares altamente organizadas están constituidas por lamelas o bicapas lipídicas concéntricas que encierran un interior acuoso (Figura 1).

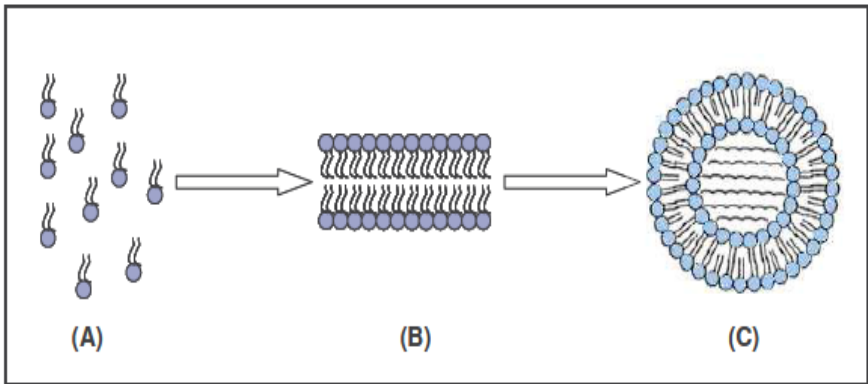


Figura 1. Esquema del fenómeno de autoensamblamiento que sufren los fosfolípidos para formar liposomas: A) Moléculas de fosfolípido, B) Bicapa de fosfolípidos, C) Liposoma.

Para su elaboración se utilizan fosfolípidos con o sin la incorporación de colesterol, tensioactivos, sondas fluorescentes u otros materiales. Incorporados en la bicapa fosfolipídica con el fin de modificar alguna de las propiedades de las vesículas: carga superficial, la

permeabilidad de la membrana o estabilidad de los lípidos en la bicapa. Las vesículas formadas por fosfolípidos son usadas como modelo para estudiar el comportamiento de membranas biológicas (Figura 2).

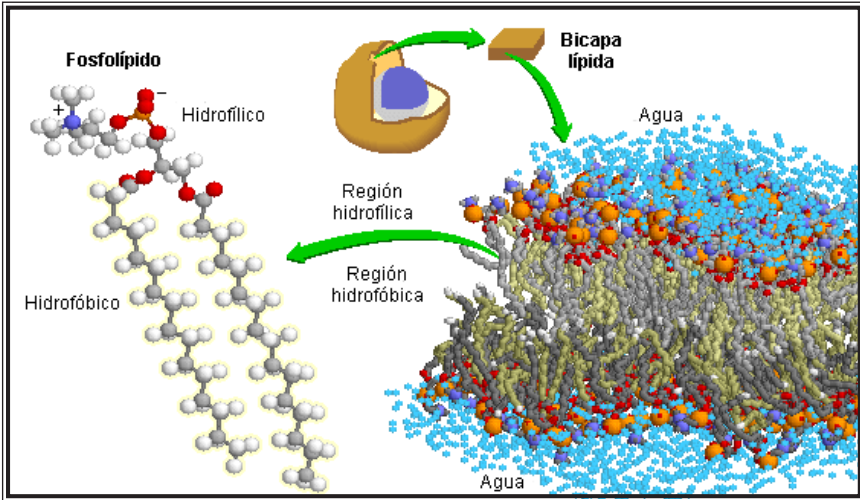


Figura 2. Estructura de un fosfolípido y disposición a nivel de las membranas celulares. (<http://www.mapb49.galeon.com/biomol2/pbospb0.html>)

En los **fosfolípidos**, los dos ácidos grasos son hidrofóbicos o insolubles en agua. Pero el grupo fosfato es hidrofílico o soluble en el agua. Cuando los fosfolípidos se mezclan con el agua, espontáneamente se organizan para formar configuraciones de baja energía. Esto significa que las regiones hidrofílicas interactúan con el agua, mientras que las regiones hidrofóbicas la rechazan.

Todas las membranas biológicas contienen bicapas lipídicas y proteínas, lo cual produce membranas con estabilidad y funciones especializadas (Figura 2).

Los fosfolípidos que constituyen los liposomas pueden tener cadenas hidrocarbúricas saturadas o insaturadas, y muestran diferentes grados de rigidez y permeabilidad. De modo que, las composiciones que contienen una mayor proporción de fosfolípidos saturados son más rígidas e impermeables, en comparación con bicapas constituidas por

fosfolípidos insaturados (Yareli Rojas-Aguirre et al, 2016). Los fosfolípidos utilizados (Figura 3) en la elaboración de liposomas son, comúnmente, fosfatidilcolinas naturales o sintéticas (*dimiristoil*, *dipalmitoil* o *dieste-roilfosfatidilcolinas*). Asimismo, se pueden utilizar fosfolípidos aniónicos (*ácido fosfatídico* o *fosfatidilserina*) o catiónicos (*estearilamina*), lo que confiere a los liposomas una carga neta superficial determinada, produciéndose, así, distintos fenómenos electrostáticos entre las diferentes láminas que constituyen el liposoma. A su vez, es frecuente incluir colesterol en la formulación de dichos sistemas, ya que induce una formación más ordenada de las cadenas lipídicas y, por tanto, un aumento de su estabilidad.

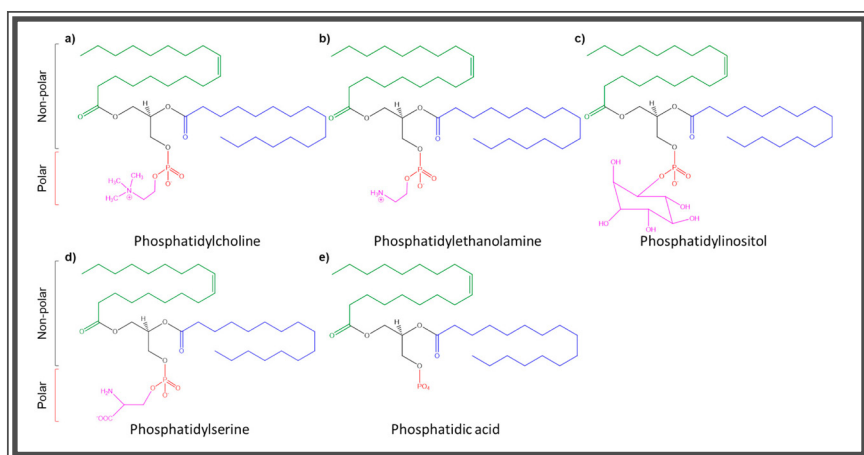


Figura 3. Estructura molecular de algunos de los fosfolípidos utilizados.

Desde el punto de vista del comportamiento térmico (Figura 4) los fosfolípidos pueden encontrarse en forma gel (alta temperatura) o en forma cristalina (baja temperatura). La temperatura que marca el paso de una fase a otra se denomina temperatura de transición, “ T_m ”, y es característica de cada lípido puesto que depende directamente del tamaño de la/s cadena/s, presencia de insaturaciones y de la naturaleza de la cabeza polar. Así, cuanto mayor es la longitud de la cadena hidrocarbonada, mayor es la energía necesaria para realizar el cambio de fase, y por tanto la temperatura de transición es mayor. Por otra parte, la presencia de dobles enlaces, en la cadena, aumenta la dificultad de empaquetamiento y disminuye, por tanto, la temperatura de transición.

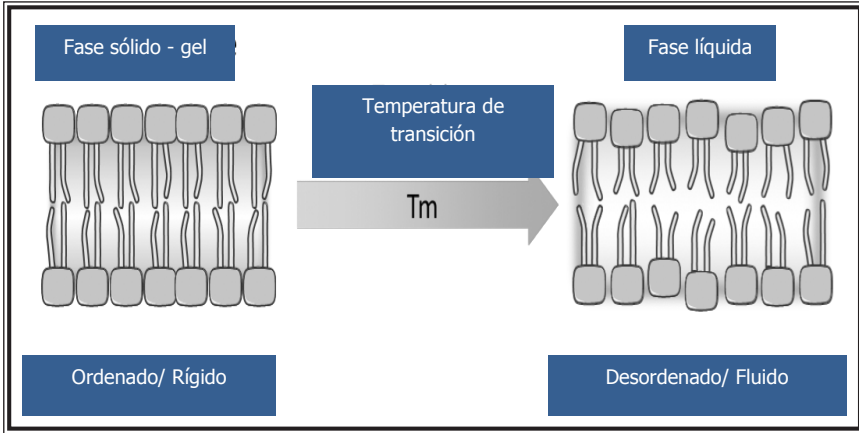


Figura 4. Representación esquemática de la temperatura de transición de la fase lipídica

Existen diferentes tipos de vesículas (Figura 5):

- **Liposomas multilamelares (MLV):**

Compuestos por múltiples capas concéntricas de fosfolípidos, presentan un tamaño elevado, entre 0.5 μm y 5 μm . Este tipo de vesículas se pueden obtener mediante el método de hidratación; de manera que, una cierta cantidad de lípidos se disuelven en la cantidad apropiada de cloroformo, para ser, posteriormente, evaporado en un rotavapor. Se forma así una fina capa lipídica a la que se le añade un volumen determinado de una solución acuosa. La hidratación se lleva a cabo mediante agitación manual o

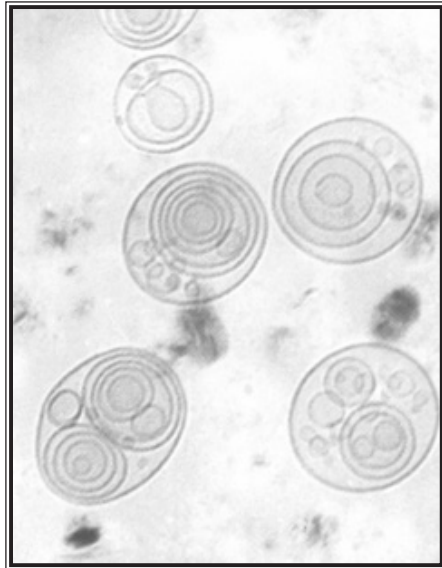


Figura 5. Liposomas al microscopio electrónico (<https://www.skinident.es/es/dr-baumann-skinide-conocimientos-relevantes/temas-de-interes/informacion-sobre-liposomas/>)

mediante homoginizador o agitador mecánico. La mayoría de vesículas que se forman constituyen, principalmente, liposomas multilamelares de tamaño elevado (micrómetros) y una distribución de tamaños muy heterogénea.

