



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
NUEVOS AVANCES EN TERAPIA TÓPICA
OCULAR: LIPOSOMAS, NIOSOMAS Y
DENDRÍMEROS

Autor: BAZ JOVER, ÁLVARO

Fecha: 28/06/2020

Tutor: ELORZA BARROETA, BEGOÑA

1. RESUMEN

La terapia ocular ha estado muy limitada durante varios años por las fuertes limitaciones que presenta, ya sea a la hora de problemas de biodisponibilidad o por la incomodidad de ciertas vías para el paciente. Con los nuevos avances en el campo de los transportadores de partículas, llegaron nuevas perspectivas de futuro para el tratamiento de enfermedades del globo ocular.

En este trabajo nos centraremos en abordar estos sistemas de transporte, concretamente los liposomas, dendrímeros y niosomas, para la administración tópica de principios activos, una vía de administración tradicionalmente descartada a la hora de administrar fármacos para alcanzar las zonas más profundas del ojo, pero que puede empezar a desbancar a la vía intravítrea o subconjuntival en el tratamiento de enfermedades como el glaucoma o la degeneración macular asociada a la edad.

Palabras clave/Keywords: transportadores de moléculas con actividad biológica, liberación de fármacos, vía ocular, administración tópica, liposomas, dendrímeros y niosomas.

2. INTRODUCCIÓN: Fisiología del ojo y administración de fármacos.

El ojo es un órgano único en cuanto a su estructura y sensibilidad. Anatómicamente puede dividirse en dos partes: el segmento anterior y el segmento posterior. El segmento anterior ocupa tres cuartas partes del globo ocular y está compuesto por la córnea, la conjuntiva, el iris, el cuerpo ciliar, el humor acuoso y las estructuras de lentes (Imagen 1). A lo largo de estas estructuras, nos encontramos con numerosas barreras y mecanismos de defensa a los que cualquier formulación deberá enfrentarse si quiere alcanzar su diana objetivo, empezando, sin ir más lejos por el parpadeo, o las lágrimas. Además, las formulaciones no solo deben superar estas barreras físicas, si no que tienen unos requerimientos a nivel de esterilidad y biocompatibilidad muy estrictos ⁽¹⁾.

Dado estas limitaciones, la vía ocular ha sido objeto de numerosos estudios experimentales de sistemas que pudieran aumentar el tiempo de permanencia en la superficie ocular. Con la llegada de nuevos avances en la elaboración de micro y nanosistemas, la vía ocular se ha visto muy reforzada y las tendencias en terapéutica han ido variando en los últimos años.

La vía tópica es la vía de elección por comodidad y aceptación por parte del paciente cuando se pretenden tratar afecciones del segmento anterior. Estamos hablando ya de un tipo de administración local, por lo que en sí estamos evitando muchos efectos indeseados a nivel sistémico y en sí, consiguiendo una mejor farmacocinética.

Cuando se pretende alcanzar, en cambio, el segmento posterior, la vía ocular tópica y la sistémica ya quedan descartadas, al menos usando sistemas de liberación y transporte convencionales porque la biodisponibilidad del fármaco sería totalmente insuficiente debido a las barreras anteriormente mencionadas. Se empieza a hablar entonces de administración intraocular (inyección intravítrea) o una alternativa menos invasiva y molesta como la vía periocular, suponiendo que el fármaco tenga cierta capacidad a la hora de atravesar membranas. El problema de estas dos vías es, la posibilidad de que sean necesarias numerosas inyecciones, dado que muchas de las patologías que afectan al segmento posterior son crónicas. Esto, genera problemas en la adhesión a los tratamientos y rechazo del paciente.

Este obstáculo será el punto de partida de numerosas investigaciones en busca de sistemas de transporte a estas partes más profundas del ojo.

Los últimos avances en cuanto a rutas de administración ocular se refieren a la posibilidad de usar el espacio supracoroideo, aunque es una posibilidad que aún se está investigando ⁽²⁾.

