

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
Departamento de Ciencias Farmacéuticas  
Area de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO  
TRANSPORTADORES DE ANTIRRETROVIRALES:  
IMPLICACIONES EN LA FARMACOCINÉTICA  
Y EN LA FARMACODINAMIA**

**TESIS DOCTORAL**

**Hinojal Zazo Gómez**

**2017**

# ÍNDICE

---

Capítulo 1. Introducción y objetivos	3
Capítulo 2. Resumen	15
Capítulo 3. Conclusiones	47

# **CAPÍTULO 1**

---

## **Introducción**

## **1. Epidemiología del VIH**

Actualmente hay unos 36 millones de personas infectadas por el VIH en el mundo y, desde la primera muerte relacionada con el VIH en 1959, ya ha habido más de 39 millones de muertos por el SIDA y enfermedades relacionadas. La facilidad de acceso al tratamiento, en cerca del 50 % de los casos, unido al tratamiento antiretroviral de alta actividad está directamente relacionado con la disminución del 45 % en el número de muertes en los últimos 10 años [1]. Sin embargo, con la expansión del tratamiento también se está observando un aumento de las resistencias a los fármacos antirretrovirales habituales [2]. El difícil acceso a los medicamentos y pruebas de detección en los países en vías de desarrollo, la baja adherencia de los pacientes y la resistencia del virus a los fármacos impiden un adecuado control y erradicación de la enfermedad.

## **2. Patogenia del VIH**

El VIH es un virus que utiliza las células del sistema inmunológico del huésped para reproducirse y sobrevivir. La infección comienza al interactuar el virión con la superficie celular a través de la proteína gp120 del VIH-1 y los receptores celulares CD4+ y el co-receptor CCR5 (Figura 1.1) [3]. Las principales células diana son los linfocitos T CD4+ que se encuentran en los tejidos linfoides como el bazo, los nódulos linfáticos y el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés), y únicamente un 2% de los linfocitos infectados se encuentran en el torrente sanguíneo [4,5]. Como consecuencia de la infección, la vida media de estas células disminuye desde 6 días a poco más de 1 día [6], provocando un descenso de la población y disminuyendo la capacidad de respuesta inmunológica.

El virus, tanto en forma activa como latente, también puede encontrarse en las células del sistema monocito/macrófagos, las células dendríticas o las células de la microglía, actuando todas ellas como reservorios, ya que no mueren a pesar de estar infectadas. De forma semejante, el virus también se encuentra protegido en lugares anatómicos de difícil acceso, como son el sistema nervioso central, el tracto genital o incluso el tracto gastro-intestinal [3,5]. Como consecuencia de la existencia de estos reservorios, se mantienen niveles altos de células infectadas de forma continua, lo que puede desencadenar la apoptosis de las células inmunológicas, inducir el reclutamiento y la activación de células infectadas latentes, y favorecer la difusión de la enfermedad a otras partes del organismo [4].

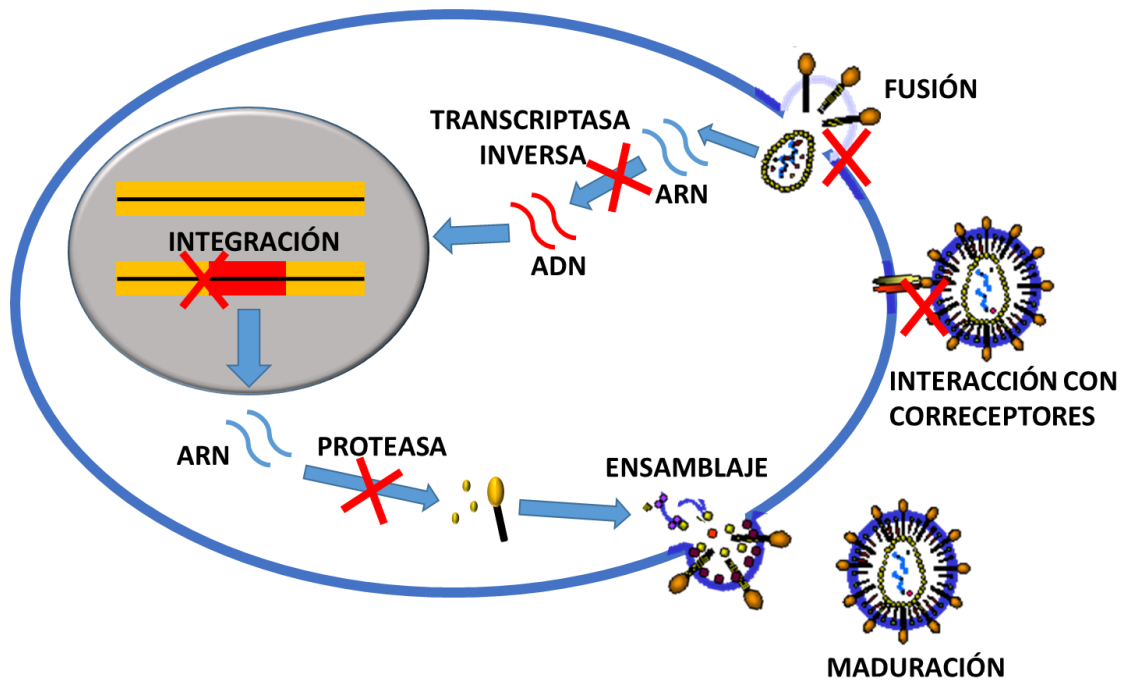
### 3. Tratamiento antirretroviral

Actualmente el tratamiento de la infección por VIH es la terapia antirretroviral combinada o terapia antirretroviral de alta actividad (HAART o TAR en español). Los dos principales objetivos de esta farmacoterapia son el control virológico y la restauración de los niveles de células inmunológicas. Gracias a ella ha aumentado la esperanza de vida de los pacientes, cronificando la enfermedad y evitando el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [7,8].

Este tratamiento consigue disminuir la carga viral sanguínea desde el inicio, pero se requieren niveles de adherencia superiores al 95 % para conseguir una eficacia superior al 50 %. Esto es debido a que más del 90% de las células infectadas se encuentran en los reservorios virales donde no hay un buen acceso del fármaco y en cuanto se interrumpe el tratamiento hay un rápido crecimiento de la carga viral en el torrente circulatorio [4,7,9]. Además, una buena adherencia es importante para evitar el desarrollo de resistencias, aunque el VIH-1 ya presente una tendencia inherente a ello [3,4,8,10]. Por definición, la adherencia depende de la implicación del paciente en la elección, inicio y cumplimiento del tratamiento [11], aunque habitualmente se asocia únicamente con el cumplimiento del mismo. Las frecuentes administraciones y los efectos secundarios, como fatiga, confusión, pérdida del gusto, náuseas, y el temor a alteraciones morfológicas como la lipodistrofia, suelen estar relacionadas con la interrupción o incumplimiento del tratamiento [11].

El TAR es una combinación simultánea de al menos dos o tres fármacos antirretrovirales administrados 2 veces al día durante los primeros 6 meses y, como mínimo, dos de los fármacos deben tener diferentes mecanismos de acción [11]. Actualmente hay varios tipos de fármacos antirretrovirales que actúan en diferentes etapas del ciclo vital del virus. En función de su mecanismo de acción se clasifican en: inhibidores de la transcriptasa reversa (nucleótidos (NtRTI), nucleósidos (NRTI's) o no nucleósidos (NNRTI)), inhibidores de la proteasa (PI) y los más recientes son los inhibidores de los correceptores, y los inhibidores de la fusión (Figura 1.1).

En la mayoría de los casos, los fármacos necesitan acceder a nivel intracelular para ejercer su acción, para lo que tienen que atravesar múltiples barreras. Además, la presencia de bombas de expulsión dificulta alcanzar concentraciones terapéuticas en los lugares de acción. Esto, junto con la corta semivida de la mayoría de los fármacos antirretrovirales, obliga al uso de altas dosis con frecuentes administraciones [3,7].



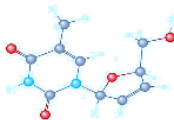
**Figura 1.1.** Ciclo vital del VIH y lugares de acción de los antirretrovirales.

### 3.1. Estavudina

La estavudina es un fármaco antirretroviral del grupo de los NRTI's, inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de los nucleósidos cuyas características se presentan en la tabla 1.1. Los fármacos de este grupo presentan diferencias estructurales y metabólicas a pesar de tener el mismo mecanismo de acción. Estavudina es un análogo sintético nucleosídico de pirimidina que puede actuar como inhibidor competitivo de la transcriptasa reversa, interrumpiendo la cadena de ADN [12]. Para ejercer su acción entra en la célula por difusión no facilitada y es fosforilada transformándose en la forma activa 5'-trifosfato. Esta molécula es la que posteriormente competirá con el nucleósido trifosfato viral por la unión con la transcriptasa reversa.

La estavudina presenta una adecuada estabilidad en medio ácido, un adecuado perfil de seguridad y actividad incluso frente a cepas virales resistentes a otros fármacos como la zidovudina. Debido a su corta semivida en sangre, se requieren dos administraciones al día en vez de una, a diferencia de otros antirretrovirales como didanosina o tenofovir. La dosis más alta aprobada es de 80 mg, en personas de más de 60 kg, que aunque provoca más efectos adversos se utiliza debido a la clara mejoría en la eficacia [13].

**Tabla 1.1.** Características de la estavudina [14].

	IUPAC	1-[(2R,5S)-5-(hydroxymethyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]-5-methylpyrimidine-2,4-dione
Nombre	Nombre Químico	Estavudina
	Abreviatura	d4T
	Nombre Comercial	Zerit
Fórmula molecular		$C_{10}H_{12}N_2O_4$
Estructura 3D		
Características Físicoquímicas	Peso molecular	224,213 g/mol
	Solubilidad	5-10 g/100 mL at 21 °C
	Estado	Sólido cristalino blanco inoloro
	Absorbancia UV-visible	266 nm
Sensibilidad		Oxidantes

El principal efecto secundario de la estavudina es a nivel hematológico (alteraciones en número y funcionalidad de eritrocitos, hemoglobina, plaquetas...) [7]. Pero los efectos secundarios más visibles en los pacientes son la lipodistrofia y la neuropatía periférica [15]. Una vectorización del fármaco a la diana terapéutica, con una reducción de la dosis, podría ayudar a disminuir estos problemas que son dosis-dependientes [15].

A pesar de los efectos adversos, su bajo coste de producción hace que se mantenga como primera línea terapéutica en los países en vías de desarrollo [13]. Esto permite que el número de pacientes con acceso a la medicación en estos países haya pasado de menos de 5 millones en 2010 a más de 10 millones a finales del 2015 [8].

El bajo precio de un fármaco es otra ventaja para el desarrollo de sistemas como los nanomedicamentos [16], cuyo elevado coste total impide su incorporación en la práctica clínica habitual.

En resumen, debido a características como corta semivida, buena solubilidad en agua, composición química adecuada para la interacción con nanopartículas de oro, efectos secundarios dosis-dependientes y fármaco económico se ha elegido a la estavudina como “fármaco modelo”.

### **3.2. Nanoformulaciones de antirretrovirales**

El desarrollo de la nanotecnología ha promovido la investigación en busca de sistemas de liberación controlada que además dirijan los fármacos a sus dianas terapéuticas. De esta manera, se consiguen mayores concentraciones intracelulares durante más tiempo, favoreciendo la respuesta farmacológica y disminuyendo los efectos adversos debidos a interacciones no deseadas. Al mismo tiempo, los transportadores protegen al fármaco de la degradación por lo que se podrían utilizar dosis más bajas y optimizar los regímenes de dosificación.

Por ello se han estudiado numerosos transportadores tanto biológicos, como pueden ser eritrocitos o vectores virales, como no biológicos, como liposomas o nanopartículas metálicas [17] (Tabla 1.2).