También podemos encontrar liposomas con una única bicapa fosfolipídica (UV). Se pueden distinguir diferentes tipos en función de su tamaño (*Figura 6*):

- **Liposomas unilamelares pequeños (SUV):** presentan un tamaño del orden de 25-100 nm de diámetro. Se obtienen a partir de vesículas MLV mediante sonicación con ultrasonidos o extrusión. Su estabilidad es pequeña, al igual que su capacidad de encapsulación.
- **Liposomas unilamelares grandes (LUV / GUV):** tienen un tamaño comprendido entre 200 nm y 1µm. Se obtienen mediante el método de evaporación en fase reversa, para ello, se elimina el disolvente, de una disolución de fosfolípidos en cloroformo, mediante un rotavapor. A La mezcla lípidica resultante se le añade una cantidad conocida de agua y, posteriormente, se elimina todo el solvente orgánico. Se traba-

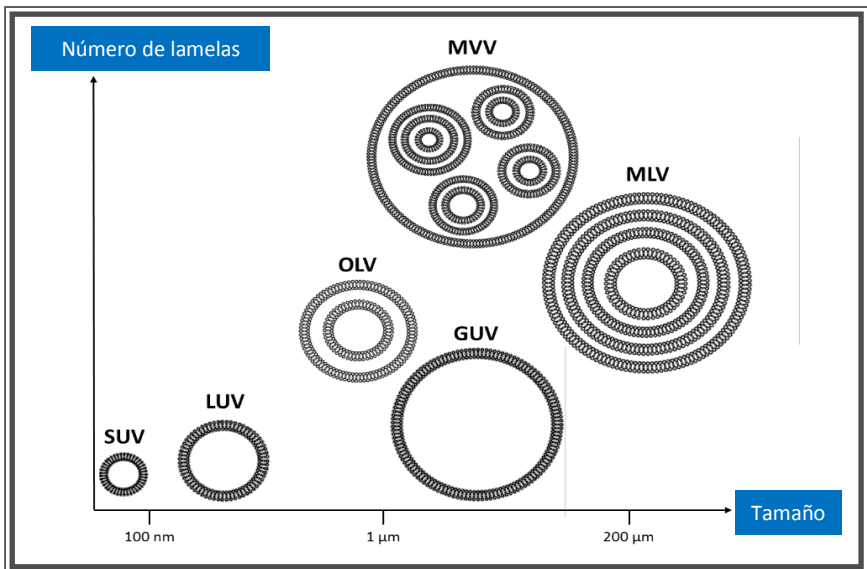


Figura 6. Esquema de los diferentes tipos de liposomas.

ja en un ambiente de presión reducida, formándose así un gel viscoso, que vuelve a someterse a rotación para formar así estos tipos de vesículas. Se caracterizan por poseer una buena capacidad de encapsulación, en particular, si se trata de sustancias hidrosolubles, ya que poseen un gran compartimento acuoso.

En los años 70, *Gregoriadis* inició el estudio sobre el potencial que presentan estos como sistemas de liberación de fármacos o de otras moléculas bioactivas. La ampliación de las aplicaciones en las que se utilizan liposomas es debido a que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también las de carácter anfílico (*Michael M., 1993*).

Tradicionalmente, los sistemas de liberación se han desarrollado para modificar la vía de administración, mejorar la biodisponibilidad y cambiar el perfil de liberación o mejorar una formulación.

La particular estructura de los liposomas ofrece la posibilidad de transportar y proteger compuestos hidrofílicos y lipofílicos en el compartimento acuoso o en el interior de las bicapas fosfolipídicas, respectivamente. Además, presentan una naturaleza no inmunogénica y ciertas características de biocompatibilidad y biodegradabilidad en diferentes disciplinas científicas. Además, la entrega del fármaco puede ser controlada en respuesta a un estímulo interno (pH, presencia de enzimas o un cambio del potencial redox) o externo (luz, temperatura, campo magnético) (*Mura, Nicolas y Couvreur, 2013*) y que se podrá transportar simultáneamente varios fármacos y/o biomacromoléculas (péptidos, proteínas y ácidos nucleicos).

Fue a partir de la década de los 90 cuando han comenzado a nacer las nuevas generaciones de los liposomas convencionales. Los primeros en modificar fueron los transferosomas, a quienes se les añade un tensioactivo que adquiere el nombre de “activador”. Después han sido los niosomas, formados únicamente por tensioactivos no-iónicos (ej.: sales biliares, polisorbato 20 y 80), y finalmente los etosomas, quienes introducen en su composición etanol y otros componentes lo que permite obtener glicerosomas, chitosomas, hialuronosomas, etc. (*Manconi et al., 2019*).

La primera generación de liposomas elásticos fue descrita por primera vez por *Gregor Cevc (1992)*, quien les denominó con el nombre de **Transferosomas**. Al igual que los liposomas convencionales, son vesículas formadas por bicapas lipídicas de fosfolípidos en cuyo interior presenta un compartimento acuoso, pero la diferencia es que en su composición presentan un tensoactivo no-ionícos que alteran la bicapa lipídica que conforman el transferosoma, de tal forma que origina un nanovehículo con mayor elasticidad. En consecuencia, los transferosomas presentan la capacidad de deformarse a través de las bicapas lipídicas del estrato córneo (SC) alcanzando mayor profundidad, ya que, son capaces de atravesar poros con un diámetro menor que su tamaño sin romperse (*Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schatzlein A, Blume G., 1998*).

Cevc et al (1998) propone que los Transferosomas son sistemas de liberación de fármacos capaces de penetrar a través de la piel. Se cree que los dos factores determinantes del éxito de los transferosomas son la elasticidad que presentan y la existencia de un gradiente osmótico en la piel (*Cevc G., Blume G., 1992*). Por consiguiente, los transferosomas atraviesan la piel hasta el sistema circulatorio porque en las capas lamelares hay menor concentración de agua a diferencia del interior, y gracias a que son sistemas deformables, su paso por el SC está facilitado (*Cevc G, Blume G., 2001*).

Además de presentar todas las ventajas de los liposomas convencionales, gracias a la adición de un tensoactivo se consigue incrementar el tiempo la liberación del fármaco y por lo tanto, la acción terapéutica es más prolongada. Asimismo, la acción es más rápida en comparación con las nanovesículas tradicionales. El resultado, lo que permite disminuir la frecuencia de aplicaciones tópicas. Se debe de añadir que los transferosomas son especialmente útiles en el transporte de aquellos fármacos que presentan una cinética de eliminación elevada de la circulación sanguínea.

El primer tensoactivo empleado en la formación de los transferosomas han sido las sales biliares. Hoy en día, los tensoactivos más empleados son el **colato de sodio**, **Span 80**, **Tween 80**, **ácido oleico**, **glicirricinato potásico**, entre otros. El porcentaje de dichos aditivos, como la naturaleza de los mismos, puede afectar a las propiedades físico-químicas de las vesículas. Tras varias investigaciones, se concluye

que el colato de sodio y el glicirricinato potásico también se consideran excelentes candidatos. Presenta alta estabilidad química, buena solubilidad, propiedades emulsificantes y actividad antiinflamatoria.

Los transferosomas han sido utilizados en la aplicación tópica de vacunas, principios activos antiinflamatorios, anestésicos locales, etc.. También se han empleado como vehículos para fármacos de alto peso molecular, inestables, proteínas y péptidos y aquellos que presentan una baja biodisponibilidad.

Los **etosomas** son la segunda generación de los liposomas, desarrollados por *Touitou et al. (2000)*, como nuevos portadores de principios activos constituidos por una alta concentración de etanol. Son nanovehículos vesiculares no invasivos y elásticos que permiten la llegada de los fármacos a las capas más profundas de la piel y/o a la circulación sistémica.

Los etosomas (*Zhou et al., 2010*) son el resultado de la modificación de las bicapas lipídicas de los liposomas convencionales por adición de una mezcla hidroalcohólica etanol/agua (< 45%). Así, se observa una mejor penetración transdérmica, además de mejorar la estabilidad y eficacia de encapsulación del fármaco. También es posible elaborar etosomas con la incorporación de PEG y alcohol isopropílico y se conocen como **Transetosomas** (*Song et al., 2012*). El objetivo es combinar la deformabilidad de los transferosomas y las ventajas de los etosomas. El hecho de presentar un solvente orgánico en su sistema es una gran ventaja, ya que, actúa modificando la conformación del SC abriendo poros, rutas o vías para el paso del etosoma. De este modo, al alterar la organización lipídica, aumenta la fluidificación del SC, y permite una mayor penetración del etosoma que contiene el fármaco hasta las capas más profundas de la piel.

El mecanismo de acción de los etosomas consiste en el sinergismo entre el etanol y los fosfolípidos presentes en la piel mejorando la penetración. *Touitou et al. (2000)* sugieren que el etanol interacciona con las cabezas polares de los fosfolípidos del estrato corneo (SC), lo que provoca es una disminución de la temperatura de transición tanto del cemento intercelular del SC como de los lípidos de las vesículas. Una vez que dichas vesículas elásticas llegan a las capas más profundas de la piel, se fusionan con las membranas celulares consiguiendo

un efecto sistémico. Además, los etosomas son mucho más estables que los liposomas debido a la presencia de etanol, que proporciona una carga neta negativa en la superficie, lo que evita la agregación de vesículas debido a la repulsión electrostática.