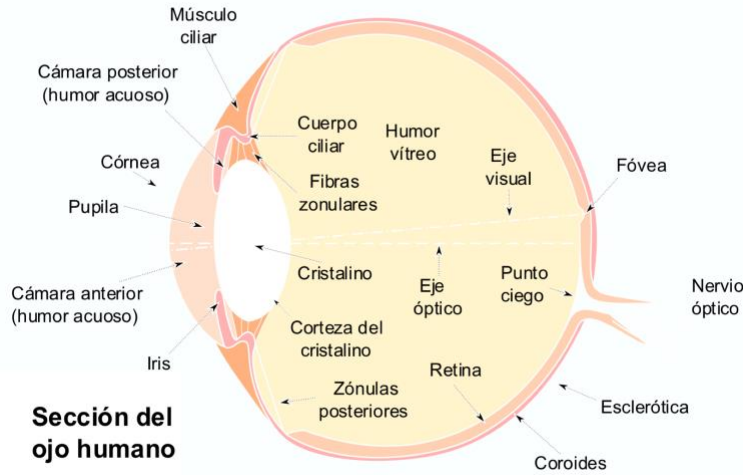


Imagen 1. Obtenida de: https://es.wikipedia.org/wiki/Ojo_humano#/media/Archivo:Eye-section-es.svg

3. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es abordar los últimos avances en nanosistemas para el transporte de fármacos en la vía ocular de administración tópica y contemplar las alternativas que estos presentan a la terapia ocular que actualmente se encuentra autorizada y comercializada, sea tópica o intraocular.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se ha realizado una exhaustiva revisión bibliográfica a través de la búsqueda de artículos científicos encontrados en bases de datos como PubMed, Google Scholar, Elsevier o el catálogo de la biblioteca de la Universidad Complutense. Para ello se realizaron numerosas búsquedas usando criterios de búsqueda como “topic administration, ocular drug delivery, liposomes, dendrimers o niosomes”

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado, la vía tópica es la vía de elección siempre que sea posible dada su comodidad y aceptación por el paciente. Tradicionalmente, muchos fármacos han sido aplicados en forma de gotas como la forma farmacéutica más sencilla de aplicar, incluso por el propio paciente sin necesidad de ayuda o intervención de un sanitario. El problema es que

la mayoría de los principios activos sufre muchas limitaciones a la hora de atravesar las barreras y protecciones con la que cuenta el ojo.

5.1 Barreras: obstáculos a superar y nuevos retos

La primera barrera a superar la componen en conjunto la capa lacrimal junto con el parpadeo. Esta asociación es muy efectiva a la hora de eliminar sustancias ajenas al ojo en la capa precórnea, incluidas los fármacos. También cabe reseñar que en el fluido lacrimal hay numerosas proteínas que pueden unirse al fármaco o incluso metabolizarlo antes de tiempo, anulando su función. El flujo normal de lágrimas se mueve en un rango de 0.5-2.2 $\mu\text{L}/\text{min}$, pero cuando un irritante se instala en la superficie ocular, el flujo se dispara hasta llegar incluso a los 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, resultando en la eliminación de muchas formas farmacéuticas. Podría parecer que principios activos lipófilos se librarían de este efecto de drenaje, pero lo cierto es que pueden difundir hasta una capa conocida como esclera y una vez allí, son eliminados del ojo para pasar a circulación sistémica, lo cual tampoco sería interesante.

En segundo lugar, llegamos a la córnea. La cornea es una estructura no vascularizada que cuenta con cinco capas, aunque solo de tres de esas cinco capas actúan como tal de barrera. El epitelio de la córnea consta de cinco o seis capas de células unidad entre ellas. Por tanto, es muy resistente al paso de drogas hidrofílicas. Las lipofílicas pueden difundir dentro de las células del epitelio estableciéndose allí formas de depósito que se van liberando según el coeficiente de reparto o/w. Por tanto, llegados a este punto y con las consideraciones ya vistas, los fármacos ideales serían aquellos con carácter anfipático. Luego tenemos el estroma, con un contenido en agua muy elevado, se trata entonces de una zona de depósito para principios activos hidrófilos, por contra.