**Tabla 1.2.** Portadores utilizados en terapéutica antiretroviral.

Tipos de nanopartículas	Fármaco antiretroviral	Mejora frente a la formulación convencional	Ref.
Liposomas	Zidovudina	Incremento de la semivida del fármaco.	[18]
	Estavudina	Mejor captación y acumulación en los órganos del RES	[19]
Nanopartículas poliméricas	Inhibidor interacción con coreceptores	Liberación vaginal, protección del fármaco y mejora en la entrada celular	[20]
	Zidovudina	Liberación gastrointestinal para alcanzar tejidos linfoides.	[21]
	Ritonavir, lopinavir y efavirenz	Concentraciones mayores y durante más tiempo en las células del RES. Mejor eficacia.	[22,23]
	Saquinavir	Concentraciones intracelulares mayores.	[24]
	Lamivudina	Mejor vectorización y biodistribución	[25]
	Dapivirina	Mejor acceso a las células epiteliales y de la mucosa.	[26]
	Efavirenz	Mejor eficacia antiviral.	[27]
	Saquinavir	Mejor eficacia antiviral.	[27]
Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)	Estavudina	Mayores concentraciones en tejidos diana y menor hepatotoxicidad	[28]
	Zidovudina	Incremento de la semivida del fármaco.	[29]
	Indinavir	Mejor eficacia antiviral.	[30]
	Estavudina	Mejor captación y vectorización intracelular con mayores concentraciones.	[31]
	Lopinavir, ritonavir y tenofovir	Concentraciones intracelulares mayores en los tejidos linfoides e incremento de los niveles en sangre sostenidos en el tiempo.	[32]
Nanopartículas de oro	Abacavir	Mejor eficacia antirretroviral.	[33]
	Lamivudina	Mejor eficacia antirretroviral y mayor acceso a los reservorios	[34]
	Nevirapina	Mejor eficacia antirretroviral y mayor acceso a los reservorios	[34]
Eritrocitos	Zidovudina	Mayores concentraciones plasmáticas y semivida más larga	[35]

El uso de transportadores como pueden ser las nanopartículas de oro, puede ayudar a mejorar los parámetros farmacocinéticos de antirretrovirales como la estavudina, con corta semivida, buena solubilidad y grupos funcionales adecuados para su unión con las nanopartículas. A la vez, se favorece su vectorización hacia las células y regiones anatómicas que actúan como reservorios. Esto junto con una liberación controlada repercutiría en mejores regímenes de dosificación y menores efectos adversos, ayudando a una mayor adherencia por parte de los pacientes y con ello a un mejor control de la infección y evolución de la enfermedad.

#### 4. Referencias

1. Hoja informativa, noviembre de 2016 | ONUSIDA, (n.d.). <http://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet> (accessed December 21, 2016).
2. The TenoRes Study Group, Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study, *Lancet Infect. Dis.* 16 (2016) 565–575.
3. U. Gupta, N.K. Jain, Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 478–490.
4. S. Gunaseelan, K. Gunaseelan, M. Deshmukh, X. Zhang, et al. Surface modifications of nanocarriers for effective intracellular delivery of anti-HIV drugs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 518–531. doi:10.1016/j.addr.2009.11.021.
5. R. Swanstrom, J. Coffin, HIV-1 pathogenesis: the virus, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 (2012) a007443.
6. M.B. Feinberg, Changing the natural history of HIV disease, *Lancet Lond. Engl.* 348 (1996) 239–246.
7. A. Sosnik, D.A. Chiappetta, A.M. Carcaboso, Drug delivery systems in HIV pharmacotherapy: what has been done and the challenges standing ahead, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 138 (2009) 2–15.
8. UNAIDS, Global AIDS Update 2016 | UNAIDS, (n.d.). <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2016/Global-AIDS-update-2016> (accessed January 9, 2017).
9. N. Llewellyn, R. Zioni, H. Zhu, T. Andrus, Y. Xu, et al. Continued evolution of HIV-1 circulating in blood monocytes with antiretroviral therapy: genetic analysis of HIV-1 in monocytes and CD4+ T cells of patients with discontinued therapy, *J. Leukoc. Biol.* 80 (2006) 1118–1126.

10. World Health Organization (WHO), Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014, WHO. (n.d.).  
<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>  
(accessed September 23, 2015).
11. Grupo de Estudio del SIDA-SEIMC (GESIDA), *gesida-guiasclinicas-2017*, [Httpwwwgesida-Seimcorg](http://www.gesida-seimc.org). (n.d.).  
<http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/borrador/gesida-guiasclinicas-2017-br-TAR.pdf> (accessed January 11, 2017).
12. N.N. Guimarães, H.H.R. de Andrade, M. Lehmann, R.R. Dihl, et al. The genetic toxicity effects of lamivudine and stavudine antiretroviral agents, *Expert Opin. Drug Saf.* 9 (2010) 771–781.
13. J.C. Martin, M.J.M. Hitchcock, E. De Clercq, W.H. Prusoff. Early nucleoside reverse transcriptase inhibitors for the treatment of HIV: a brief history of stavudine (D4T) and its comparison with other dideoxynucleosides, *Antiviral Res.* 85 (2010) 34–38.
14. DrugBank, ed., *Stavudine*, DrugBank. (2016).  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00649> (accessed October 10, 2016).
15. A. Makinson, V.L. Moing, C. Kouanfack, C. Laurent, et al. Safety of stavudine in the treatment of HIV infection with a special focus on resource-limited settings, *Expert Opin. Drug Saf.* 7 (2008) 283–293.
16. H. Zazo, C.I. Colino, J.M. Lanao, *Current Applications of Nanoparticles in Infectious Diseases*, *J. Controlled Release.* 224 (2016) 86–102.
17. J.M. Lanao, E. Briones, C.I. Colino, Recent advances in delivery systems for anti-HIV1 therapy, *J. Drug Target.* 15 (2007) 21–36.
18. N.C. Phillips, E. Skamene, C. Tsoukas, Liposomal encapsulation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) results in decreased bone marrow toxicity and enhanced activity against murine AIDS-induced immunosuppression, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 4 (1991) 959–966.
19. M. Garg, A. Asthana, H.B. Agashe, G.P. Agrawal, et al. Stavudine-loaded mannosylated liposomes: in-vitro anti-HIV-I activity, tissue distribution and pharmacokinetics, *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 605–616.

20. A.S. Ham, M.R. Cost, A.B. Sassi, C.S. Dezzutti, et al. Targeted delivery of PSC-RANTES for HIV-1 prevention using biodegradable nanoparticles, *Pharm. Res.* 26 (2009) 502–511.
21. A. Dembri, M.-J. Montisci, J.C. Gantier, H. Chacun, et al. Targeting of 3'-Azido 3'-Deoxythymidine (AZT)-Loaded Poly(Isohexylcyanoacrylate) Nanospheres to the Gastrointestinal Mucosa and Associated Lymphoid Tissues, *Pharm. Res.* 18 (2001) 467–473.
22. C.J. Destache, T. Belgum, M. Goede, A. Shibata, et al. Antiretroviral release from poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles in mice, *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (2010) 2183–2187.
23. A. Shibata, E. McMullen, A. Pham, M. Belshan, et al. Polymeric nanoparticles containing combination antiretroviral drugs for HIV type 1 treatment, *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 29 (2013) 746–754.
24. L.K. Shah, M.M. Amiji, Intracellular delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS, *Pharm. Res.* 23 (2006) 2638–2645.
25. D. Mishra, N. Jain, V. Rajoriya, A.K. Jain. Glycyrrhizin conjugated chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of lamivudine, *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (2014) 1082–1093.
26. J. das Neves, F. Araújo, F. Andrade, J. Michiels, et al. In vitro and ex vivo evaluation of polymeric nanoparticles for vaginal and rectal delivery of the anti-HIV drug dapivirine, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 2793–2807.
27. T. Chaowanachan, E. Krogstad, C. Ball, K.A. Woodrow. Drug synergy of tenofovir and nanoparticle-based antiretrovirals for HIV prophylaxis, *PloS One.* 8 (2013) e61416.
28. S. Ghosh, L. Mondal, S. Chakraborty, B. Mukherjee. Early stage HIV management and reduction of stavudine-Induced hepatotoxicity in rats by experimentally developed biodegradable nanoparticles, *AAPS PharmSciTech.* 18 (2017) 697-709.
29. H. Heiati, R. Tawashi, R.R. Shivers, N.C. Phillips. Solid lipid nanoparticles as drug carriers. I. Incorporation and retention of the lipophilic prodrug 3'-azido-3'-deoxythymidine palmitate, *Int. J. Pharm.* 146 (1997) 123–131.

- 
30. A.N. Endsley, R.J.Y. Ho, Enhanced anti-HIV efficacy of indinavir after inclusion in CD4-targeted lipid nanoparticles, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 61 (2012) 417–424.
  31. R. Shegokar, K.K. Singh, Stavudine entrapped lipid nanoparticles for targeting lymphatic HIV reservoirs, *Pharm.* 66 (2011) 264–271.
  32. J.P. Freeling, J. Koehn, C. Shu, J. Sun, et al. Long-acting three-drug combination anti-HIV nanoparticles enhance drug exposure in primate plasma and cells within lymph nodes and blood, *AIDS Lond. Engl.* 28 (2014) 2625–2627.
  33. F. Chiodo, M. Marradi, J. Calvo, E. Yuste, et al. Glycosystems in nanotechnology: Gold glyconanoparticles as carrier for anti-HIV prodrugs, *Beilstein J. Org. Chem.* 10 (2014) 1339–1346.
  34. B.R. Dalvi, E.A. Siddiqui, A.S. Syed, S.M. Velhal, et al. Nevirapine loaded core shell gold nanoparticles by double emulsion solvent evaporation: in vitro and in vivo evaluation, *Curr. Drug Deliv.* 3 (2016) 1071-1083.
  35. E. Briones, C.I. Colino, J.M. Lanao, Study of the factors influencing the encapsulation of zidovudine in rat erythrocytes, *Int. J. Pharm.* 401 (2010) 41–46.

## OBJECTIVOS

El uso de nanopartículas como nanotransportadores de fármacos antirretrovirales, específicamente con estavudina, ha sido objeto de estudio en el presente trabajo de investigación con los siguientes objetivos:

1. Realizar un revision complete de la literatura sobre el uso de las nanopartículas en enfermedades infecciosas, tanto bacterianas, víricas, fúngicas o parasitarias.
2. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de oro (AuNP) para utilizarse como sistema de liberación controlada y vectorización de estavudina a las células inmunológicas.
3. Evaluación *in vitro* de la influencia de las propiedades de las AuNPs y tipos de estabilizadores que presenten, sobre su captación por los macrófagos.
4. Estudio farmacocinético y biodistribución de estavudina unida a nanopartículas de oro en los reservorios del VIH, como macrófagos, médula ósea, hígado, timo, bazo y cerebro.
5. Desarrollo de un modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD), para simular la farmacocinética de la estavudina y la respuesta viral usando nanopartículas de oro y optimizar los regímenes de dosificación de la estavudina.

## **CAPÍTULO 2**

---

### **Resumen**

La inadecuada respuesta farmacológica y la persistencia de la viremia en los tratamientos anti HIV ha sido atribuida a un limitado acceso de los fármacos a los grandes depósitos de células infectadas por el virus [1]. En consecuencia, se requiere investigar nuevas estrategias de vehiculación desarrolladas a partir del conocimiento de la cinética intracelular de los fármacos antirretrovirales, los factores que la modifican y condicionan su difusión y acumulación intracelular, así como las relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD).

La finalidad de esta tesis doctoral ha sido desarrollar y evaluar el uso de nanopartículas de oro (AuNP) como portadores de estavudina, con el fin de mejorar las características cinéticas del fármaco, aumentar su selectividad en el lugar de acción y poder conseguir así una mejor respuesta terapéutica.

Actualmente la nanotecnología es una de las principales líneas de investigación en busca de sistemas que permitan la vectorización y la liberación controlada de fármacos. De esta forma se pretende mejorar la eficacia de los tratamientos además de conseguir regímenes de dosificación y vías de administración más cómodos para el paciente a través del uso de sistemas nanoparticulares.

Las nanopartículas presentan numerosas aplicaciones en diversos campos. Dentro del ámbito terapéutico se está evaluando su uso como sistemas de liberación de fármacos [2] para mejorar el tratamiento de diversas enfermedades, como las infecciones. En este área se ha investigado su utilidad para solucionar la disminución de eficacia de los tratamientos antiinfecciosos convencionales debido a la aparición de diversos mecanismos de resistencia microbiana, como el incremento de microorganismos en el interior de la célula, donde muchos fármacos tienen un acceso limitado [3–5].

Existen muchos tipos de NPs que pueden clasificarse según su composición en orgánicas e inorgánicas. Las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas, así como los subtipos se encuentran recogidos en la Tabla 7.1.