En la actualidad numerosos avances se han realizado en el campo de la nanotecnología (Yareli Rojas-Aguirre, Karina Aguado-Castrejón, Israel González-Méndez, 2016). Este término se aplica al diseño, la síntesis y la aplicación de materiales a nivel de la nanoescala (< 100 nm), que permite el diseño de nanodispositivos con la finalidad de liberar fármacos, identificar (Diagnóstico) enfermedades a nivel celular o molecular por medio de nanobiosensores de imagen e incluso se han desarrollado nanomateriales (terapia y diagnóstico, teranósticos) capaces de identificar una patología y liberar moléculas terapéuticas de forma simultánea y controlada (Zhang et al., 2016). Para ello se utilizan nanomateriales orgánicos e inorgánicos, entre los que encontramos a los liposomas (Figura 7):

Debido a su estructura y tamaño, los nanosistemas se pueden «cargar» una gran cantidad de fármaco, creando sistemas tipo reservorio, con lo cual se podría disminuir el número de dosis en un tratamiento.

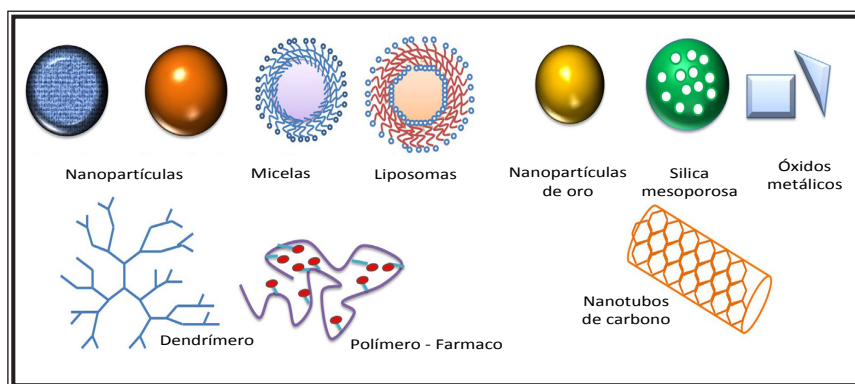


Figura 7. Representación de nanoestructuras orgánicas (a) e inorgánicas (b) para el transporte y liberación de fármacos.

2.- METODOLOGÍA

2.1 Preparación de liposomas

Desde el punto de vista de la preparación de liposomas, hay que tener en cuenta que la composición lipídica determinará la facilidad de formación y el tipo de liposoma formado. La elección de un lípido o mezcla de lípidos debe realizarse en base al conocimiento de sus propiedades y en función de la aplicación que se quiera dar al liposoma.

La mayoría de procedimientos de preparación se basan en la hidratación mediante una solución acuosa con el fármaco a encapsular (*Método Bangham*). Esta técnica permite obtener una dispersión de liposomas MLV. La reducción del tamaño y homogeneización se consigue mediante sonicación y extrusión, lo cual permite obtener liposomas LUV o SUV.

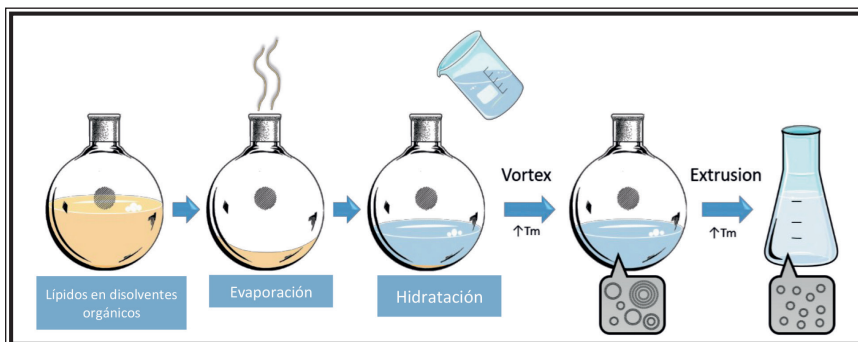


Figura 8. Preparación de liposomas empleando el método de hidratación a partir de una película lipídica.

En este documento solo se describe la metodología desarrollada en el trabajo diario de investigación. En este método, la mezcla de lípidos se disuelve en un disolvente orgánico hasta su completa homo-

geneización. Algunos lípidos necesitan aplicar calor para su completa disolución. Los disolventes orgánicos se evaporan hasta formar una película. Finalmente, la película lipídica se hidrata con una solución acuosa conteniendo la molécula para ser encapsulada mediante agitación y a una temperatura por encima de la temperatura de transición. La dispersión de liposomas obtenida (MLV) es entonces sonicada y extrusada con el fin de obtener vesículas unilaminares (Figura 8).

El último paso en la elaboración de liposomas es la extrusión (*Avanti® Mini-Extruder*), se trata de una técnica en la que una suspensión lipídica es forzada a pasar a través de un filtro de policarbonato (Figura 9). Cada formulación se hace pasar por filtros con tamaños de poro decreciente. La muestra se almacena en nevera (4°C).



Figura 9. Mini-Extruder Avanti Polar Lipids R.

2.2 Caracterización

El avance en el diseño de nuevos sistemas es muy prometedor, pero la tecnología debe facilitar los métodos de control del producto elaborado. Por lo que la caracterización de los nanoliposomas es fundamental para obtener vehículos estables y eficaces.

Con el fin de validar la reproducibilidad y la calidad de las muestras de liposomas, diferentes parámetros son controlados, como de-

terminar el tamaño y distribución de tamaños, índice de polidispersión, lamelaridad, carga superficial de las vesículas y eficacia de encapsulación.

2.2.1 Tamaño y distribución de tamaños



Figura 10. Microscopio electrónico transmisión (TEM; modelo JEOL 1010, Francia).

Se utilizan diferentes técnicas de microscopía electrónica (Figura 10); tales como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y *crio-TEM* para determinar la morfología de los liposomas y establecer los diferentes tamaños obtenidos.

Se utiliza el microscopio electrónico de transmisión (TEM; modelo JEOL 1010) de la Universidad de Valencia (UV). Las muestras se tiñeron con ácido fosfotungstico y su observación se llevó a cabo a 60 kV. Una cámara digital *MegaView III* y un programa informático permite el procesamiento de los datos.

En la figura 11 se muestran imágenes del TEM para liposomas con baicalina.

También es posible mediante estas técnicas determinar la presencia de lamelas. A la vez que es posible utilizar técnicas espectroscópicas como la difracción de rayos X (XRD) o small-angle X-ray espectroscopia (SAXS).

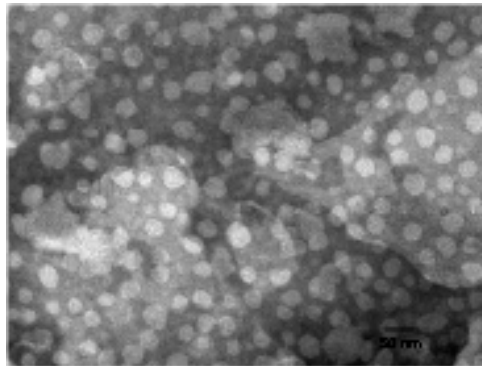


Figura 11: Liposomas con baicalina (0.25%, p/V).

Asimismo, el diámetro medio de las vesículas formadas se ha determinado mediante un Ze-

tasizer nano S (Malvern, UK). Se trata de un analizador de tamaños de alto rendimiento para la detección de agregados y medida del tamaño de muestras. Utiliza una técnica espectroscópica de difracción de luz láser conocida como “*Dynamic Light Scattering*” (DLS). Mediante dicha técnica se puede medir la difusión de partículas que se mueven bajo movimiento browniano, así como convertir esta medida en tamaño y distribución de tamaños de las partículas utilizando la **ecuación de Stokes-Einstein** (Ec. 1):

$$D = \frac{K_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

(Ecuación 1)

donde **D** hace referencia al coeficiente de difusión, **K_B** a la constante de Boltzman, **T** a la temperatura absoluta, **r** al radio de la partícula y **η** a la viscosidad del líquido.

Asimismo, el **Zetasizer** (Figura 12) también permite conocer el **índice de polidispersión (IP)**. Dicho índice aporta información acerca de la homogeneidad en la distribución de tamaños de las partículas presentes en una preparación. Puede tomar valores comprendidos entre 0 y 1, siendo 0 típico de una dispersión que presenta una distribución de tamaños totalmente homogénea, y 1 de una distribución muy heterogénea. (Ecuación 2)



Figura 12. Zetasizer nano S (Malvern instruments, UK).

$$IP = \frac{\sum (D_i - \bar{D})^2}{n}$$

(Ecuación 2)

donde D_i se refiere al tamaño de cada partícula, \bar{D} al tamaño medio de las partículas y n al número de partículas

2.2.2 Potencial Z

Para la determinación de la carga superficial de los liposomas se utiliza una técnica conocida como “**Laser Doppler Micro-electrophoresis**”. En una partícula que se encuentra suspendida en un líquido se desarrolla una determinada carga superficial, que afecta a su comportamiento. Para la medida del **potencial Z** se aplica un campo eléctrico a una dispersión, de manera que las partículas presentes en la misma se mueven con una velocidad determinada en función de su carga, la cual está relacionada con su **potencial Z**. Este valor es utilizado como un indicador una posible agregación de liposomas. Un valor de **potencial Z** entre +/- 30mV, sugiere fuertes interacciones electrostáticas, lo que indica una alta estabilidad electrostática para dispersiones coloidales.

2.2.3 Eficacia de encapsulación

Asimismo, la eficacia de encapsulación es otro de los parámetros que es necesario determinar para llevar a cabo la caracterización de las vesículas formadas. Permite conocer la cantidad de principio activo que

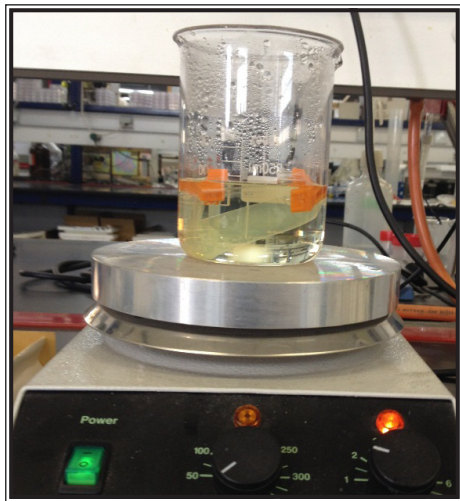


Figura 13. Eficacia de encapsulación.

ha sido encapsulado, es decir, que permanece en el interior de los liposomas formados. Para llevar a cabo dicha determinación se ha empleado el método de la diálisis. Se utiliza una membrana semipermeable de un tamaño de poro conocido, que permite el paso de moléculas con un tamaño menor al tamaño de poro de la misma, pero impide el paso de moléculas de un tamaño superior. Se utilizan membranas con un tamaño de poro de 12-14000 D (*Spectra/Por Diálisis Membrana*).