Todas estas barreras son las que encontraríamos en un ojo sano. Cabe destacar que en caso de encontrar una patología ocular todo esto puede cambiar, aumentando o reduciendo la biodisponibilidad de los fármacos.

Por tanto, hay una clara necesidad de potenciar la penetración de los principios activos para que mantengan los niveles terapéuticos deseados en el lugar de acción. Esto se ve agravado por el desarrollo de nuevos principios activos, cada vez más potentes y por tanto más tóxicos si la liberación no se produce de forma controlada.

Se pueden manipular diversos factores a la hora de aumentar la penetración a la córnea. Por ejemplo, con algunos principios activos se podría aumentar la viscosidad del principio activo con polímeros adhesivos derivados de la celulosa. Las pomadas oftálmicas, aunque muy usadas, no son la forma más cómoda de aplicar ni mucho menos exactas en cuanto a dosificación se refiere. También se pueden desarrollar profármacos lipófilos, que atraviesen la córnea y se bioactiven por efecto de las esterasas dando lugar a derivados hidrófilos que ya podrán difundir a los tejidos internos del ojo. Otra alternativa sería usar promotores de la absorción. Se sabe que hay compuestos, tales como el cloruro de benzalconio o el conocido ácido etilendiaminotetracético (EDTA), que ejercen esa función a nivel de la córnea, aunque no de manera muy selectiva.

Sin duda, los avances más prometedores llegaron de la mano de los transportadores de moléculas. Esta forma de vehiculización permite alcanzar una mayor permanencia de la

formulación a nivel de la zona precórnea, pero sobre todo permite una liberación controlada al ritmo y localización deseados.

De esta forma nos vamos a encontrar con microsistemas, sistemas con un tamaño entre 1-1000 μm y nanosistemas, más pequeños, en este caso de 1-1000 nm. Se trata de sistemas coloidales de diferente tipo y estructura: cápsulas (estructura de reservorio) o esferas (estructura matricial) entre otros. Dentro de este mundo de la biotecnología surgieron los liposomas ⁽⁴⁾.

5.2 LIPOSOMAS

Los liposomas fueron descritos por primera vez en 1965 por Bangham y co. ⁽⁵⁾ en una publicación de la revista *Mol. Bio*. Se describieron como vesículas microscópicas compuestas de bicapas de fosfolípidos que rodean un número igual de compartimentos acuosos (Imagen 2). El fundamento de la formación de estas estructuras coloidales se basa en el carácter anfipático de los fosfolípidos. En general, éstos constan de un resto hidrofílico unido a ácidos grasos hidrofóbicos. Cuando se suspendían en una solución acuosa, los fosfolípidos se orientaban originando esa bicapa característica del liposoma.

En función del tamaño y su estructura, los liposomas pueden clasificarse en:

-Vesículas multilaminares (MLV) con numerosas bicapas y compartimentos acuosos. Pueden llegar a medir 15 μm , por lo que hablamos de microsistemas.

-Vesículas unilaminares pequeñas (SUV) con una sola capa encerrando un solo compartimento acuoso. En este caso hablamos de nano sistemas, puesto que nos movemos en torno a un máximo de 100 nm.

Vesículas unilaminares grandes (LUV) con una sola capa también y compartimento pero un tamaño mayor que las anteriores, entre 100 y 500 nm, por lo que siguen entrando dentro de los nanosistemas.