**Tabla 7.1.** Ventajas e inconvenientes de los distintos tipos de nanopartículas.

Tipos	Subtipos	Ventajas	Ref	Inconvenientes	Ref
Orgánicas	Liposomas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buena compatibilidad</li> <li>• Biodegradables</li> </ul>	[6,7]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja capacidad de carga</li> <li>• Rápida degradación</li> </ul>	[8–10]
	Poliméricas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad de transporte de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxicidad por restos de solventes orgánicos del proceso de preparación</li> </ul>	
	Lipídicas sólidas				
Inorgánicas o Metálicas	Oro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se obtienen por: reducción química o procesos “verdes”</li> </ul>	[11–14]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problemas de metabolización y eliminación del organismo</li> </ul>	[15–19]
	Plata	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gran variedad de tamaños, formas, solubilidad y estabilidad.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problemas de toxicidad por restos de solventes orgánicos o microbiológicos del proceso de preparación</li> </ul>	
	Sílice				
	Titanio				
	Zinc	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buena detección mediante técnicas no invasivas</li> </ul>			
	Cobre				
	Hierro				

Las características de composición, tamaño, carga, hidrofilia, presencia de ligando etc., influyen sobre los procesos de biodistribución, captación celular y eliminación [15,17,20–26]. Además, mediante la unión de ligandos, es posible la vectorización activa a determinados tejidos o niveles subcelulares donde se alojan bacterias y virus [17,19,23, 36, 45-49, 50-59]. De este modo pueden alcanzar tejidos y/o células de difícil acceso como son los osteoblastos [27,28], los pulmones [29–31], las uniones intercelulares del estómago [32,33], distintas capas de la piel [34,35], el hígado [36] o el cerebro [37–39]. Esta vectorización permite reducir las concentraciones en tejidos no deseados, disminuyendo los efectos adversos [40–43], y aumentarlas en las dianas terapéuticas [7,42,44].

Por otro lado, una de las principales ventajas del uso de nanopartículas es el control de la cesión del fármaco, que puede ser inmediata o sostenida en el tiempo [60]. En algunos sistemas, la liberación se produce en respuesta a estímulos internos (pH, equilibrio hidrofílico/hidrofóbico, concentración de sales y/o fármaco, presencia de determinadas enzimas, etc.) [17,60–63] o externos (estímulos eléctricos, campos magnéticos o ultrasonidos, etc.) [64–66].

La capacidad de controlar la liberación junto con las propiedades mucoadhesivas de algunos de estos sistemas favorece un incremento del tiempo de residencia de los fármacos en el lugar de acción [67–69] y por tanto de su semivida [70–72]. Estos cambios en el comportamiento farmacocinético ayudan al diseño de regímenes de dosificación [73–75] y el uso de vías de administración [31,35,42,68,76–81] más cómodas para el paciente.

Otra ventaja del uso de nanopartículas como transportadores es la posibilidad de sortear algunos mecanismos de resistencia desarrollados por los patógenos, como la presencia de  $\beta$ -lactamasas [16,82], bombas de expulsión [83,84], membranas más gruesas [83,85] y barreras de biofilm [6,86]. Así, estas modificaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas permiten el uso de nuevos fármacos que de forma convencional no llegarían a la diana terapéutica.

Todas estas propiedades de las nanopartículas permiten su uso como portadores de fármacos, pero también como agentes antimicrobianos, vacunas o sistemas teranósticos. Algunas nanopartículas, como pueden ser las de plata o de quitosán, también se pueden usar directamente como agentes anti-infecciosos frente a bacterias [18,87,88] o virus

[18,89,90], presentando incluso mejor eficacia frente a cepas resistentes que los propios fármacos, transportados por nanopartículas [83].

Además, la variedad de mecanismos de acción de estos sistemas, como las alteraciones de membrana, el incremento de ROS y las alteraciones enzimáticas, disminuyen la probabilidad de desarrollo de resistencias [88,91–93].

Debido a estas características antimicrobianas de las nanopartículas metálicas, encontramos dispositivos médicos cubiertos con nanopartículas con el fin de prevenir infecciones nosocomiales y/o el desarrollo de biofilms sobre los mismos [83,94]. Se han utilizado para recubrir dispositivos como pueden ser válvulas protésicas [18,95], catéteres [94,96,97], implantes de titanio [98–100], en resinas, rellenos o cementos [101,102], y apósitos adhesivos [18,102] de los que ya hay algunos comercializados como el Acticoat™ or PolyMem Silver®.

Asimismo, dentro del campo inmunológico, las NPs han permitido mejorar la respuesta de las vacunas profilácticas, actuando como adyuvantes [106–108] y/o transportadores [103–105] para mejorar la inmunogenicidad y eficacia a largo plazo.

Por último, actualmente están en desarrollo los sistemas teranósticos que combinan propiedades diagnósticas y terapéuticas. Las nanopartículas metálicas son muy útiles en este sentido ya que debido a sus características ópticas y físicas pueden usarse con fines diagnósticos a la vez que como transportadores de principios activos [109]. Actualmente estos sistemas están en desarrollo pero ya hay algunos comercializados como Verigene®, que presentan numerosas ventajas diagnósticas frente a los convencionales [110,111].

Todos estos aspectos relacionados con el uso de las nanopartículas en enfermedades infecciosas tanto bacterianas, víricas, fúngicas y/o parasitarias, han sido recogidos en una completa revisión publicada en la revista *Journal of Controlled Release* [112] y que constituye el capítulo 2 de esta memoria.

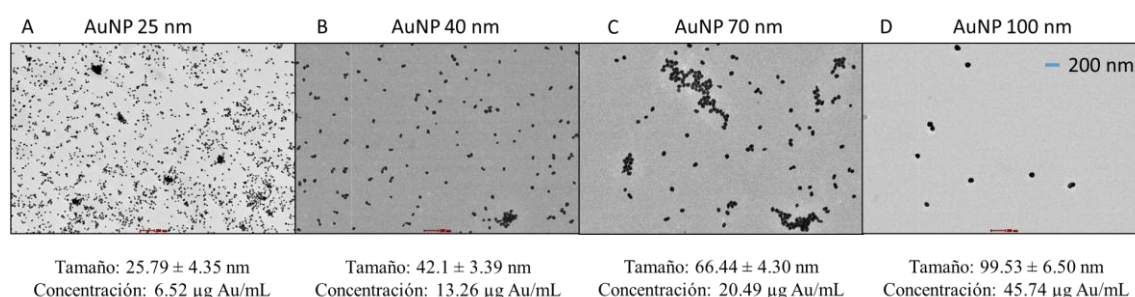
A pesar de que han pasado cerca de 20 años desde la aprobación de la primera formulación de nanopartículas como sistema de vectorización [113] y que hay una gran cantidad de estudios preclínicos, la presencia en el mercado de estos sistemas es muy limitada. Esto puede atribuirse a que los estudios preclínicos no se pueden comparar de forma sistemática, pero sobre todo a problemas de escalado, elevado precio y una deficiente regulación que dificulta su progreso e inclusión en el arsenal terapéutico [2,17,114,115].

Entre los diferentes nanosistemas, las nanopartículas de oro (AuNP) presentan algunas ventajas como facilidad de síntesis y cuantificación, diversidad de tamaños y formas, versatilidad de funcionalización, y baja toxicidad [116–119].

Su pequeño tamaño juega un papel importante tanto en la captación celular como en la cantidad de fármaco que pueden incorporar [120]. Además, de acuerdo con los diferentes estudios *in vivo*, estos sistemas presentan un mayor acceso a tejidos como el hígado, el bazo y el timo [121,122], fundamentales en las infecciones por VIH [123].

Por este motivo, el segundo objetivo de este trabajo ha sido sintetizar y caracterizar nanopartículas de oro, para el desarrollo de un sistema de vectorización y liberación controlada de un fármaco antiretroviral (estavudina), que permita un incremento del acceso del fármaco al interior de los macrófagos, reservorio natural del VIH. La metodología y resultados de este estudio se encuentran recogidos íntegramente en el capítulo 3 de esta memoria.

A partir de los métodos descritos por Turkevich [11] y Frens [12] se han sintetizado nanopartículas de oro de diferentes tamaños, desde 10 a 100 nm. Este es un procedimiento simple y rápido, en el que las nanopartículas se obtienen por nucleación del oro estabilizado por las moléculas del agente reductor [126,134]. Los átomos de oro con carga positiva, que han sido reducidos por el citrato ( $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^+$ ), se agregan y sobre ellos se adsorbe el citrato con carga negativa [120]. Así se obtienen nanopartículas estables, con forma redondeada que no se agregan de forma insoluble (Figura 7.1) y cuya concentración de oro se determinó por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.



**Figura 7.1.** Imagen de TEM de las nanopartículas de oro sintetizadas.

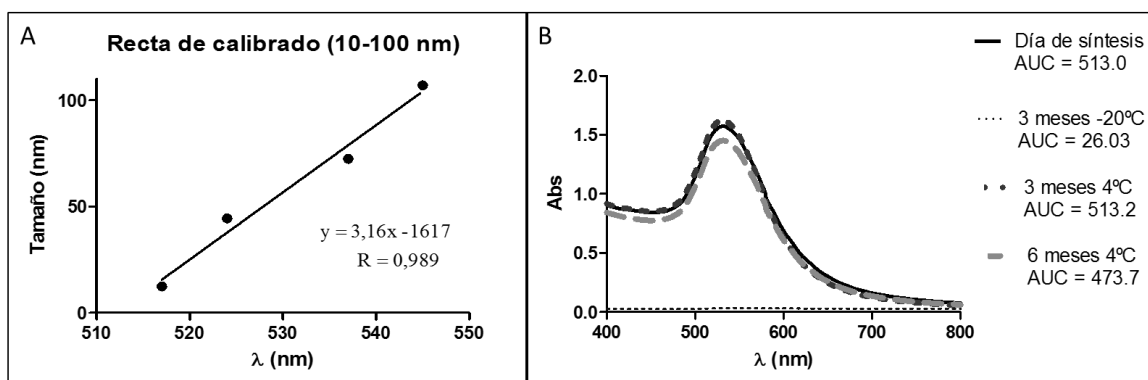
La relación entre las cantidades de oro y de agente reductor, ejerce un papel importante sobre las características de las nanopartículas [12,124]. De acuerdo a nuestros resultados, para nanopartículas entre 10 y 100 nm, hay una relación lineal e inversamente proporcional entre el diámetro y la cantidad de citrato utilizada (Tabla

7.3). Esto es debido a que grandes cantidades de citrato son capaces de recubrir la mayor superficie de las nanopartículas pequeñas, mientras que bajas cantidades recubren menor superficie y, además, requieren un mayor tiempo de síntesis [117].

El viraje de color de la solución de amarillo claro a rojo burdeos indica el final de la reacción, aunque el color final puede variar dentro de la gama de los rojos en función del tamaño de las nanopartículas (Tabla 7.3). Estas variaciones son debidas a que las nanopartículas de oro absorben, dispersan o re-emiten la luz de forma diferente en función de sus características [125]. Teniendo en cuenta la respuesta frente a la luz UV-visible, se ha desarrollado un método simple y sencillo de estimación del diámetro de las AuNPs a partir de los barridos espectrofotométricos en el UV-visible de nanopartículas de oro comerciales (Figura 7.2).

**Tabla 7.3.** Condiciones de síntesis y características de las nanopartículas.

Relación oro:citrato (w/w)	Tiempo (min)	Color	Tamaño por DLS (nm)	Tamaño por TEM (nm)	Tamaño por UV-visible (nm)	Error vs DLS (%)	Error vs TEM (%)
0,67	1,5	Rojo brillante	30,4 ± 0,60	27,39 ± 4,03	30,98	1,93	13,04
1	2	Rojo burdeos	43,44 ± 0,09	42,11 ± 3,39	45,19	4,02	7,30
1,67	4	Morado rojizo	64,62 ± 0,09	66,44 ± 4,30	70,75	9,48	6,48
2,38	10	Morado con reflejos naranjas	112,35 ± 0,38	99,53 ± 6,50	104,83	-6,40	5,32



**Figura 7.2.** A. Curva de calibración de 10 a 100 nm. B. Barrido en el UV-visible del estudio de estabilidad

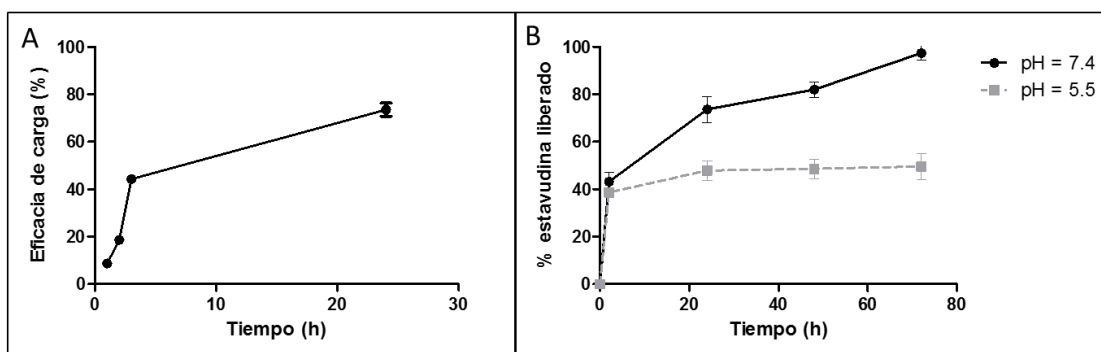
El tamaño de las nanopartículas sintetizadas se caracterizó por tres métodos: dispersión dinámica de la luz (DLS), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectrometría UV-visible.