Se lleva a cabo una diálisis en medio acuoso (*Figura 13*), de manera que la proporción de principio activo que no se ha encapsulado atravesará la membrana y saldrá al medio de diálisis. Para ello, un volumen determinado de cada formulación se introduce dentro de la membrana, la cual se coloca en contacto con una solución tamponada diluida. Todo ello se encuentra bajo agitación constante, a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Las muestras se adquieren a tiempos predeterminados. La cuantificación de las muestras se ha realizado mediante **Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE)**.

La eficacia de encapsulación se expresa como porcentaje y se calcula utilizando la ecuación 3:



Figura 14. Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

$$EE \% = \frac{BA_{total} - BA_{libre}}{BA_{total}} \cdot 100$$

(Ecuación 3)

donde **BA_{total}** hace referencia al total de baicalina presente en las muestras ensayadas y **BA_{libre}** a la cantidad de baicalina que no ha sido encapsulada.

En la *Tabla 1* a modo de ejemplo se muestra los valores obtenidos del diámetro medio, índice de polidispersión (IP), potencial Z y eficacia de encapsulación (EE).

Formulación	Diámetro medio (nm)	Índice de polidispersión	Potencial Z (mV)	EE (%)
I	61.27±0.6	0.26	-16.5	-
II	59.96±0.7	0.25	-18.0	33.80±0.24
III	104.40±0.7	0.54	-21.1	89.52±0.19
IV	131.90±3.0	0.50	-19.3	86.51±0.16

Tabla 1. Valores tamaño medio (nm), índice de polidispersión, potencial Z (mV) y eficacia de encapsulación (EE, %), de las diferentes formulaciones ensayadas (n=3).

2.2.4. Absorción transdérmica

En el caso de liposomas de administración tópica, una técnica muy utilizada para estudiar la permeabilidad cutánea es emplear piel humana procedente de lipectomias abdominales y conservada a - 80°C hasta su uso. El ensayo se ha llevado a cabo con células de difusión “*tipo Franz*”, que presentan un área efectiva de difusión de 0.784 cm² y un volumen del compartimento receptor de 6 mL (*Figura 15*).

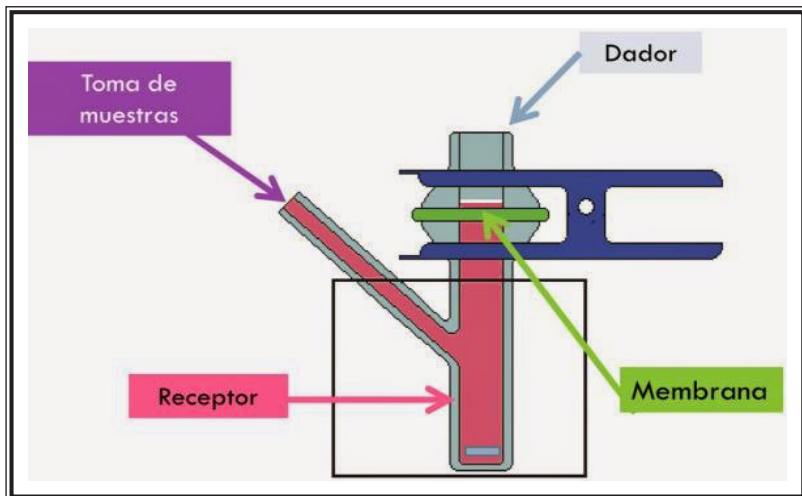


Figura 15. Célula de Franz

En el compartimento dador se ha añadido 500 μL de formulación, en el receptor una solución de polisorbato 80 (1%, p/V) en agua y entre ambos se ha interpuesto epidermis humana. Se han ensayado tres formulaciones: control, formulación II y formulación III.

La epidermis se separa de la dermis mediante una técnica basada en la aplicación de calor sobre la piel. Para ello, se recorta la porción de piel completa necesaria, se extiende sobre una lámina de silicona y se fija con agujas. El conjunto se sumerge en un baño de agua destilada a 60 $^{\circ}\text{C}$ y se mantiene durante 60 segundos. La alta temperatura provoca un debilitamiento en las uniones existentes entre la dermis y la epidermis, favoreciendo así su separación. La membrana obtenida se dispone entre el compartimento dador y receptor.

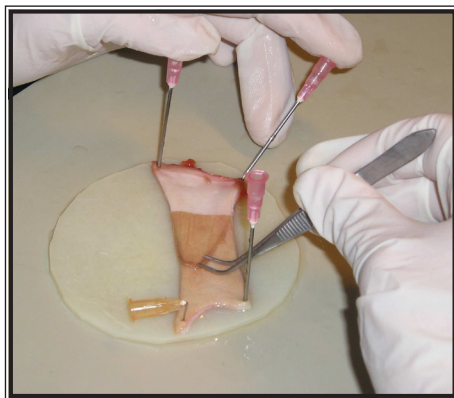


Figura 16. Separación de la epidermis a partir de piel humana.

La célula completa se introduce en un baño a 37 $^{\circ}\text{C}$ (24). Una placa magnética si-

tuada en el fondo del baño y un imán introducido previamente en el receptor de cada célula mantienen en continua agitación y homogenizan la solución receptora. Las células se mantienen al resguardo de la luz durante todo el experimento.

Se han tomado muestras de 200 μL a distintos intervalos de tiempo durante 48 horas, las cuales han sido cuantificadas mediante *CLAE*.

Al finalizar el ensayo de penetración se comprobó la integridad de la epidermis (*figura 17*). Para ello, se depositó en el compartimento dador 1 mL de solución de rojo fenol (0.5 mg/mL). El paso de esta molécula a través de la epidermis íntegra alcanza niveles de trazas al cabo de una hora. Sin embargo, cuando la epidermis presenta cualquier alteración significativa, el paso del marcador se hace fácilmente perceptible por el cambio de coloración del compartimento receptor.

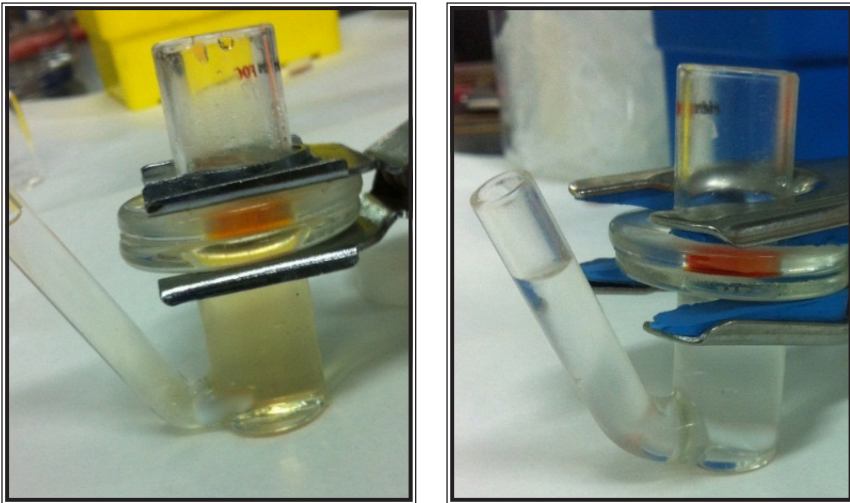


Figura 17. Comprobación de la integridad de la membrana con rojo fenol. Positiva en la imagen A y negativa en la imagen B.

Como representativa del proceso de difusión en las condiciones experimentales se ha utilizado la **ecuación de Scheuplein**, que relaciona las cantidades (Q , mg/cm²) permeadas con el tiempo (t , horas) (*Ecuación 4*):

$$Q_{(t)} = A \cdot P \cdot L \cdot C \cdot \left[D \cdot \frac{t}{L^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \cdot \text{Exp} \left(\frac{-D \cdot n^2 \cdot \pi^2 \cdot t}{L^2} \right) \right]$$

(Ecuación 4)

donde **A** es el área útil de difusión (cm²); **P** el coeficiente de reparto del fármaco entre la piel y el vehículo dador; **L** el espesor de la membrana (cm); **C** la concentración de fármaco en la solución dadora (mg/mL); **D** el coeficiente de difusión en la membrana (cm²/h) y **n** un número entero comprendido entre uno e infinito.

En la figura 18 se muestran perfiles de absorción percutánea de cantidades acumuladas del fármaco en función del tiempo.

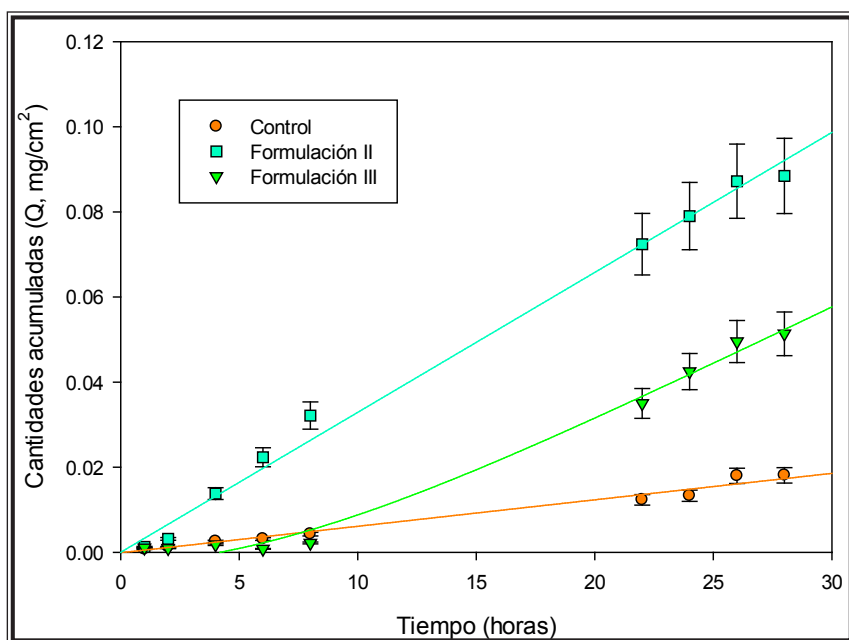


Figura 18: Perfiles típicos de absorción percutánea (cantidades acumuladas) de varias formulaciones: dispersión (control) y liposomas (Formulación I y Formulación II (n=3))

La ecuación 4 se ajusta a las cantidades acumuladas frente al tiempo mediante regresión no lineal, utilizando el programa *Sigmaplot 9.0*®. Se obtienen valores de P y D como parámetros primarios del ajuste.