A la hora de liberar el compuesto encerrado, éste deberá difundir por el compartimento acuoso o la bicapa dependiendo de su posición inicial por su naturaleza. Los compuestos muy lipofílicos difundirán lentamente por los compartimentos acuosos y los hidrofílicos en cambio ralentizan su liberación al pasar por la bicapa; todo esto se ve influenciado por el coeficiente de reparto. La otra posibilidad es que de alguna manera se altere la estructura del liposoma. Entonces los compuestos se liberan de forma inmediata, sin importar su naturaleza.

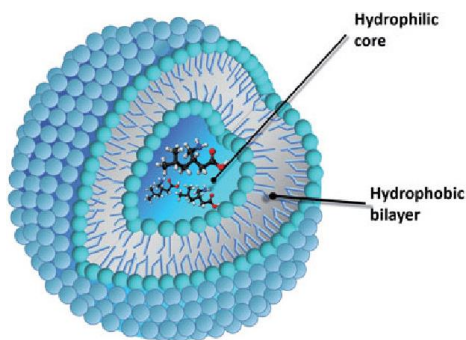


Imagen 2. Obtenida de: https://www.researchgate.net/figure/Liposome-for-drug-delivery_fig1_320661158

Las razones para usar liposomas como transportadores de moléculas son muchas. Entre las múltiples ventajas se pueden desatacar su elevada biocompatibilidad y biodegradabilidad, su versatilidad a la hora de incorporar gran variedad de compuestos de diversa naturaleza, las amplias posibilidades de formulación que ofrece a la hora de elegir componentes y tamaños, las nuevas alternativas que surgen a nivel de superficie y polímeros bioadhesivos. Cabe destacar que los liposomas, debido a su tamaño no pueden extravasarse y pasar a circulación sistémica. Esto puede considerarse una ventaja o un inconveniente, pues no pueden alcanzar otra localización más allá del compartimento o tejido donde se administren; esto también implica que el éxito en el lugar de administración es mayor.

Con el descubrimiento de los liposomas y todo su potencial comenzaron los estudios en animales para comprobar su posible aplicación terapéutica. El primer estudio llevado a cabo con la vía tópica ocular se realizó en el 1981 ⁽⁶⁾. En este estudio, se empezaba a hablar de estas “balas” aun poco conocidas, y de su capacidad de liberación al nivel deseado. En este caso se investigó qué pasaba si introducías idoxuridina en uno de estos liposomas. Esperaban conseguir un aumento de la penetración a nivel de la córnea para mejorar la eficacia del tratamiento de la keratitis originada por el *Herpes simplex*. Así fue, lo conejos tratados es este estudio con la idoxuridina vehiculizada en liposomas obtuvieron una mayor regresión de la enfermedad que aquellos tratados con el fármaco libre.

Estudios posteriores comenzaron a ir más allá y empezaron a investigar acerca de las posibles variaciones de los liposomas en función de su composición. ⁽⁷⁾ En este caso se quería comprobar la mayor o menor penetración de la penicilina G y del indoxol. Experimentalmente se obtuvo que efectivamente la asimilación vía córnea de la penicilina G era mayor en las preparaciones con la molécula dentro del liposoma (dado su carácter anfipático es curioso reseñar que se comprobó que la penicilina se intercalaba tanto en la fase acuosa como en la bicapa del liposoma). Pero no sólo eso, si no que los que mayor penetración tuvieron fueron los liposomas unilaminares de carga positiva sobre todo y los de carga negativa; los neutros y los multilaminares de toda carga no tuvieron un aumento significativo de la penetración. Mencionar también, que en este estudio se comprobó la mayor eficacia del antiinflamatorio indoxol en un preparado liposomal frente al principio activo libre y vehiculizada en Polisorbato 80, pero no habla de cargas ni estructura en este principio activo.