Considerando las técnicas de DLS y TEM como las más fiables para la caracterización, a partir de sus resultados se estimó el error cometido con la espectrometría UV-visible. En todos los casos, el error de estimación fue inferior al 15 % (Tabla 7.3), tanto frente a los resultados del DLS como a los del TEM.

Se estudió la estabilidad de las nanopartículas sintetizadas a los 3 y 6 meses, en condiciones de refrigeración y congelación, mediante barrido en el UV-visible. De acuerdo a nuestros resultados, la congelación produce una fuerte agregación y precipitación de las nanopartículas. Sin embargo, en condiciones de refrigeración las nanopartículas permanecen estables hasta 6 meses: el área bajo la curva (ABC) del barrido varía menos del 10 % y tampoco se observan diferencias significativas en los máximos de absorción ( $p > 0.05$ ), (Figura 7.2).

La funcionalización de las nanopartículas de oro puede realizarse con diferentes tipos de ligandos a través de enlaces covalentes y no-covalentes [118,120]. Aunque el enlace entre el oro (Au) y el azufre (S) es el más fuerte, hay pocos fármacos con azufre en su composición, por lo que en general, se requieren cambios en la molécula [126]. Las aminas y los carboxilos, que normalmente forman parte de la estructura de los fármacos, establecen enlaces débiles con la superficie ionizada de los agregados de Au<sup>+</sup>, de forma semejante al citrato [127]. Aunque el mecanismo exacto de asociación entre los fármacos y las nanopartículas de oro no se conoce completamente, algunos autores sugieren que éstos desplazan el enlace Au-citrato [118,128]. En el caso de la estavudina se formaría un enlace entre sus grupos aminos y el oro (Au<sup>+</sup>-N<sup>-</sup>).

De acuerdo a los resultados obtenidos, este intercambio es lento ya que solo se alcanza cerca del 100% de eficacia de carga después de 24 h de incubación (Figura 7.3). El tiempo de incubación parece ser un parámetro clave para alcanzar altos porcentajes de carga (Figura 7.3.). En comparación con otros nanosistemas, como los liposomas o las nanopartículas lipídicas sólidas, el porcentaje de fármaco incorporado a las AuNPs es superior para una cantidad inicial similar [58,129,130].

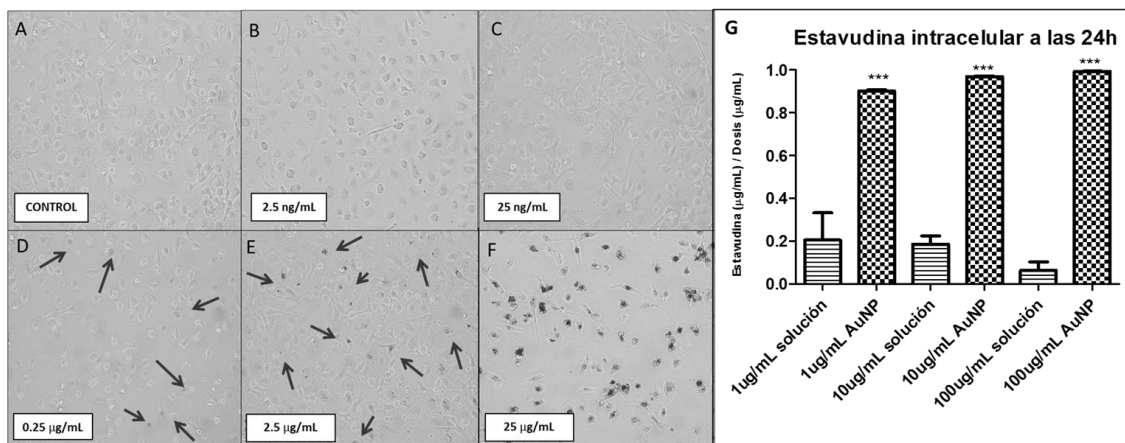


**Figura 7.3.** Eficacia de carga (A) y cinética de liberación (B) de las nanopartículas de oro

La liberación del fármaco desde las nanopartículas de oro sigue una cinética pH-dependiente que se ajusta al modelo de Korsmeyer-Peppas. Según este modelo la liberación es de tipo Fickiana [131], lo que se justifica por el efecto inicial de liberación inmediata y la alta solubilidad de la estavudina. Además, la liberación está influida por el pH del medio. En medio fisiológico se libera el 100 % del fármaco tras 72 h, mientras que en medio ácido a este mismo tiempo, únicamente se ha liberado el 50 % del fármaco incorporado inicialmente (Figura 7.3).

Una de las ventajas del uso de las nanopartículas, es su capacidad de vectorización del fármaco. Puesto que los macrófagos humanos constituyen uno de los principales reservorios del VIH, se evaluó la captación de las AuNPs por estas células.

De las cinco concentraciones de nanopartículas estudiadas, se descartó la dosis de 25  $\mu\text{g}$  Au/mL por problemas de toxicidad y la de 2.5 ng Au/mL por problemas para la observación al microscopio de las nanopartículas. En las tres concentraciones restantes, se observó una buena penetración de las nanopartículas en las células (Figura 7.4).



**Figura 7.4.** A-F. Imágenes de microscopía óptica de los cultivos de macrófagos tras 24 h de incubación con nanopartículas de oro. G. Concentraciones intracelulares de estavudina con y sin transportador. \*\*\*  $p < 0.01$

Una vez corroborada la buena penetración celular de las nanopartículas de oro, se estudió su capacidad para incrementar la concentración del fármaco a nivel intracelular. A los macrófagos se les considera responsables de la dispersión del VIH y de mantener la infección latente [132], ya que la mayoría de los fármacos no consiguen entrar en ellos y alcanzar concentraciones intracelulares óptimas. Este es el caso de la estavudina, cuya semivida intracelular y capacidad de penetración es muy baja. Sin embargo, cuando se asocia a las nanopartículas se consigue incrementar la concentración intracelular notablemente (Figura 7.4). Esto podría atribuirse a un cambio en el mecanismo de entrada en la célula.

Las características de las nanopartículas condicionan su comportamiento. Por ello, el siguiente objetivo del presente trabajo fue comparar la influencia de diversas características de las nanopartículas de oro (tamaño, concentración y agente estabilizador), sobre la capacidad de captación de los macrófagos humanos, con el fin de seleccionar el mejor transportador. Posteriormente, el transportador seleccionado se utilizó para estudiar el comportamiento cinético de entrada en la célula y la respuesta celular generada por la estavudina con y sin transportador. La metodología y resultados de este estudio *in vitro* han sido publicados en la revista *Macromolecular Bioscience* [133] y se encuentran recogidos íntegramente en el capítulo 4 de esta memoria.

Para estudiar la influencia del tamaño se utilizaron nanopartículas de oro de 10, 40 y 70 nm. Puesto que la estavudina se adhiere a la superficie de las nanopartículas [118,128], el área superficial juega un papel muy importante. De acuerdo a esto, el valor obtenido de eficacia de carga disminuye cuando aumenta el diámetro de las nanopartículas,



siendo significativamente menor para las de 70 nm (Eficaci de carga 10 nm: 76,5 %; 40 nm: 70,9 % y 70 nm: 56,9 % \* ( $p < 0.05$ )). Las NPs de menor tamaño se observan en un mayor número por lisosoma, pero también se produce una mayor agregación. Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionaron las nanopartículas de 40 nm de diámetro para los siguientes estudios.

Para evaluar la influencia del estabilizador y la carga superficial se utilizaron nanopartículas de polietilenglicol (PEG), polietilenimina ramificada (PEI) y citrato, con carga neutra, positiva y negativa, respectivamente. No se observaron diferencias respecto a la capacidad de carga, entre los distintos tipos. Sin embargo, la capacidad de captación por los macrófagos es significativamente menor en las estabilizadas por PEG. A igualdad de condiciones entre las nanopartículas de PEI y citrato, se seleccionaron estas últimas en base a su carga negativa, ya que las células infectadas por VIH se caracterizan por presentar receptores positivos [134]. Además, hay estudios en los que se observan mayores problemas de toxicidad con nanopartículas cargadas positivamente [117].

Posteriormente, se comparó la captación de la estavudina por macrófagos humanos de forma libre o unida a nanopartículas de 40 nm estabilizadas con citrato. Tras la incubación celular con los transportadores (con fármaco o sin fármaco) o la solución de fármaco, a una dosis de 10  $\mu\text{g/mL}$  de estavudina y 250 ng Au/mL, se observaron los efectos en la morfología de los macrófagos mediante microscopía. Estas concentraciones son inocuas si se incuban de forma independiente, pero tras la incubación del transportador con el fármaco, el efecto observado a estas dosis es similar al de células expuestas a elevadas concentraciones de estavudina en solución.

Esto se corroboró con la cuantificación por UHPLC de la penetración de estavudina en las células, obteniéndose una mayor concentración intracelular del fármaco a todos los tiempos estudiados. De forma semejante a lo observado en el capítulo 3, la estavudina accedería al interior de las células siguiendo la misma cinética y/o mecanismo de entrada que las nanopartículas.

Para conocer mejor el efecto del conjugado, también se evaluó o determinó la expresión de moléculas inflamatorias claves de los macrófagos. Según estos resultados se puede observar una fuerte relación concentración-dependiente de la actividad proinflamatoria de la IL1 $\beta$  tras la incubación con los transportadores.

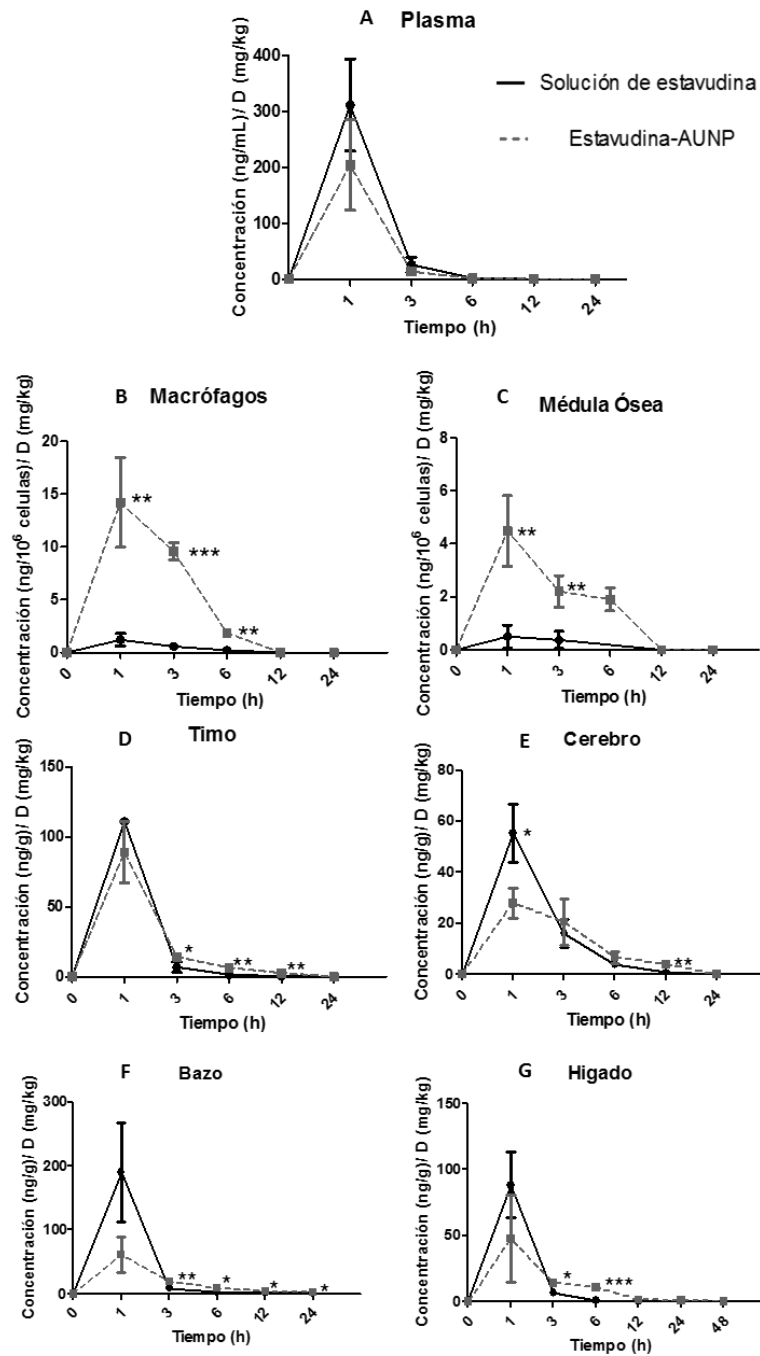
En cambio, tras la incubación con el fármaco o las nanopartículas de forma independiente se observa una menor expresión de IL1 $\beta$ . En el caso de la expresión de IL10, que inhibe la acción de numerosas células inmunológicas, no se observaron cambios significativos.