A partir de dichos valores se calcula el tiempo de latencia (t_L , h), el coeficiente de permeabilidad (K_p , cm/h) y el flujo (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$):

$$t_L = \frac{1}{6 \cdot D}$$

(Ecuación 5)

$$K_p = \frac{P \cdot D}{L}$$

(Ecuación 6)

$$J = K_p \cdot C$$

(Ecuación 7)

En la *tabla 2* se indican los parámetros de permeabilidad obtenidos mediante el ajuste de las cantidades acumuladas en función del tiempo, mediante la ecuación 4.

Parámetro	Control	Formulación I	Formulación II
P	0.032±0.04	0.025±0.08	0.62±0.27
D (cm ² /h)	0.34±0.56	0.53±0.14	0.018±0.006
t_L (h)	0.29	0.31	9.25
$K_p \cdot 10^{-3}$ (cm/h)	16.80	13.35	11.08
J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$)	3.30	3.40	2.77
R>	0.88	0.99	0.99

Tabla 2. Parámetros de permeabilidad relativos a las cinéticas de absorción cutánea obtenidos para distintas formulaciones.

2.2.5. Ensayos de liberación *in vitro*

En el caso de la administración oral se deben obtener liposomas gastrorresistentes si se desea proteger el fármaco. Por lo tanto, debemos analizar inicialmente los perfiles de liberación *in vitro*. Los perfiles de liberación del fármaco presente en cada formulación proporcionan información sobre las características del principio activo, el proceso tecnológico llevado a cabo y, en ocasiones, ayudan a predecir la biodisponibilidad y el comportamiento “in vivo”.

En los nano liposomas, la difusión del activo depende de las características del mismo, como la solubilidad, de las características de los liposomas elaborados y del polímero de recubrimiento. Los ensayos de liberación se realizaron en un baño termostático a 37 °C y con una agitación constante de 200 rpm. Los diferentes liposomas se introdujeron en 100 mL de una solución tamponada a distintos pHs: 1,5, 5,5 y 7,4, con objeto de simular las condiciones del tracto gastrointestinal. Las formulaciones se introdujeron, previamente, en unas membranas de diálisis (12-14.000 D, Spectra/Por Diálisis Membrana).

Finalmente, con objeto de determinar la influencia de la microbiota intestinal en el proceso de liberación del activo a partir del liposoma, se realizaron ensayos de degradación enzimática. La degradación de estas vesículas se llevó a cabo en un medio tamponado (tampón fosfato, pH 7,4) y en presencia de heces, obtenidas de ratas *Wistar*. Inicialmente, el contenido se homogenizó con suero fisiológico hasta conseguir una mezcla homogénea y se tamizó (malla de 0,6 mm). El ensayo se realizó en un baño termostático a 37 °C, bajo agitación y con una concentración de contenido cecal del 10 % (p/p).

3.- APLICACIONES

En los recientes años se aprecian avances considerables en la investigación de los liposomas como vesículas de transporte de agentes terapéuticos. Se puede decir que los liposomas presentan algunas indudables ventajas como mejorar la eficacia, el índice terapéutico de los medicamentos y la estabilidad por encapsulación.

No son tóxicos, son flexibles, biocompatibles, completamente degradables y no son inmunogénicos. Reducen la toxicidad de los agentes encapsulados (taxol, Anfotericina B...) y ayudan a reducir la exposición de los tejidos sensibles a medicamentos tóxicos.

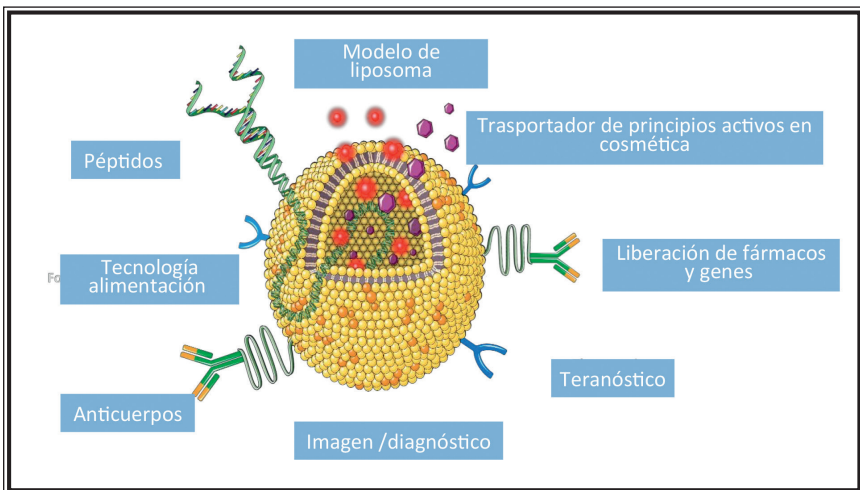


Figura 19. Liposoma multifuncionales

La Figura 19 representa una nanoplataforma altamente sofisticada que transporta un fármaco convencional, ácidos nucleicos y otros. La terapia génica consiste en la introducción de ácidos nucleicos (ADN o ARN) en las células diana para modificar la información genética o la expresión de determinadas proteínas a nivel celular. A partir de esta base, la terapia génica se puede aplicar de diversas formas, pudiendo aportar una funcionalidad nueva a las células, reemplazar funciones perdidas por la enfermedad, o incluso inhibir la expresión de determinados genes, impidiendo la extensión del cáncer.

Por todo ello se utilizan en diferentes aplicaciones como en quimioterapia anti-cancerosa, bactericidas, fungicidas, administración de hormonas y enzimas y en terapia génica.

Los nuevos sistemas multifuncionales (*Figura 19*) de liberación de fármacos pueden incluir componentes que permitan aplicar técnicas de imagen y de diagnóstico capaces de identificar el estadio de una determinada patología (*Mura et al., 2013; Kemp, Shim, Heo y Kwon, 2015; Mura y Couvreur, 2012*).

3.1. Teràpia anticancerosa

Como cada año lla **Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)** ha presentado su informe sobre las cifras del cáncer en España (*Figura 20*). Según este documento el cáncer avanza para ser la primera causa de muerte en España. En principio esta enfermedad se localiza en un determinado tejido u órgano y, posteriormente, se extiende a otros lugares distantes (metástasis), proceso que involucra una serie de cambios bioquímicos que hace del cáncer un padecimiento muy complejo (*Misra, R., Acharya, S. y Sahoo, S. K., 2010*).

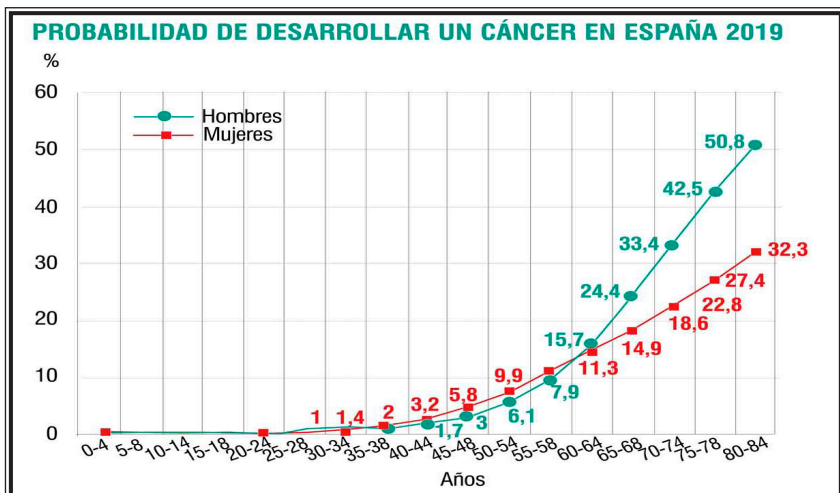


Figura 20. Probabilidad de desarrollar un cáncer en España 2019. (Sociedad Española de Oncología Médica, SEOM)

Su tratamiento recae en gran medida en la quimioterapia. El mecanismo de acción de la mayoría de los agentes quimioterapéuticos se basa en la interferencia de la proliferación celular para evitar la división celular descontrolada de las células cancerosas. Sin embargo, las células sanas también se encuentran en constante proceso de proliferación, por lo que un antineoplásico no discriminará entre una célula sana y una maligna, traduciéndose en efectos adversos muy severos durante el tratamiento.

En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de productos registrados para el tratamiento anticanceroso.

Producto	Fármaco	Indicaciones	Año
DOXIL/CAELYX	Doxorubicin	Myeloma	2007
DAUNOXOME	Daunorubicin	Karposi's sarcoma	1996
MYOCET	Doxorubicin	Breast cancer	2000
MARQIBO	Vincristine	Lymphoblastic leukemia	2012

Tabla 3. Relación de productos comercializados para el tratamiento anticanceroso.