Así pues, se inició otro campo de investigación: los **factores que hacían variar la adhesión a la córnea**. El primero era efectivamente la carga de la superficie del liposoma. Dado su pequeño tamaño los liposomas son presa fácil del sistema de defensa parpadeo-lágrima, por eso conviene que, de alguna manera el liposoma se anclara a la superficie de la córnea. La capa de mucina que recubre el epitelio de la córnea tiene carga negativa. Por eso se comprobó la mayor eficacia de los liposomas cargados positivamente, como se comentó en el párrafo anterior, aunque fueron muchos los estudios que siguieron avalando esta realidad durante los años posteriores. La estearilamina es un lípido que puede usarse con el fin de dotar de carga positiva a la superficie del liposoma, aunque tiene ciertos efectos tóxicos, al causar reacciones de hemólisis al interactuar con las cargas negativas del eritrocito ⁽⁸⁾. Con el tiempo se investigaron otras alternativas lipídicas aunque fueran de síntesis, derivados del colesterol y fosfolípidos, para lograr esa adhesión de forma exitosa en cuanto a citotoxicidad se refiere ⁽⁹⁾.

Por último, después de haber visto el potencial protector de las lágrimas, o metabolizador de las proteínas, ahora deberemos comprobar cómo afectan al liposoma. Si se garantiza la adhesión a la córnea, podemos concluir que los liposomas resistirán mejor el poder limpiador de las lágrimas, pero ni mucho menos se vuelven inmunes. Las interacciones con proteínas son un factor de importancia capital a la hora de diseñar las formulaciones ⁽¹¹⁾. Al intentar conocer el efecto del fluido lacrimal sobre los liposomas (en este caso multilaminares) y la liberación de sus sustancias, se comprobó que el flujo lacrimal de conejos inducía la liberación tanto de principios activos hidrosolubles como de alto peso molecular, aunque los mecanismos fisiológicos que median este efecto son muchos y variados y no están del todo estudiados en cuanto al campo de liposomas.

5.2.2 PERSPECTIVA ACTUAL

Los liposomas siguen situándose a la vanguardia de la liberación de fármacos, al menos de momento. En lo relativo a la vía tópica que estamos tratando sigue investigándose como conseguir una mejora en la biodisponibilidad. La aproximación más realista se basa en conseguir un mayor tiempo de permanencia en el lugar de administración. Comienza así la investigación en el campo de la mucoadhesión. Los primeros pasos vienen dándose de lejos desde el momento que se descubre el efecto de la carga superficial del liposoma (7) por la interacción con la mucina cargada negativamente del epitelio corneal. Como se indica arriba, la mayor parte de los liposomas cargados positivamente en sus superficies consiguen dicha carga a través de un lípido, la estearilamina, que es citotóxico. Así es como se empiezan a investigar las posibilidades adhesivas de los geles y polímeros y por lo consiguiente nacen los primeros modelos de **liposomas mucoadhesivos**, gel (polímero) y liposoma juntos. En 1992 aparecen las primeras referencias a estas combinaciones ^(12,13) cuando se evaluó el efecto sobre la biodisponibilidad y la retención corneal de los liposomas que contenía pilocarpina. El resultado, tanto in vitro como in vivo fue muy favorable para las formulaciones con carbopol, llegando a aumentar el tiempo de permanencia en córnea hasta tres horas.

Con estos avances se desarrollaron sistemas experimentales capaces de cubrir tratamientos para las afecciones más comunes del segmento anterior al que nos estamos refiriendo. La mayor parte de esas afecciones son de tipo infeccioso, por ejemplo, conjuntivitis o keratitis de naturaleza vírica, bacteriana o fúngica. Encontramos referencias que hablan entonces, del ciprofloxacino ⁽¹⁵⁾. El ciprofloxacino es un antibiótico de la familia de las fluoroquinolonas muy usado en procesos de conjuntivitis, keratitis o keratoconjuntivitis de etiología bacteriana. Las presentaciones que estaban comercializadas por entonces tenían una biodisponibilidad muy baja. Este principio activo llevaba siendo objeto de estudio varios años, pero en este estudio fueron más allá al pretender aplicar unas características reales a la formulación a nivel de la viscosidad necesaria para la correcta administración, niveles adecuados de pH y osmolaridad. Demostraron que se alcanzaban concentraciones de ciprofloxacino mayores en los sistemas combinados de liposomas y gel frente a la alcanzada en sistemas simples de gel o de principio activo libre. Existía también una relación con la viscosidad, alcanzando mayores concentraciones cuanto mayor era este parámetro. Otra publicación trató de solventar los problemas del ofloxacino ⁽¹⁶⁾. Esta molécula requería de administraciones cada muy poco tiempo, lo cual unido a la formación de depósitos dada su baja solubilidad al pH corneal, la hacían una molécula poco práctica con la que trabajar. Se trabajó con MLVs y un gel a base de