De acuerdo con estos resultados, se puede afirmar que el sistema de liberación de estavudina desarrollado, utilizando nanopartículas de oro, favorece el acceso del fármaco a reservorios como los macrófagos. Sin embargo, la biodistribución es un proceso complejo y el comportamiento *in vivo* puede diferir del comportamiento *in vitro*. Así, el cuarto objetivo de esta tesis doctoral ha consistido en un estudio *in vivo* para conocer la farmacocinética y la biodistribución de la estavudina incorporada en nanopartículas de oro, en animales de experimentación. La metodología y resultados de este estudio se encuentran recogidos íntegramente en el capítulo 5 de esta memoria.

Debido a la ausencia de resultados concluyentes respecto la toxicidad de las nanopartículas de oro, la selección de su dosis en este estudio se basó en la cantidad de oro administrada tanto en estudios similares como en estudios de toxicidad aguda y crónica [145–148].

Al comparar los resultados del grupo que recibió las nanopartículas de oro frente al grupo control se observó una ligera disminución, sin significación estadística ( $p > 0,05$ ), en las concentraciones plasmáticas pero un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) en las concentraciones en el resto de los tejidos (Figura 7.9). Esto podría sugerir una acumulación del fármaco en los tejidos estudiados gracias al uso de las nanopartículas de oro como sistema de vectorización del fármaco.

Respecto a los parámetros cinéticos estimados, en la mayoría de los tejidos se observó un incremento en el  $ABC_0^\infty$  con el uso de las nanopartículas. Este incremento resultó ser estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ) en macrófagos, médula ósea e hígado (Tabla 7.4), tejidos que han sido caracterizados como reservorios del VIH por presentar residuos detectables de viremia incluso durante el tratamiento con HAART [139]. Por esta razón, la acumulación de altas concentraciones de estavudina en estos tejidos puede ayudar a eliminar el virus, responsable de las recaídas y cronicidad del VIH, sin aumentar los efectos adversos del fármaco.



**Figura 7.9.** Niveles de stavudina en plasma, macrófagos y tejidos tras la administración del fármaco en solución o incorporado en nanopartículas. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Estos cambios en las concentraciones tisulares indican diferencias en la biodistribución del fármaco cuando se administra incorporado en nanopartículas de oro. En el grupo control, el coeficiente de reparto (P) de stavudina ordenado de mayor a menor fue: bazo > timo > hígado  $\approx$  cerebro > macrófagos > médula ósea.

Sin embargo, con la estavudina incorporada en nanopartículas el coeficiente de reparto obtenido fue: hígado > bazo > timo > cerebro > médula ósea  $\approx$  macrófagos. Estos resultados demuestran que la administración de estavudina-AuNP incrementa el valor de P principalmente en la médula ósea, los macrófagos y el hígado (Figura 7.9), corroborando así el efecto de vectorización de las nanopartículas.

La administración de las nanopartículas de estavudina también produjo modificaciones en el tiempo medio de residencia (TMR) y la semivida del fármaco ( $t_{1/2}$ ). De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 7.4, la formulación de estavudina unida a nanopartículas presenta, para estos dos parámetros, valores superiores en la mayoría de los tejidos estudiados. Este incremento es especialmente alto en la médula ósea y el hígado, importantes dianas del VIH, pero también en el timo y en el cerebro.

En la bibliografía podemos encontrar comportamientos semejantes con nanopartículas de oro y otros fármacos antirretrovirales. Por ejemplo, la administración de nevirapina-AuNP incrementó las concentraciones y los tiempos de residencia del fármaco en el hígado y el bazo, pero a diferencia de la estavudina, el incremento en la médula ósea fue muy pequeño [140].

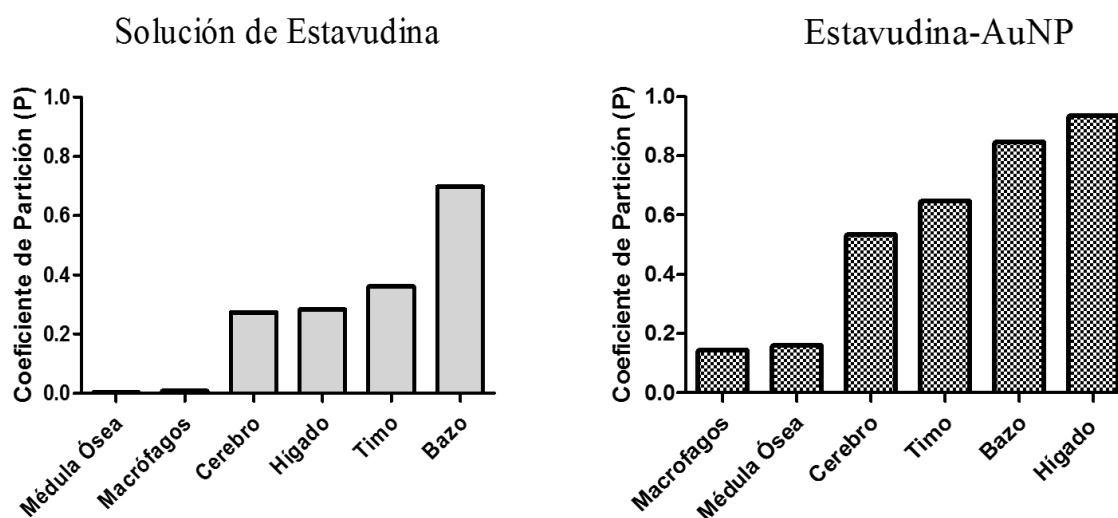
Otros estudios realizados con nanopartículas poliméricas, liposomas o nanopartículas sólidas lipídicas administradas por vía i.v, también observaron un incremento del  $ABC_0^\infty$  principalmente en sangre y bazo [129,141,142], pero no se detectó fármaco en cerebro ni timo [142]. Así, en comparación con las nanopartículas metálicas, las nanopartículas orgánicas necesitan ligandos específicos, como la transferrina, para incrementar las concentraciones de fármaco en el cerebro [56].

Con estos resultados se puede concluir que el uso de nanopartículas de oro incrementa el acceso y tiempo de residencia de la estavudina a reservorios del VIH como la médula ósea, los macrófagos y el hígado. Dado que estos cambios farmacocinéticos pueden ayudar a mejorar la supresión del VIH, el siguiente objetivo fue realizar un estudio que permitiera evaluar la repercusión farmacodinámica de la utilización de estos sistemas nanoparticulares.

**Tabla 7.4.** Parámetros farmacocinéticos de estavudina obtenidos en el grupo control y en el grupo que recibió las nanopartículas de oro.

Muestra Biológica	Grupo	ABC <sub>0∞</sub> *	TMR (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	P
Plasma	Control	534,67	1,28	0,74	1
	Estavudina-AuNP	342,56	1,25	0,88	1
Macrófagos	Control	4,26	3,36	2,16	0,01
	Estavudina-AuNP	49,58	2,70	1,28	0,14
Médula ósea	Control	1,69	2,12	0,53	0,003
	Estavudina-AuNP	54,77	20,19	14,44	0,16
Timo	Control	192,79	1,61	3,28	0,36
	Estavudina-AuNP	221,30	3,58	4,36	0,65
Cerebro	Control	146,58	2,62	2,59	0,27
	Estavudina-AuNP	182,92	8,85	7,98	0,53
Bazo	Control	373,26	5,89	16,54	0,70
	Estavudina-AuNP	290,13	11,96	13,35	0,85
Higado	Control	151,27	1,30	0,96	0,28
	Estavudina-AuNP	320,84	23,20	23,10	0,94

\* unidades de ABC: plasma: (ng\*h/mL)/(mg/kg); macrófagos y médula ósea: ((ng\*h/10<sup>6</sup> cells)/(mg/kg)); resto de tejidos: ((ng\*h/g)/(mg/kg))



**Figura 7.9.** Coeficientes de reparto (P) en cada tejido para cada tipo de formulación.

Aprovechando las ventajas de los estudios *in silico*, se desarrolló un modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) para el estudio, mediante simulación de Monte Carlo, de la farmacocinética y la respuesta antiviral de la estavudina en tratamientos crónicos con y sin nanopartículas de oro. La metodología y resultados de este estudio han sido publicados en el libro *Monte Carlo Simulation: Methods, Assessment and Applications* [143] y se encuentran recogidos íntegramente en el capítulo 6 de esta memoria.

Desde hace unos años, las guías europeas sobre temas regulatorios consideran las herramientas de modelización como medios muy útiles en la evaluación de nuevos sistemas farmacológicos [144]. Los modelos PK/PD permiten la integración de datos clínicos y preclínicos para evaluar la eficacia de nuevos tratamientos y otras hipótesis (probabilidad de resistencias, toxicidad, etc) previo al desarrollo de los estudios clínicos. Partiendo de modelos matemáticos, el uso de herramientas como la simulación de Monte Carlo ayuda a representar de forma probabilística todo el proceso, teniendo en cuenta la incertidumbre y variabilidad de los distintos parámetros. De esta forma pueden relacionarse datos preclínicos con datos clínicos para obtener información que asegure un mejor diseño de posteriores estudios clínicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios previos (capítulos 3-5), el comportamiento cinético de la estavudina difiere en función de su formulación, modificando diversos parámetros farmacocinéticos que influirán sobre la respuesta farmacológica. Mediante el uso de herramientas de simulación, podemos hacer una predicción de la respuesta farmacológica derivada del tratamiento con nanopartículas utilizando un modelo integrado PK/PD de la infección por VIH.

A partir de un modelo farmacocinético monocompartimental abierto, con eliminación de primer orden y administración oral e i.v se estimaron las concentraciones de fármaco (en solución, unido a nanopartículas y liberado de las nanopartículas) a nivel sanguíneo e intracelular en los macrófagos (Tabla 7.5). Estas concentraciones se relacionaron con el comportamiento farmacodinámico a través del modelo de Hill (Tabla 7.5), para poder predecir la inhibición de la replicación del virus producida por la estavudina. Por último, a partir de un modelo matemático que describe el curso completo de la infección por VIH [145] se estimaron tanto los niveles de células T como de macrófagos, infectadas y no infectados, además de la carga viral total (Tabla 7.5).

**Tabla 7.5.** Ecuaciones del modelo PK/PD de estavudina en solución y unida a nanopartículas.

Modelo	Estavudina en solución	Estavudina-AuNP	Estavudina libre de las AuNP	
PK	Absorción	$dAC/dt = -K_a * AC$ $C.Initial = Dose/V_d$		
	En sangre por vía oral	$dSC/dt = (K_a * AC) - ((K_{in\_Drug} + K_e) * SC)$		
	Concentración en sange por vía i.v	$dSC/dt = - ((K_{in} + K_e) * SC)$ $C.Initial = Dose/V_d$	$dNP-SC/dt = -((K_{rel}/((Time)^{b_{rel}})) + (K_{in\_NP} / ((Time)^{b_{in}})) * NP-SC.$ $C.Initial = Dose\_NP/V_d$	$dDrug-SC/dt = (K_{rel}/((Time)^{b_{rel}})) * NP-SC) - ((K_{in} + K_e) * Drug\_SC)$
	Concentración en macrófagos	$dMC/dt = (K_{in} * SC) * (V_d/V_i) - (K_{e_i} * MC)$	$dNP-MC/dt = ((K_{in\_NP}/((Time)^{b_{in}})) * NP-SC) * (V_d/V_i) - ((K_{rel}/((Time)^{b_{rel}})) * NP-MC).$	$dDrug-MC/dt = ((K_{in\_fco} * F_{co\_SC} * (V_e/V_i)) + ((K_{rel}/((Time)^{b_{rel}})) * NP-MC)) - (K_{e\_i} * Drug-MC).$
Inhibición	Células T		$INH = (I_{max} * (SC)^y) / (IC_{50}^y + (SC)^y)$	
	Macrófagos		$INH_M = (I_{max} * (MC)^y) / (IC_{50_m}^y + (MC)^y)$	
PD	Células T		$T = (dT * T_o) - [(dT * T) + ((K_t * T * V) * (1 - INH))]$ $T_i = ((K_t * T * V) * (1 - INH)) - (dTi * Ti)$	
	Macrófagos		$M = (dM * M_o) - [(dM * M) + ((K_{mac} * M * V) * (1 - INH))]$ $M_i = ((K_m * M * V) * (1 - INH_M)) - (dMi * Mi)$	
	Carga Viral		$V = [(P_T * Ti) + (P_M * Mi)] - [(c * V)]$	

Significado de cada símbolo al final en el glosario.