Una de las características más importantes que distingue al tejido tumoral es que, para que las células crezcan rápida y descontroladamente, debe haber una estimulación de la angiogénesis, lo cual da lugar a una arquitectura defectuosa formando un sistema altamente poroso (10 a los 800 nm). Esta fisiopatología única, en combinación con un pobre drenaje linfático, se conoce como incremento de la permeabilidad y efecto de retención (*enhanced permeability and retention effect, EPR,*). Así, los sistemas de tamaño nanométrico llegan al tejido tumoral por difusión pasiva, se interna a través de los poros y permanecen allí por un tiempo prolongado debido al escaso drenaje linfático (Figura 21). De esta manera, se pueden alcanzar concentraciones del nanosistema hasta 10 veces más altas en el tumor en comparación con el tejido sano (Misra et al., 2010)

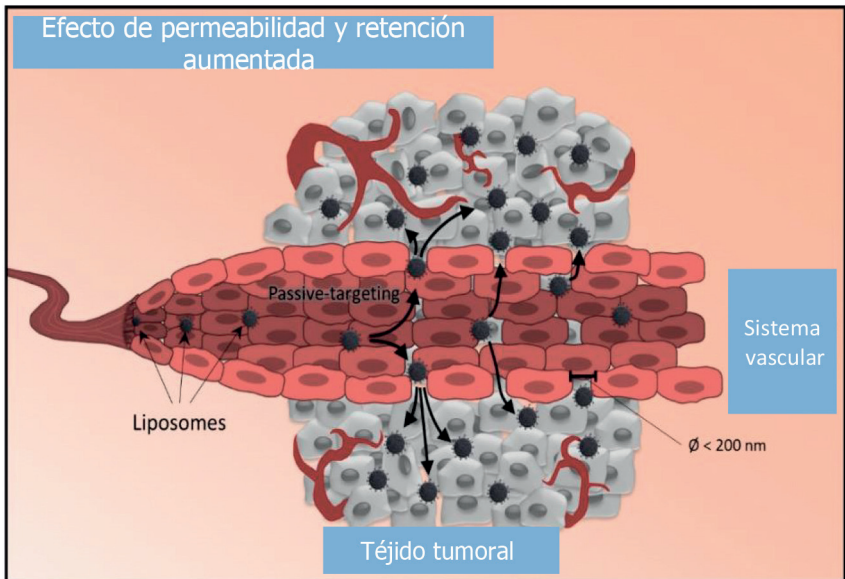


Figura 21. Representación de la distribución de liposomas anticancerosos.

Asimismo, las células tumorales suelen sobreexpresar algunos tipos de receptores de membrana que promueven su crecimiento descontrolado. De forma que el nanosistema puede modificarse en la superficie con un determinado ligando (péptido, proteína o anticuerpo) que reconozca al receptor, lo que permite acumularse preferentemente

en el tejido tumoral (Wicki et al., 2015) y con polímeros que optimicen su farmacocinética (Liu y Auguste, 2015). Numerosos trabajos han demostrado que los nanosistemas se pueden localizar en el tumor y permanecer en el mismo debido a su tamaño manométrico

Es importante destacar que los liposomas presentan ciertas limitaciones, como la incapacidad de permanecer en la circulación sistémica durante periodos prolongados. Los liposomas convencionales administrados por vía intravenosa son eliminados por el sistema retículo endotelial, al ser detectados como materiales extraños al organismo, con la ayuda de ciertas moléculas como las opsoninas (Figura 22).

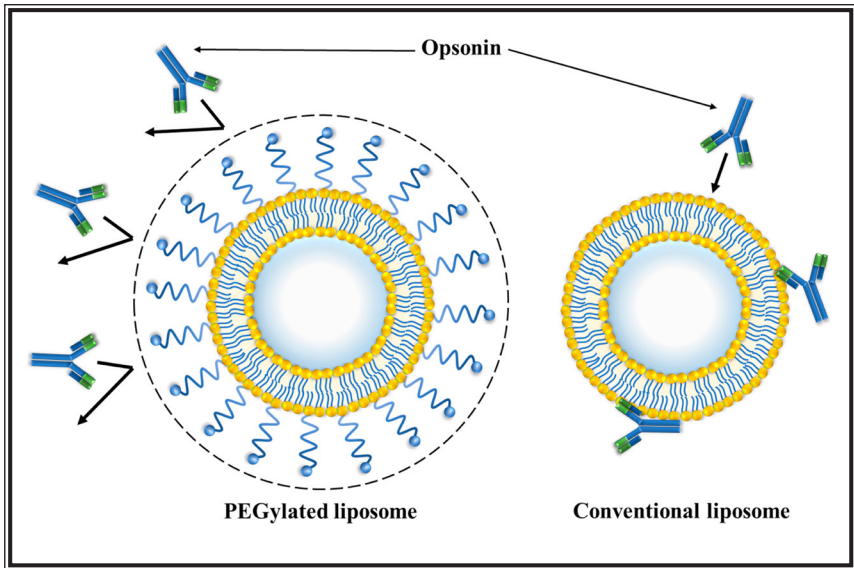


Figura 22. Mecanismo de acción de las opsoninas.

Diferentes investigadores han estudiado liposomas recubiertos con un polímero hidrofílico (PEG). Estos liposomas pegilados no son detectados por el sistema inmunológico y pueden acceder a su lugar de acción, mejorando su eficacia e incrementando la biodisponibilidad de diferentes fármacos como el *Paclitaxel*.

La *doxorubicina* es uno de los primeros fármacos en quimioterapia y se utilizó para el tratamiento de un amplio tipo de cánceres:

pulmón, mama, linfomas, etc. La experiencia acumulada lo convirtió en un candidato atractivo para la administración en forma de liposomas. Es importante destacar que la doxorubicina causa cardiotoxicidad severa y es dependiente de la dosis. Numerosos ensayos clínico realizados hasta la fecha, administrando doxorubicina en forma de liposomas pegilados (*Doxil R*), muestran ciertos beneficios.; ya que disminuye los efectos tóxicos del fármaco y mejora la eficacia terapéutica. Este sistema se emplea para tratar el sarcoma de Karposi relacionado con SIDA, cáncer de mama, ovárico y otros tumores solidos (*Thornton et al., 2013; Kiessling et al., 2014; Romeo et al., 2018*). Recientemente, se investiga otras formulaciones de liposomas con doxorubicina sensibles a la temperatura (*ThermoDox, Celsion Corp.*).

3.2. Colitis ulcerosa

En este caso, la administración oral de liposomas se enfrenta a duras condiciones que limitan la biodisponibilidad y estabilidad de los mismos. En este sentido, se han realizado enormes avances en el diseño de liposomas recubiertos que permiten encapsular fármacos de escasa biodisponibilidad y con mecanismos para la liberación colónica (*Rezvani et al., 2019*).

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica e incontrolada que afecta a la mucosa del colon. La afectación se inicia en el recto y de forma continua, puede alcanzar una extensión variable en sentido proximal hasta el ciego. Cursa en forma de brotes durante los cuales el paciente presenta la sintomatología clásica de la enfermedad (diarrea, sangrado y dolor abdominal), acompañada o no de síntomas sistémicos y/o de manifestaciones extraintestinales (inflamación y dolor articular, úlceras en la piel); seguidos de períodos de remisión en los que los pacientes se hallan asintomáticos.

En cuanto al diagnóstico, la falta de especificidad de las alteraciones analíticas hace que los estudios de laboratorio no sean herramientas muy útiles a la hora de establecer el diagnóstico de esta enfer-

medad, por ello la colonoscopia con toma de biopsias es la exploración complementaria que permite confirmarlo. La afectación macroscópica de la mucosa es difusa y continua (sin áreas interlesionales aparentemente sanas). En los casos más leves aparece disminución o desaparición del patrón vascular, edema y eritema mientras que en casos más graves aparecen úlceras de diversos tamaños y sangrado espontáneo al roce, como se muestra en la Figura 23.

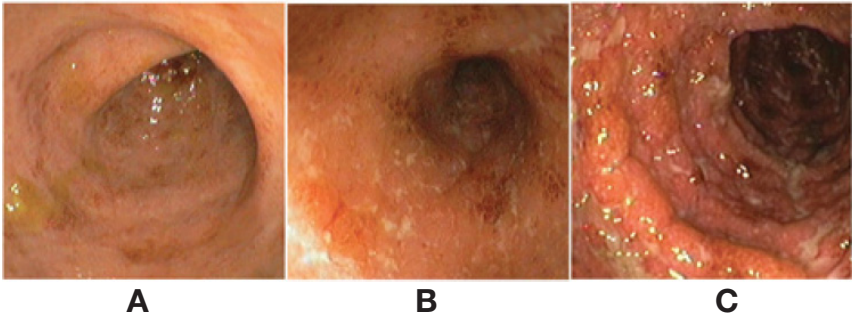


Figura 23. Hallazgos endoscópicos según la gravedad de las lesiones en la mucosa. A) Leve (eritema, disminución del patrón vascular, discreta friabilidad); B) Moderada (marcado eritema, ausencia del patrón vascular, friabilidad y erosiones); C) Grave (exudado y hemorragia espontánea, úlceras profundas).

Epidemiológicamente, presenta una incidencia de 3-15 casos/10000 habitantes, una prevalencia de 50-80/100000 habitantes y no es específica de género ni edad. El tratamiento dependerá de la gravedad del brote, así pues, en los brotes leves o moderados son de elección los aminosalicilatos; en los brotes de actividad moderados a graves glucocorticoides; terapia biológica (inhibidores del TNF- α) e inmunosupresores en brotes moderados - graves y refractarios a corticoides endovenosos. No obstante, el tratamiento farmacológico lleva asociados efectos adversos, entre los que cabe destacar síntomas dispepticos, aumento de peso, fatiga, calambres musculares, insomnio, hipertensión, disminución de la densidad mineral ósea, depresión medular, inflamación del páncreas, del hígado, pulmón o corazón, entre otros.

La existencia de tratamientos coadyuvantes a base de productos naturales, que complementen el tratamiento farmacológico y ayuden a

remitir la sintomatología, sin exacerbar los efectos adversos asociados al uso de fármacos, representaría un avance dirigido a incrementar la calidad de vida de los pacientes (Caddeo et al, 2016).