De acuerdo a los resultados de la simulación farmacocinética, el tratamiento con nanopartículas disminuye las concentraciones séricas y sus fluctuaciones. Esto es debido a la liberación controlada del fármaco desde las nanopartículas que además favorece una menor probabilidad de desarrollo de resistencias [146]. Esta variación en la cinética permitiría el uso de dosis más altas sin alcanzar la concentración sérica máxima aceptada (3,2 mg/mL [147]). Por ejemplo, se podría utilizar la dosis de 2 mg/kg/día descartada inicialmente en los estudios randomizados de fase II [148].

A nivel intracelular, las concentraciones de fármaco en los macrófagos aumentan, debido a que las nanopartículas presentan distinta cinética de captación que el fármaco en solución.

Respecto a los resultados de la simulación farmacodinámica, se observa como la media de la carga viral total utilizando estavudina-AuNP es mucho menor durante la mayor parte del tratamiento (Figura 7.12). Algo similar ocurre con la carga viral procedente de los macrófagos.

A los 7 años de tratamiento, la probabilidad de tener una elevada carga viral es menor con los tratamientos con nanopartículas que con el tratamiento convencional. Si comparamos los regímenes equivalentes (40 mg/ 12 h) con y sin nanopartículas, el uso de estas reduce de forma notoria la probabilidad de exceder una carga viral elevada. Al comparar los distintos regímenes de dosificación con nanopartículas, observamos que la administración de la misma dosis una vez (80 mg/ 24 h) o dos veces al día (40 mg/ 12 h) presenta probabilidades similares de reducir la carga viral, por lo que el régimen de dosificación más adecuado sería el de una administración única diaria, que es más cómodo para el paciente y no alcanza la concentración máxima recomendada (3,2 ng/mL [147]). En cambio, con el doble de dosis (80 mg/ 12 h), sigue sin alcanzarse dicha concentración máxima y se disminuye la probabilidad de elevada carga viral. Como la diferencia de probabilidad de carga viral entre el régimen de 80 mg/ 12 h y el de 80 mg/ 24 h no es muy elevada, se podría considerar el régimen de dosificación de 80 mg/ 24 h con nanopartículas como el más adecuado, considerando la potencial reducción de efectos adversos y la comodidad para el paciente.

El principal problema de la infección por VIH es el deterioro del sistema inmune que favorece la aparición de patógenos oportunistas. Por ello el tratamiento antirretroviral debe mantener niveles de células T superiores a 500 células/ $\mu$ L durante el mayor tiempo



posible [149]. Estos valores se han estimado a los 3, 6 y 10 años con el tratamiento convencional y con el recomendado con nanopartículas.

Al compararlos observamos que, incluso después de 10 años de tratamiento, la probabilidad de superar este número de células es entorno al 50% con el tratamiento con nanopartículas. De manera similar los niveles de macrófagos se mantienen durante los 10 años de tratamiento.

Estos buenos niveles de células inmunológicas repercuten sobre la carga viral total, de forma que la probabilidad de alcanzar una carga viral considerada sintomática con el tratamiento de nanopartículas es menor que con el tratamiento convencional. Esta menor probabilidad se observa durante todo el tratamiento, alcanzando las mayores diferencias a los 10 años, donde la probabilidad se reduce hasta casi la mitad que con el tratamiento convencional.

Debemos tener en cuenta, que este modelo se ha desarrollado a partir de algunos datos preclínicos, y que el modelo matemático no describe completamente todos los mecanismos y reacciones responsables del comportamiento y efectos del fármaco y/o del virus.

En resumen, el uso de las nanopartículas permite incrementar la concentración del fármaco dentro de los reservorios, consiguiendo a la vez una liberación sostenida que permite un mejor control de la infección durante tiempos prolongados. Además, las concentraciones séricas más bajas podrían repercutir en un descenso de los efectos adversos, por lo que de acuerdo a la simulación probabilística el tratamiento con estavudina unida a las nanopartículas es una terapia prometedora tanto a nivel de eficacia como de conciliación con el paciente.

Los pasos a seguir en el futuro serán la realización de estudios *in vivo* en un modelo de infección experimental, para corroborar los resultados farmacodinámicos observados en el estudio *in silico*.

## Referencias

1. F. Maldarelli, Targeting viral reservoirs: ability of antiretroviral therapy to stop viral replication, *Curr. Opin. HIV AIDS*. 6 (2011) 49–56.
2. K. James, J. Highsmith, P. Evers. NANOTECHNOLOGY MARKET - Nanotechnology Markets in Healthcare & Medicine, *Drug Development & Delivery*. 11/12 (2014) 43-45.

3. M.N. Alekshun, S.B. Levy, Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance, *Cell*. 128 (2007) 1037–1050.
4. B. Katz, K. Waites. Emerging intracellular bacterial infections, *Clin. Lab. Med.* 24 (2004) 627–649.
5. E. Briones, C. I. Colino, J.M. Lanao. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells, *J. Controlled Release*. 125 (2008) 210–227.
6. K. Forier, K. Raemdonck, S.C. De Smedt, J. Demeester, et al. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms, *J. Controlled Release*. 190 (2014) 607–623.
7. S. Xie, Y. Tao, Y. Pan, W. Qu, et al. Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents, *J. Controlled Release*. 187 (2014) 101–117.
8. U. Gupta, N.K. Jain. Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 478–490.
9. R. Mehendale, M. Joshi, V.B. Patravale. Nanomedicines for Treatment of Viral Diseases, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 30 (2013).
10. S. Doktorovova, E.B. Souto, A.M. Silva. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – A systematic review of in vitro data, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87 (2014) 1–18.
11. J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier. The formation of colloidal gold, *J. Phys. Chem.* 57 (1953) 670–673.
12. G. Frens. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature*. 241 (1973) 20–22.
13. N.I. Hulkoti, T.C. Taranath. Biosynthesis of nanoparticles using microbes- a review, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 121 (2014) 474–483.
14. S. Iravani. Bacteria in nanoparticle synthesis: current status and future prospects, *Int. Sch. Res. Not.* 2014 (2014) e359316.
15. T. Borel, C.M. Sabliov. Nanodelivery of bioactive components for food applications: types of delivery systems, properties, and their effect on ADME profiles and toxicity of nanoparticles, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5 (2014) 197–213.
16. Y. Zhao, X. Jiang. Multiple strategies to activate gold nanoparticles as antibiotics, *Nanoscale*. 5 (2013) 8340–8350.

17. N. Bertrand, J.-C. Leroux. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective, *J. Controlled Release*. 161 (2012) 152–163.
18. L. Ge, Q. Li, M. Wang, J. Ouyang, et al. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity, *Int. J. Nanomedicine*. 9 (2014) 2399–2407.
19. S.D. Mahajan, R. Aalinkeel, W.-C. Law, J.L. Reynolds, et al. Anti-HIV-1 nanotherapeutics: promises and challenges for the future, *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 5301–5314.
20. G. Mohammadi, A. Nokhodchi, M. Barzegar-Jalali, F. Lotfipour, et al. Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 88 (2011) 39–44.
21. I.A. Wani, T. Ahmad. Size and shape dependant antifungal activity of gold nanoparticles: A case study of *Candida*, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 101 (2013) 162–170.
22. S. Hirn, M. Semmler-Behnke, C. Schleh, A. Wenk, et al. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77 (2011) 407–416.
23. C.J. Cheng, G.T. Tietjen, J.K. Saucier-Sawyer, W.M. Saltzman. A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 239–247.
24. M. Abdulkarim, N. Agulló, B. Cattoz, P. Griffiths, et al. Nanoparticle diffusion within intestinal mucus: Three-dimensional response analysis dissecting the impact of particle surface charge, size and heterogeneity across polyelectrolyte, pegylated and viral particles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97, Part A (2015) 230–238.
25. F. Chellat, Y. Merhi, A. Moreau, L. Yahia. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting, *Biomaterials*. 26 (2005) 7260–7275.
26. N. Oh, J.-H. Park. Surface chemistry of gold nanoparticles mediates their exocytosis in macrophages, *ACS Nano*. 8 (2014) 6232–6241.
27. R.R. Pillai, S.N. Somayaji, M. Rabinovich, M.C. Hudson, et al. Nafcillin-loaded PLGA nanoparticles for treatment of osteomyelitis, *Biomed. Mater.* 3 (2008) 034114.

28. K.-T. Peng, C.-F. Chen, I.-M. Chu, Y.-M. Li, et al. Treatment of osteomyelitis with teicoplanin-encapsulated biodegradable thermosensitive hydrogel nanoparticles, *Biomaterials*. 31 (2010) 5227–5236.
29. M. Alipour, M. Halwani, A. Omri, Z.E. Suntres. Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant Gram-negative bacterial strains, *Int. J. Pharm.* 355 (2008) 293–298.
30. Q. (Tony) Zhou, S.S.Y. Leung, P. Tang, T. Parumasivam, et al. Inhaled formulations and pulmonary drug delivery systems for respiratory infections, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 85 (2015) 83–99.
31. M.M. Mehanna, S.M. Mohyeldin, N.A. Elgindy. Respirable nanocarriers as a promising strategy for antitubercular drug delivery, *J. Controlled Release*. 187 (2014) 183–197.
32. S. Harsha. Dual drug delivery system for targeting *H. pylori* in the stomach: preparation and in vitro characterization of amoxicillin-loaded Carbopol® nanospheres, *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 4787–4796. doi:10.2147/IJN.S34312.
33. D. Lopes, C. Nunes, M.C.L. Martins, B. Sarmento, et al. Eradication of *Helicobacter pylori*: Past, present and future, *J. Controlled Release*. 189 (2014) 169–186.
34. J. Pandit, M. Garg, N.K. Jain. Miconazole nitrate bearing ultraflexible liposomes for the treatment of fungal infection, *J. Liposome Res.* 24 (2014) 163–169.
35. A.H. Alomrani, G.A. Shazly, A.A. Amara, et al. Itraconazole-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin loaded deformable liposomes: In vitro skin penetration studies and antifungal efficacy using *Candida albicans* as model, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 121 (2014) 74–81.
36. S. Kawakami, M. Hashida. Glycosylation-mediated targeting of carriers, *J. Controlled Release*. 190 (2014) 542–555.
37. M. Ali, M. Afzal, S.M. Bhattacharya, et al. Nanopharmaceuticals to target antifilarials: a comprehensive review, *Expert Opin. Drug Deliv.* 10 (2013) 665–678.
38. S.D. Mahajan, I. Roy, G. Xu, et al. Enhancing the delivery of anti retroviral drug “Saquinavir” across the blood brain barrier using nanoparticles, *Curr. HIV Res.* 8 (2010) 396–404.