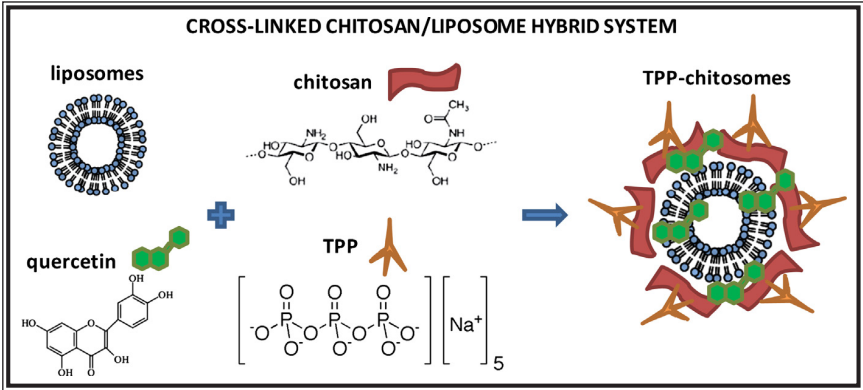


Figura 24. Liposomas híbridos de quercetina de liberación colónica (Caddeo et al., 2016).

La quercetina es un flavonoide con propiedades antioxidantes/antiinflamatorias, que se absorbe poco cuando se administra oralmente. Para aumentar su biodisponibilidad y optimizar su liberación en el intestino, se creó un sistema híbrido. Se desarrollaron y caracterizaron liposomas recubiertos con quitosano reticulado, denominados quitosomas TPP.

La caracterización incluye microscopía electrónica de transmisión, calorimetría diferencial de barrido, Turbiscan, etc. Los quitosomas TPP eran de tamaño nanométrico (180 nm), bastante esféricos en forma y

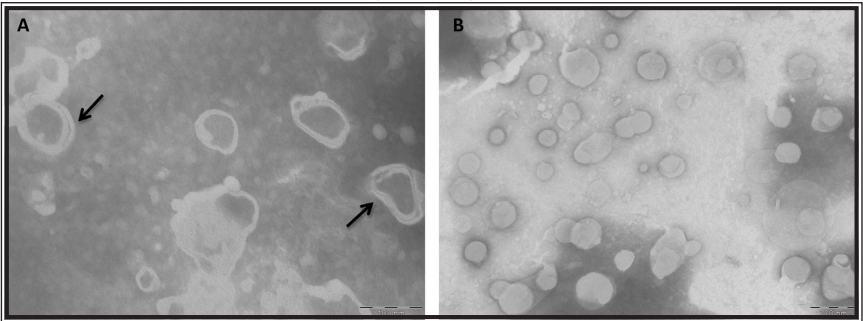


Figura 25. TEM imágenes de liposomas (A) y TPP-chitosomas (B). Las flechas indican las laminillas de liposomas.

unilamelares. El recubrimiento real de la superficie de los liposomas con el quitosano reticulado, fue demostrado por la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS).

Asimismo, se investigó la liberación de quercetina en pH gástrico e intestinal simulado, y los resultados mostraron que el sistema proporcionó resistencia a las condiciones ácidas y promovió la liberación en pH alcalino, imitando el ambiente intestinal. El sistema híbrido propuesto representa una combinación prometedora de **nanovesículas** y quitosano para suministro de quercetina al intestino en la terapia de estrés oxidativo / trastornos relacionados con la inflamación.

3.3 Alteraciones de la piel

Por otra parte, la utilización de liposomas para administración transdérmica presenta numerosas ventajas (*El Maghraby GM, Barry BW, Williams A C, 2008*):

a) Los liposomas son vehículos adecuados para la administración de fármacos tanto lipófilos como hidrófilos debido a que contienen cabezas polares donde se forma una fase acuosa y permite la disolución de fármacos hidrófilos, y cadenas hidrocarbonadas apolares donde se sitúan los principios activos lipófilos.

b) Son biocompatibles y biodegradables ya que están formados por fosfolípidos semejantes a las membranas celulares. Esto hace que sean nanovehículos seguros.

c) La encapsulación de la forma activa de un fármaco lo protege frente a fenómenos biológicos como la degradación enzimática y/o química. Por lo tanto, los liposomas evitan que un fármaco se metabolice antes de alcanzar los tejidos diana, y simultáneamente minimizan la exposición del tejido sano al fármaco encapsulado durante su circulación en la sangre. Ambos efectos contribuyen a aumentar el índice terapéutico.

Además, una de las grandes ventajas de la administración mediante liposomas por la vía transdérmica frente a la administración oral es la ausencia que se evita del efecto de primer paso en el hígado. De tal forma que la biodisponibilidad obtenida es mayor.

No obstante, a pesar de que los liposomas son sistemas muy ventajosos, también presentan propiedades que deben de mejorar. La aplicación de liposomas convencionales presenta una penetrabilidad escasa o nula. Son ineficaces en la penetración a través del SC. Sin embargo, los nanoliposomas con un tamaño de aproximadamente de 100 nm son más eficaces en el tratamiento de enfermedades cutáneas que lo liposomas convencionales.

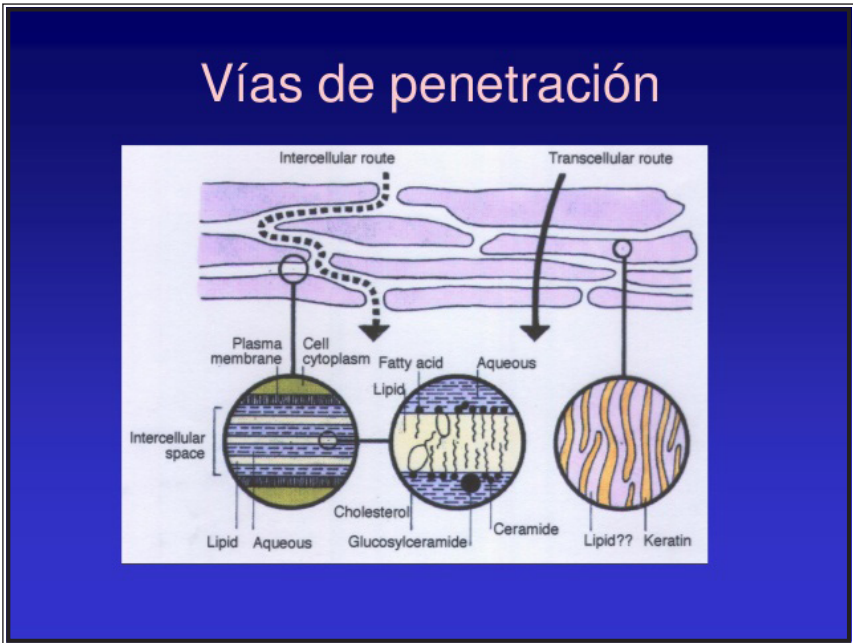


Figura 26. Vías de penetración a través de la piel

Muy pocas sustancias tienen la capacidad de difundir en una concentración significativa a través de la piel (Figura 26). La mayoría de las formas tópicas disponibles en el mercado presentan una baja penetración cutánea, lo que produce un beneficio terapéutico bajo. El desarrollo de sistemas de liberación que produzcan un aumento en la

permeabilidad cutánea y en la penetración de la misma son de elevado interés (Mir-Palomo et al., 2016).

La liberación de sustancias terapéuticas a través de la piel sin la necesidad de adicionar agentes químicos es preferible para mantener la función barrera normal de la piel, ya que el uso de estas sustancias, como tensioactivos y solventes orgánicos pueden causar irritación y daño en la piel. Existen numerosos estudios *“in vivo”* e *“in vitro”* que demuestran que los liposomas mejoran la permeabilidad de la piel y la penetración del fármaco a través de la misma. La formulación de sustancias en liposomas aumenta su solubilidad y estabilidad, a la vez que mejora su biodisponibilidad. La estructura típica en forma de bicapa fosfolipídica de los liposomas hace que sea muy compatible con la piel, ya que las membranas celulares de la misma presentan una estructura muy similar.

4.- FUTURO DE LOS LIPOSOMAS

La obtención de nanosistemas que poseen propiedades terag-nósticas (*Bolognesi ML et al., 2016*), esto es, nanomateriales que poseen una doble funcionalidad, para el diagnóstico y la acción terapéutica tienen un gran futuro para el tratamiento de enfermedades como el cáncer (*Figura 27*) y otras enfermedades como el Alzheimer

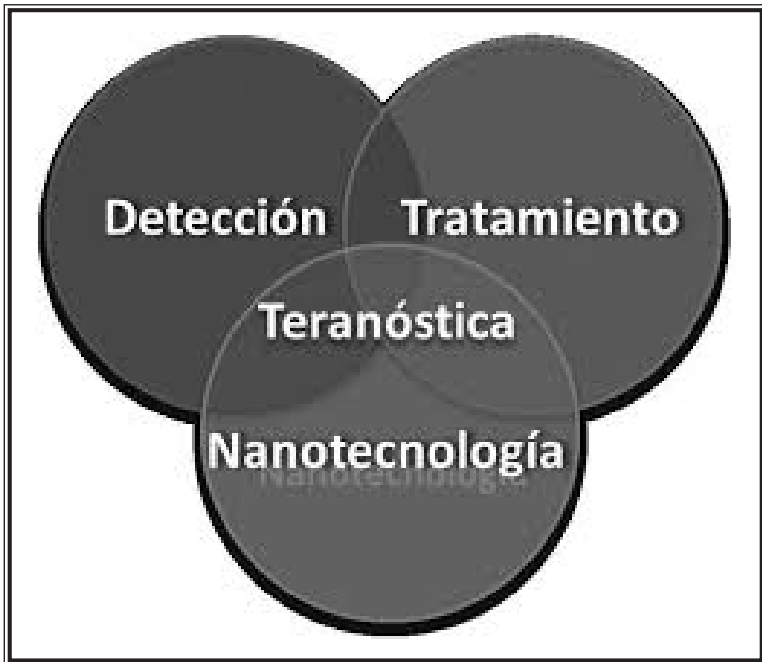


Figura 27. Aplicación de tecnologías para el diagnóstico y tratamiento.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es altamente prevalente entre las personas de mayor edad de las sociedades de hoy en día. Por ello, es necesario encontrar solución para frenar esta enfermedad irreversible (*Asociación Española de científicos, 2017*).

Se calcula que afecta a 47,6 millones de personas en todo el mundo. Teniendo en cuenta el progresivo envejecimiento de la población mundial y el aumento creciente de la esperanza de vida media, cada año se registran 7,7 millones de nuevos casos de EA.

Asumiendo la teoría amiloidogénica sobre el origen de EA, que implica la formación de los agregados de proteínas amiloideas (β A), como el principal mecanismo fisiopatológico de la enfermedad, los científicos centran sus esfuerzos en el desarrollo de sondas de emisión en el infrarrojo cercano (NIR) para el diagnóstico por imagen de las especies β A, mediante técnicas espectroscópicas de fluorescencia.

Los agentes teragnósticos (*Bolognesi et al., 2016*) constituyen una gran herramienta para conseguir diagnosticar y tratar, a la vez y de forma precoz, la EA. Basándose en la teoría que considera a las placas amiloideas como principal biomarcador de esta enfermedad, se han desarrollado múltiples moléculas candidatas a agente teragnóstico. Hasta ahora las dos técnicas de diagnóstico por imagen más usadas son **Tomografía de Emisión de Positrones (PET)**, en la que se utilizan isótopos radioactivos y la **Resonancia Magnética de Imagen (MRI)**, en la que se somete al paciente a un intenso campo magnético.

Es necesario subrayar la importancia del diagnóstico por imagen *in vivo* de los depósitos de los péptidos β A. La formación de estos agregados es previa a la aparición de cualquier síntoma clínico, lo que conduce a un diagnóstico precoz de la enfermedad. Con el empleo de la espectroscopia de fluorescencia conseguimos aumentar la sensibilidad y especificidad (*Staderini et al., 2015*); de forma que se puede monitorizar la agregación de β A en tiempo real.

La curcumina es un pigmento amarillo de origen natural, cuya fluorescencia intrínseca podría aprovecharse para el diagnóstico por imagen de las placas β A. Sin embargo, en la práctica clínica se ha comprobado que no función como un buen agente diagnóstico (*Figura 28*).

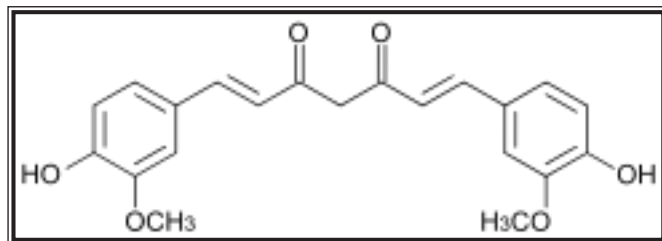


Figura 28. Estructura molecular de la Curcumina.

Por esta razón, un análogo de curcumina ha obtenido resultados muy satisfactorios en los ensayos in vitro que indican que podrían ser llevados a la práctica clínica habitual en un futuro (Zhang X. *et al*, 2014). Estas moléculas combinan el diagnóstico mediante espectroscopia de fluorescencia, ya que se comportan como sondas en el infrarrojo cercano cuando se unen a los agregados β A y el tratamiento mediante inhibición de la formación de los oligómeros tóxicos de proteína amiloidea en el tejido cerebral, ya que son capaces de quelar los metales necesarios para iniciar el proceso de agregación proteica.

Por otra parte, recientes investigaciones sugieren que existe un equilibrio dinámico entre la acumulación de péptido A β en el cerebro y en la sangre periférica. La inyección intraperitoneal de **nanoliposomas unilaminares** conteniendo **ácido fosfatídico o cardiolipina** en ratones transgénicos reduce los niveles de A β en la sangre circulante. Así, la alteración de la acumulación periférica de A β podría desembocar en un aumento del flujo de salida del mismo hacia la sangre circulante, produciendo una reducción de la presencia de la proteína amiloide en el cerebro y combatiendo su acumulación en placas, fenómeno denominado “*efecto sumidero*”.

Finalmente, se ha ensayado una vacuna de carácter preventivo y terapéutico, completamente innovadora (Centro de Investigación Biomédica EuroEspes, CIBE), se caracteriza por la introducción de un nuevo **inmunógeno-adyuvante** diseñado para generar anticuerpos contra las placas neuríticas donde se acumula la proteína beta-amiloide (β A) que daña el cerebro de los pacientes con Alzheimer. Esta vacuna es encapsulada en **liposomas ricos en esfingosina-1-fosfato (S1P)** que contribuyen a la regeneración neuronal. Estas dos características inno-

vadoras confieren a la vacuna el carácter dual, de profiláctica (preventiva, antes de que aparezcan los síntomas) y terapéutica (en aquellos casos que ya han manifestado síntomas de la enfermedad).

BIBLIOGRAFIA

Asociación Española de científicos: *Enfermedad de Alzheimer: Bases moleculares y aproximaciones terapéuticas* [Internet]. Madrid: Instituto de Química Médica (CSIC). [Actualizado en abril 2107, consultado en mayo 2017]. (<http://www.aecientificos.es/empresas/aecientificos/intereshtml/alzheimer/alzheimer.htm>).

Bolognesi ML, Gandini A, Prati F, Uliassi E. (2016). *From Companion Diagnostics to Theranostics: A New Avenue for Alzheimer's Disease?* J. Med. Chem ; 59 (17): 7759-7770. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00151.

Carla Caddeo, Octavio Díez-Sales, Ramon Pons, Claudia Carbone, Guido Ennas, Giovanni Puglisi, Anna Maria Fadda, Maria Manconi (2016), *Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetina*. Journal of Colloid and Interface Science 461: 69–78.

Cevc G, Blume G. (1992). *Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force*. Biochim Biophys Acta.

Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schatzlein A, Blume G. (1998). *Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin*. Biochim Biophys Acta; 1368(2):201–15.

Cevc G, Blume G. (2001). *New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carrier Transfersomes*. Biochim Biophys Acta. Medizinische Biophysik, Technische Universität München, München, Germany., 1;1514(2):191–205.

El Maghraby GM, Barry BW, Williams a C (2008). *Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes*. Eur J Pharm Sci., 7;34(4-5):203–22.

Ferrari, M. (2005). *Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges*. Nature Reviews Cancer, 5 (3), 161-171.

Hernández León A (2017). *El pequeño mundo de los liposomas*. Biol.on-line: Vol.6, Núm.2: 1 -7.

Kemp, J. A., Shim, M. S., Heo, C. Y. y Kwon, Y. J. (2015). “Combo” nanomedicine: Co-delivery of multi-modal therapeutics for efficient, targeted, and safe cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, (<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.019>).

Kumar A., Mansour H.M., Friedman A. y Blough E. (2013). *Nanomedicine in drug delivery*. Boca Raton FL: CRC Press.

Liu D, Auguste D.T. (2015). *Cancer target therapeutics: From molecules to drug delivery vehicles*. *Journal of Controlled Release*, 219, 632 – 643.

Manconi M, Caddeo C, Nacher A, Díez-Sales O, Peris J.E, Escribano Ferrer E, Fadda AM, Manca ML (2019). *Eco-scalable baicalin loaded vesicles developed by combining phospholipid with ethanol, glycerol, and propylene glycol to enhance skin permeation and protection*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 184, 110504.

Michael M. (1993). *Liposomes and the skin*. In: Gregoriadis G, A.T. F and PHM, editor. *Liposomes in Drug Delivery*. SWITZERLAND: harwood academic publishers; p. 125–35.

Mir-Palomo S, Nacher A, Vila Busó O, Caddeo C, Manca ML, Manconi M, Díez-Sales, O (2019). *Baicalin and berberine ultradeformable vesicles as potential adjuvant invitiligo therapy*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 175 (2019) 654–662.

Misra, R., Acharya, S. y Sahoo, S. K. (2010). *Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy*. *Drug Discovery Today*, 15(19-20), 842-850.

Mura, S. y Couvreur, P. (2012). *Nanotheranostics for personalized medicine*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(13),1394-1416.

Mura, S., Nicolas, J. y Couvreur, P. (2013). *Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery*. *Nature Materials*, 12(11),991-1003.

Rezvani M, Manca ML, Caddeo C, Escribano-Ferrer E, Carbone CI, Peris JE, Usach I, Díez-Sales O, Fadda AM, Manconi M (2019). *Co-Loading of Ascorbic Acid and Tocopherol in Eudragit-Nutriosomes to Counteract Intestinal Oxidative Stress*. *Pharmaceutics*, 11, 13; doi:10.3390/pharmaceutics11010013.

Song CK, Balakrishnan P, Shim CK, Chung SJ, Chong S, Kim DD (2012). *A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012 Apr 1;92:299-304. doi: 10.1016/j.2011.

Staderini M, Martín MA, Bolognesi ML, Menéndez J.C. (2015). *Imaging of β -amyloid Plaques by Near-Infrared Fluorescent Tracers: a New Frontier for Chemical Neuroscience*. Chem Soc Rev 2015; 44 (7): 1807-1819. DOI:10.1039/c4cs00337c.

Toutou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M (2000). *Ethosomes - Novel vesicular carriers for enhanced delivery: Characterization and skin penetration properties*. J Control Release. 65(3):403-18.

Torchilin, V. P. (2014). *Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery*. Nature Reviews. Drug Discovery, 13(11), 813-827.

Zhou Y, Wei YH, Zhang GQ, Wu XA. (2010). *Synergistic penetration of ethosomes and lipophilic prodrug on the transdermal delivery of acyclovir*. Arch Pharm Res. 2010 Apr;33(4):567-74. doi: 10.1007/s12272-010-0411-2.

Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. y Huwyler, J. (2015). *Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications*. Journal of Controlled Release, 200, 138-157.

Yareli Rojas-Aguirre, Karina Aguado-Castrejón e Israel González-Méndez (2016). *La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la revolución de la terapia contra el cáncer?*. Educación Química 27, 286-291.

Zhang X, Tian Y, Yuan P, Li Y, Yaseen MA, Grutzendler J, Moore A, Ran C. (2014). *A Bifunctional Curcumin Analogue for Two-Photon Imaging and Inhibiting Crosslinking of Amyloid Beta in Alzheimer's Disease*. ChemComm; 50 (78), 11550-11553. DOI: 10.1039/c4cc03731f.



**Colegio Oficial
de Farmacéuticos
de la Provincia
de Alicante**

MICOF

MUY ILUSTRE COLEGIO OFICIAL
DE FARMACÉUTICOS DE VALENCIA

**ICOF
CS**



**Il·lustre
Col·legi Oficial
de Farmacèutics
de Castelló**