39. Y.-C. Kuo, H.-F. Ko, Targeting delivery of saquinavir to the brain using 83-14 monoclonal antibody-grafted solid lipid nanoparticles, *Biomaterials*. 34 (2013) 4818–4830.
40. D. Mishra, N. Jain, V. Rajoriya, et al. Glycyrrhizin conjugated chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of lamivudine, *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (2014) 1082–1093.
41. J.L. Italia, M.M. Yahya, D. Singh, et al. Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous Fungizone®, *Pharm. Res.* 26 (2009) 1324–1331. doi:10.1007/s11095-009-9841-2.
42. N.P. Aditya, P.G. Vathsala, V. Vieira, R.S.R. Murthy, et al. Advances in nanomedicines for malaria treatment, *Adv. Colloid Interface Sci.* 201–202 (2013) 1–17.
43. T.G. Ribeiro, J.R. Franca, L.L. Fuscaldi, M.L. Santos, et al. An optimized nanoparticle delivery system based on chitosan and chondroitin sulfate molecules reduces the toxicity of amphotericin B and is effective in treating tegumentary leishmaniasis, *Int. J. Nanomedicine*. 9 (2014) 5341–5353.
44. B.J. Edagwa, D. Guo, P. Puligujja, H. Chen, et al. Long-acting antituberculous therapeutic nanoparticles target macrophage endosomes, *FASEB J.* 28 (2014) 5071–5082.
45. G.K. Saraogi, B. Sharma, B. Joshi, P. Gupta, et al. Mannosylated gelatin nanoparticles bearing isoniazid for effective management of tuberculosis, *J. Drug Target.* 19 (2011) 219–227.
46. V. Gajbhiye, N. Ganesh, J. Barve, N.K. Jain. Synthesis, characterization and targeting potential of zidovudine loaded sialic acid conjugated-mannosylated poly(propyleneimine) dendrimers, *Eur. J. Pharm. Sci.* 48 (2013) 668–679.
47. A.N. Endsley, R.J.Y. Ho. Enhanced anti-HIV efficacy of indinavir after inclusion in CD4-targeted lipid nanoparticles, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999. 61 (2012) 417–424.
48. N. Marasini, M. Skwarczynski, I. Toth. Oral delivery of nanoparticle-based vaccines, *Expert Rev. Vaccines*. 13 (2014) 1361–1376.
49. E. van Riet, A. Aina, T. Suzuki, G. Kersten, et al. Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 74 (2014) 28–34.

50. S.M. Farkhani, A. Valizadeh, H. Karami, S. Mohammadi, et al. Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules, *Peptides*. 57 (2014) 78–94.
51. J.S. Bahnsen, H. Franzyk, A. Sandberg-Schaal, H.M. Nielsen. Antimicrobial and cell-penetrating properties of penetratin analogs: Effect of sequence and secondary structure, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828 (2013) 223–232.
52. K.J. Longmuir, R.T. Robertson, S.M. Haynes, J.L. Baratta, et al. Effective targeting of liposomes to liver and hepatocytes in vivo by incorporation of a plasmodium amino acid sequence, *Pharm. Res.* 23 (2006) 759–769.
53. J. Kreuter. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 71 (2014) 2–14.
54. N. Xu, J. Gu, Y. Zhu, H. Wen, et al. Efficacy of intravenous amphotericin B-polybutylcyanoacrylate nanoparticles against cryptococcal meningitis in mice, *Int. J. Nanomedicine*. 6 (2011) 905–913.
55. R. Löbenberg, L. Araujo, H. von Briesen, E. Rodgers, et al. Body distribution of azidothymidine bound to hexyl-cyanoacrylate nanoparticles after i.v. injection to rats, *J. Controlled Release*. 50 (1998) 21–30.
56. V. Mishra, S. Mahor, A. Rawat, P.N. Gupta, et al. Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored pegylated albumin nanoparticles, *J. Drug Target*. 14 (2006) 45–53.
57. Y. Gupta, A. Jain, S.K. Jain. Transferrin-conjugated solid lipid nanoparticles for enhanced delivery of quinine dihydrochloride to the brain, *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (2007) 935–940.
58. Y.-C. Kuo, C.-Y. Chung. Solid lipid nanoparticles comprising internal Compritol 888 ATO, tripalmitin and cacao butter for encapsulating and releasing stavudine, delavirdine and saquinavir, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 88 (2011) 682–690.
59. Y. Cong, C. Quan, M. Liu, J. Liu, et al. Alendronate-decorated biodegradable polymeric micelles for potential bone-targeted delivery of vancomycin, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 26 (2015) 629–643.
60. P. Bawa, V. Pillay, Y.E. Choonara, L.C. du Toit. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery, *Biomed. Mater.* 4 (2009) 022001.

61. C.-H. Chang, Y.-H. Lin, C.-L. Yeh, Y.-C. Chen, et al. Nanoparticles incorporated in pH-sensitive hydrogels as amoxicillin delivery for eradication of *Helicobacter pylori*, *Biomacromolecules*. 11 (2010) 133–142.
62. J.S. Park, T.H. Han, K.Y. Lee, S.S. Han, et al. N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: Endocytosis, exocytosis and drug release, *J. Controlled Release*. 115 (2006) 37–45.
63. T. Zhang, T.F. Sturgis, B.-B.C. Youan. PH-responsive nanoparticles releasing tenofovir intended for the prevention of HIV transmission, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79 (2011) 526–536.
64. E. Addae, X. Dong, E. McCoy, C. Yang, et al. Investigation of antimicrobial activity of photothermal therapeutic gold/copper sulfide core/shell nanoparticles to bacterial spores and cells, *J. Biol. Eng.* 8 (2014) 11.
65. X. Hua, S. Tan, H.M.H.N. Bandara, Y. Fu, et al. Externally controlled triggered-release of drug from PLGA micro and nanoparticles, *PLOS ONE*. 9 (2014) e114271.
66. M. Yin, Z. Li, E. Ju, Z. Wang, et al. Multifunctional upconverting nanoparticles for near-infrared triggered and synergistic antibacterial resistance therapy, *Chem. Commun.* 50 (2014) 10488–10490.
67. M. Klinger-Strobel, C. Lautenschläger, D. Fischer, J.G. Mainz, et al. Aspects of pulmonary drug delivery strategies for infections in cystic fibrosis – where do we stand?, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 1351–1374.
68. Y.S. Chhonker, Y.D. Prasad, H. Chandasana, A. Vishvkarma, et al. Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 1451–1458.
69. K. Hadinoto, W.S. Cheow. Nano-antibiotics in chronic lung infection therapy against *Pseudomonas aeruginosa*, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 116 (2014) 772–785.
70. C.J. Destache, T. Belgum, M. Goede, A. Shibata, et al. Antiretroviral release from poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles in mice, *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (2010) 2183–2187.
71. P.K. Gupta, A.K. Jaiswal, S. Asthana, A. Verma, et al. Self assembled ionically sodium alginate cross-linked amphotericin B encapsulated glycol chitosan stearate nanoparticles: applicability in better chemotherapy and non-toxic delivery in visceral leishmaniasis, *Pharm. Res.* 32 (2015) 1727–1740.

72. H.K. Ibrahim, I.S. El-Leithy, A.A. Makky. Mucoadhesive nanoparticles as carrier systems for prolonged ocular delivery of gatifloxacin/prednisolone bitherapy, *Mol. Pharm.* 7 (2010) 576–585.
73. M. Owais, G.C. Varshney, A. Choudhury, S. Chandra, et al. Chloroquine encapsulated in malaria-infected erythrocyte-specific antibody-bearing liposomes effectively controls chloroquine-resistant *Plasmodium berghei* infections in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 180–184.
74. D.P. Gnanadhas, M. Ben Thomas, M. Elango, A.M. Raichur, et al. Chitosan–dextran sulphate nanocapsule drug delivery system as an effective therapeutic against intraphagosomal pathogen *Salmonella*, *J. Antimicrob. Chemother.* 68 (2013) 2576–2586.
75. M. Kaur, T. Garg, G. Rath, A.K. Goyal. Current nanotechnological strategies for effective delivery of bioactive drug molecules in the treatment of tuberculosis, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 31 (2014).
76. R. Parboosing, G.E.M. Maguire, P. Govender, H.G. Kruger. Nanotechnology and the treatment of HIV infection, *Viruses.* 4 (2012) 488–520.
77. P.A. Patel, V.B. Patravale, AmbiOnp: solid lipid nanoparticles of amphotericin B for oral administration, *J. Biomed. Nanotechnol.* 7 (2011) 632–639.
78. S.S. Dodiya, S.S. Chavhan, K.K. Sawant, A.G. Korde. Solid lipid nanoparticles and nanosuspension formulation of Saquinavir: preparation, characterization, pharmacokinetics and biodistribution studies, *J. Microencapsul.* 28 (2011) 515–527.
79. D.A. Chiappetta, C. Hocht, J.A. Opezzo, A. Sosnik. Intranasal administration of antiretroviral-loaded micelles for anatomical targeting to the brain in HIV, *Nanomed.* 8 (2012) 223–237.
80. F. Andrade, D. Rafael, M. Videira, D. Ferreira, et al. Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1816–1827.
81. W.S. Cheow, M.W. Chang, K. Hadinoto. Antibacterial efficacy of inhalable antibiotic-encapsulated biodegradable polymeric nanoparticles against *E. coli* biofilm cells, *J. Biomed. Nanotechnol.* 6 (2010) 391–403.
82. A.N. Brown, K. Smith, T.A. Samuels, J. Lu, et al. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*



- and *Enterobacter aerogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 2768–2774. doi:10.1128/AEM.06513-11.
83. R.Y. Pelgrift, A.J. Friedman. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1803–1815.
84. N. Shaik, G. Pan, W.F. Elmquist. Interactions of pluronic block copolymers on P-gp efflux activity: Experience with HIV-1 protease inhibitors, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 5421–5433.
85. S.P. Chakraborty, S.K. Sahu, P. Pramanik, S. Roy. In vitro antimicrobial activity of nanoconjugated vancomycin against drug resistant *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Pharm.* 436 (2012) 659–676.
86. A. Baelo, R. Levato, E. Julián, A. Crespo, et al. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections, *J. Controlled Release.* 209 (2015) 150–158.
87. A.J. Huh, Y.J. Kwon. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era, *J. Controlled Release.* 156 (2011) 128–145.
88. R. Singh, M.S. Smitha, S.P. Singh. The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14 (2014) 4745–4756.
89. D. Xiang, Y. Zheng, W. Duan, X. Li, et al. Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo, *Int. J. Nanomedicine.* (2013).8:4103-13.
90. M. Rai, S.D. Deshmukh, A.P. Ingle, I.R. Gupta, et al. Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection, *Crit. Rev. Microbiol.* 42 (2016) 46–56.
91. C.-W. Chen, C.-Y. Hsu, S.-M. Lai, W.-J. Syu, et al. Metal nanobullets for multidrug resistant bacteria and biofilms, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 78 (2014) 88–104.
92. G. Singh, P.K. Babele, S.K. Shahi, R.P. Sinha, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using cell extracts of *Anabaena doliolum* and screening of its antibacterial and antitumor activity, *J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2014) 1354–1367.
93. P. Szweda, K. Gucwa, E. Kurzyk, E. Romanowska, et al. Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* clinical isolates, *Indian J. Microbiol.* 55 (2015) 175–183.

94. M. Pollini, F. Paladini, M. Catalano, A. Taurino, et al. Antibacterial coatings on haemodialysis catheters by photochemical deposition of silver nanoparticles, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 2005–2012.
95. M.O. Gallyamov, I.S. Chaschin, M.A. Khokhlova, T.E. Grigorev, et al. Collagen tissue treated with chitosan solutions in carbonic acid for improved biological prosthetic heart valves, *Mater. Sci. Eng. C.* 37 (2014) 127–140.
96. M. Agarwala, T. Barman, D. Gogoi, B. Choudhury, et al. Highly effective antibiofilm coating of silver–polymer nanocomposite on polymeric medical devices deposited by one step plasma process, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 102 (2014) 1223–1235.
97. F. Martínez-Gutiérrez, J.M. Guajardo-Pacheco, M.E. Noriega-Trevino, E.P. Thi, et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and inflammatory response of novel plastics embedded with silver nanoparticles, *Future Microbiol.* 8 (2013) 403–411.
98. E. Elizabeth, G. Baranwal, A.G. Krishnan, D. Menon, et al. ZnO nanoparticle incorporated nanostructured metallic titanium for increased mesenchymal stem cell response and antibacterial activity, *Nanotechnology.* 25 (2014) 115101.
99. K.D. Secinti, H. Özalp, A. Attar, M.F. Sargon. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants, *J. Clin. Neurosci.* 18 (2011) 391–395.
100. H. Qin, H. Cao, Y. Zhao, G. Jin, et al. Antimicrobial and osteogenic properties of silver-ion-implanted stainless steel, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7 (2015) 10785–10794.
101. J.M. Corrêa, M. Mori, H.L. Sanches, A.D. da Cruz, et al. Silver nanoparticles in dental biomaterials, *Int. J. Biomater.* 2015 (2015) 485275.
102. R.P. Allaker. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation, *J. Dent. Res.* 89 (2010) 1175–1186.
103. D. Ansong, K.P. Asante, J. Vekemans, S.K. Owusu, et al. T cell responses to the RTS,S/AS01E and RTS,S/AS02D malaria candidate vaccines administered according to different schedules to ghanaiian children, *PLOS ONE.* 6 (2011) e18891.
104. S.T. Agnandji, R. Fendel, M. Mestré, M. Janssens, et al. Induction of *Plasmodium falciparum*-specific CD4<sup>+</sup> T cells and memory B cells in gabonese children vaccinated with RTS,S/AS01E and RTS,S/AS02D, *PLOS ONE.* 6 (2011) e18559.

- 
105. K.A. Ghaffar, A.K. Giddam, M. Zaman, M. Skwarczynski, et al. Liposomes as nanovaccine delivery systems, *Curr. Top. Med. Chem.* 14 (2014) 1194–1208.
106. J.T. van Dissel, S.A. Joosten, S.T. Hoff, D. Soonawala, et al. A novel liposomal adjuvant system, CAF01, promotes long-lived Mycobacterium tuberculosis-specific T-cell responses in human, *Vaccine*. 32 (2014) 7098–7107.
107. V. Giacomet, F. Penagini, D. Trabattoni, A. Viganò, et al. Safety and immunogenicity of a quadrivalent human papillomavirus vaccine in HIV-infected and HIV-negative adolescents and young adults, *Vaccine*. 32 (2014) 5657–5661.
108. B. Rodriguez, D.M. Asmuth, R.M. Matining, J. Spritzler, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of repeated doses of dermavir, a candidate therapeutic HIV vaccine, in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: results of the ACTG 5176 trial, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999. 64 (2013) 351–359.
109. M.S. Muthu, D.T. Leong, L. Mei, S.-S. Feng. Nanotheranostics - application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics, *Theranostics*. 4 (2014) 660–677.
110. S.G. Beal, J. Ciurca, G. Smith, J. John, et al. Evaluation of the nanosphere verigene Gram-positive blood culture assay with the VersaTREK blood culture system and assessment of possible impact on selected patients, *J. Clin. Microbiol.* 51 (2013) 3988–3992.
111. C.M. Wojewoda, L. Sercia, M. Navas, M. Tuohy, et al. Evaluation of the Verigene Gram-positive blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants, *J. Clin. Microbiol.* 51 (2013) 2072–2076.
112. H. Zazo, C.I. Colino, J.M. Lanao. Current applications of nanoparticles in infectious diseases, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 224 (2016) 86–102. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.008.
113. H.-I. Chang, M.-K. Yeh. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy, *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 49–60.
114. C.A. Schütz, L. Juillerat-Jeanneret, H. Mueller, I. Lynch, et al. Therapeutic nanoparticles in clinics and under clinical evaluation, *Nanomed.* 8 (2013) 449–467.
115. R. Duncan, R. Gaspar. Nanomedicine(s) under the microscope, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 2101–2141.

116. P. Ghosh, G. Han, M. De, C.K. Kim, et al. Gold nanoparticles in delivery applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1307–1315.
117. C.J. Murphy, A.M. Gole, J.W. Stone, P.N. Sisco, et al. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 1721–1730.
118. E.C. Dreaden, L.A. Austin, M.A. Mackey, M.A. El-Sayed. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery, *Ther. Deliv.* 3 (2012) 457–478.
119. Y.-S. Chen, Y.-C. Hung, I. Liao, G.S. Huang. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles, *Nanoscale Res. Lett.* 4 (2009) 858–864.
120. J.-J. Liang, Y.-Y. Zhou, J. Wu, Y. Ding. Gold nanoparticle-based drug delivery platform for antineoplastic chemotherapy, *Curr. Drug Metab.* 15 (2014) 620–631.
121. X.-D. Zhang, D. Wu, X. Shen, P.-X. Liu, et al. In vivo renal clearance, biodistribution, toxicity of gold nanoclusters, *Biomaterials.* 33 (2012) 4628–4638.
122. C.A. Simpson, K.J. Salleng, D.E. Cliffel, D.L. Feldheim. In vivo toxicity, biodistribution, and clearance of glutathione-coated gold nanoparticles, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 9 (2013) 257–263.
123. C.T. Costiniuk, M.-A. Jenabian. HIV reservoir dynamics in the face of highly active antiretroviral therapy, *AIDS Patient Care STDs.* 29 (2015) 55–68.
124. L. Shi, E. Buhler, F. Boué, F. Carn. How does the size of gold nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question, *J. Colloid Interface Sci.* (2016).
125. X. Huang, P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy, *Nanomed.* 2 (2007) 681–693.
126. C. Garrido, C.A. Simpson, N.P. Dahl, J. Bresee, et al. Gold nanoparticles to improve HIV drug delivery, *Future Med. Chem.* 7 (2015) 1097–1107.
127. S. Kumar, K.S. Gandhi, R. Kumar. Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method, *Ind. Eng. Chem. Res.* 46 (2007) 3128–3136.
128. Y.-H. Chen, C.-Y. Tsai, P.-Y. Huang, M.-Y. Chang, et al. Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model, *Mol. Pharm.* 4 (2007) 713–722.
129. M. Garg, A. Asthana, H.B. Agashe, G.P. Agrawal, et al. Stavudine-loaded mannosylated liposomes: in-vitro anti-HIV-I activity, tissue distribution and pharmacokinetics, *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 605–616.

130. A.K. Katragadda, M. Singh, G.V. Betageri. Encapsulation, stability, and in vitro release characteristics of liposomal formulations of stavudine (D4T), *Drug Deliv.* 6 (1999) 31–37.
131. Dash, S, Murthy, P.N., Nath, L., Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol. Pharm.-Drug Res.* 67 (2010) 217–233.
132. N.K. Saksena, B. Wang, L. Zhou, M. Soedjono, et al. HIV reservoirs in vivo and new strategies for possible eradication of HIV from the reservoir sites, *HIVAIDS Auckl. NZ.* 2 (2010) 103–122.
133. H. Zazo, C.I. Colino, K.T. Warzecha, M. Hoss, et al. Gold nanocarriers for macrophage-targeted therapy of human immunodeficiency virus, *Macromol. Biosci.* (2016).
134. S. Gunaseelan, K. Gunaseelan, M. Deshmukh, X. Zhang, et al. Surface modifications of nanocarriers for effective intracellular delivery of anti-HIV drugs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 518–531.
135. G. Sonavane, K. Tomoda, K. Makino. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 66 (2008) 274–280.
136. X.-D. Zhang, H.-Y. Wu, D. Wu, Y.-Y. Wang, et al. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes, *Int. J. Nanomedicine.* 5 (2010) 771–781.
137. X.-D. Zhang, D. Wu, X. Shen, P.-X. Liu, et al. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine.* 6 (2011) 2071–2081.
138. C. Berce, C. Lucan, B. Petrushev, S. Boca, et al. In vivo assessment of bone marrow toxicity by gold nanoparticle-based bioconjugates in Crl:CD1(ICR) mice, *Int. J. Nanomedicine.* 11 (2016) 4261–4273.
139. L.A. McNamara, K.L. Collins. Hematopoietic stem/precursor cells as HIV reservoirs, *Curr. Opin. HIV AIDS.* 6 (2011) 43–48.
140. B.R. Dalvi, E.A. Siddiqui, A.S. Syed, S.M. Velhal, et al. Nevirapine loaded core shell gold nanoparticles by double emulsion solvent evaporation: in vitro and in vivo evaluation, *Curr. Drug Deliv.* (2016).13(7):1071-1083.
141. S. Ghosh, L. Mondal, S. Chakraborty, B. Mukherjee. Early stage HIV management and reduction of stavudine-induced hepatotoxicity in rats by

experimentally developed biodegradable nanoparticles, *AAPS PharmSciTech.* 2017 Apr;18(3):697-709.

142. R. Shegokar, K.K. Singh. Stavudine entrapped lipid nanoparticles for targeting lymphatic HIV reservoirs, *Pharm.* 66 (2011) 264–271.

143. H. Zazo, A. Martín-Suárez, Jose M. Lanao. PK/PD analysis of stavudine-gold nanoparticles by Monte Carlo Simulation, in: *Monte Carlo Simul. Methods Assess. Appl.*, Nova Sciences, 2017.

144. S. Jönsson, A. Henningson, M. Edholm, et al. Role of modelling and simulation: a European regulatory perspective, *Clin. Pharmacokinet.* 51 (2012) 69–76.

145. R.P. Duffin, R.H. Tullis. Mathematical models of the complete course of HIV infection and AIDS., *J. Theor. Med.* 4 (2002) 215–221.

146. T.B. Kepler, A.S. Perelson. Drug concentration heterogeneity facilitates the evolution of drug resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 11514–11519.

147. EMA, EPAR-Product Information, (2016).

[http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000110/WC500049165.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000110/WC500049165.pdf) (accessed March 15, 2017).

148. R. Dolin, H. Masur, M.S. Saag. *AIDS Therapy*, Elsevier Health Sciences, 2007.

149. J.A. Levy. *HIV and the Pathogenesis of AIDS*, ASM Press, 2007.

## **CAPÍTULO 3**

---

### **Conclusiones**

- 1- De acuerdo a la revisión bibliográfica, las nanopartículas ofrecen un tratamiento alternativo para las enfermedades infecciosas mediante la vectorización de fármacos antiinfecciosos a los lugares específicos donde se aloja el patógeno. Las nanopartículas metálicas como son las nanopartículas de oro, son una prometedora alternativa en la terapéutica antimicrobiana y pueden usarse como nanotransportadores de agentes antimicrobianos y como sistemas teragnósticos.
- 2- Se ha utilizado el método de Turkevich para la síntesis de nanopartículas de oro de entre 10 y 100 nm. Estas fueron caracterizadas por DLS, TEM y espectroscopía UV-visible. Se observó una relación lineal e inversamente proporcional entre el tamaño de las nanopartículas y la concentración del agente reductor utilizado.
- 3- Las nanopartículas de oro obtenidas incorporan grandes cantidades de estavudina tras 24 h de incubación. Esto permite la administración de grandes dosis de fármaco con bajas concentraciones de oro.
- 4- El sistema estavudina-nanopartículas de oro presenta una liberación controlada pH-dependiente. En medio ácido, se observó un incremento de la tasa de liberación en comparación con la liberación en pH fisiológico. A los niveles de pH estudiados, el mejor ajuste fue con el modelo de Korsmeyer-Peppas, siguiendo la liberación una cinética de tipo Fickiano.
- 5- El estudio *in vitro* en macrófagos humanos mostró una mejora en la captación de estavudina por los macrófagos con el uso de los nanotransportadores de oro.
- 6- Las características de las nanopartículas como tamaño y tipo de estabilizador influyen en su captación por los macrófagos. Nanopartículas de 40 nm de tamaño, carga negativa y citrato como estabilizador permiten una mejor captación celular.
- 7- Las mayores concentraciones intracelulares de estavudina, con el uso de las nanopartículas de oro, induce un subtipo específico de activación proinflamatoria concentración dependiente, en base a la expresión de genes inflamatorios por los macrófagos, indicativo de la actividad antiviral de los macrófagos, sugiriéndolo como opción prometedora de tratamiento del VIH.
- 8- El estudio *in vivo* muestra cambios en la farmacocinética y biodistribución de la estavudina tras la administración con las nanopartículas de oro. El sistema estavudina-nanopartículas de oro mejora la vectorización hacia los reservorios



del VIH, como son los macrófagos, la médula ósea, el hígado, el timo, el bazo o el cerebro. El tiempo medio de residencia y la semivida de la estavudina en estos reservorios fue mayor con el uso de las nanopartículas de oro, indicando un comportamiento de liberación controlada.

- 9- Se ha desarrollado un modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) de estavudina unida a nanopartículas de oro. Este describe la evolución temporal de las concentraciones de fármaco en sangre y en tejidos, los valores de células R infectadas y no infectadas (células diana del VIH), valores de macrófagos infectados y no infectados (reservorio del VIH) y carga viral procedente de las células T, de los macrófagos y total. Este modelo permite simular, utilizando la simulación de Monte Carlo, las curvas de dosis respuesta de la carga viral y los niveles de células inmunológicas para diferentes esquemas de dosificación de estavudina unida a nanopartículas.
- 10- Según el modelo PK/PD, el uso de estavudina unida a nanopartículas para el tratamiento crónico del VIH resulta en un mejor control de la infección en comparación con la administración de estavudina en solución. Este se caracterizó por unos niveles de concentraciones de estavudina en sangre menores y más sostenido en el tiempo, mayores concentraciones de estavudina en macrófagos, mayores niveles de células T y macrófagos y una carga viral total mucho menor a lo largo de todo el tratamiento.