chitosan, comprobándose que la permeabilidad corneal aumentaba hasta siete veces favoreciendo así el efecto sobre la infección ocular.

En lo relativo a la keratitis fúngica específicamente existe un sistema de investigación reciente que consiste en un sistema híbrido de liposomas de fluconazol en un gel de ácido hialurónico ⁽¹⁷⁾. En este estudio se comprobó una eficacia tres y cuatro veces mayor que formulaciones a base de liposomas simples y que la suspensión acuosa respectivamente, constituyendo una prometedora alternativa a las gotas convencionales de este antifúngico.

Sin duda alguna una de las perspectivas actuales más prometedoras en la liberación ocular de fármacos son los liposomas cubiertos de chitosan. El chitosan es un polímero derivado de la quitina obtenida del esqueleto de los crustáceos. Se trata de un polímero catiónico (recordar las interacciones con la mucina de carga negativa) que resulta de interés en la formación de hidrogeles ya que aporta flexibilidad (deformabilidad) a la estructura además de por su elevada biocompatibilidad y biodegradabilidad, es decir, no es considerado tóxico, a pesar de haber algunas referencias que sí demuestran una leve citotoxicidad propia de su naturaleza catiónica ⁽³²⁾. Se obtiene de la desacetilación de la N-acetil glucosamina. Numerosos estudios recientes avalan estas ventajas teóricas. En un sistema de liposomas deformables de chitosan que contenían el antiinflamatorio flurbiprofeno ⁽¹⁸⁾ se obtuvieron resultados muy interesantes en cuanto a biodisponibilidad se refiere, aumentándose 3.4 veces respecto a la solución estándar de flurbiprofeno en conejos.

Su potencial es tal, que pueden incluso ser efectivos en el tratamiento tópico de enfermedades tradicionalmente no tratadas por esta vía, como el glaucoma. Así pues, encontramos referencias a estos liposomas y timolol, una beta bloqueante adrenérgico muy empleado en el tratamiento del glaucoma, pero en este estudio se trabajó con una administración tópica ⁽¹⁹⁾. La reducción de la presión intraocular (PIO) fue significativamente mayor en los liposomas de chitosan comparándolo con las gotas comunes comercializadas y autorizadas.

También resultaron efectivos en el tratamiento del edema macular con acetónido de triamcinolona, un potente corticoesteroide ⁽²⁰⁾. Se trata de una enfermedad que afecta a la retina (segmento posterior) causando daños y dificultando la visión. En este estudio el éxito fue tal que los resultados de biodisponibilidad en retina podían compararse a los alcanzados por medio de inyecciones intravítreas, tanto *in vitro* en células humanas como *in vivo* en ratas. Este año 2020, siguiendo con esta posible aplicación de los liposomas con chitosan para tratar de forma tópica afecciones de tipo inflamatorio en la parte posterior del ojo, surge un sistema ⁽²¹⁾ que vehiculiza acetónido de triamcinolona de nuevo. Los resultados en ratas de nuevo ofrecen una esperanzadora alternativa a las invasivas formas de alcanzar el segmento posterior, al conseguir concentraciones terapéuticas más que satisfactorias.

Al igual que con el chitosan, otro polímero que está teniendo buenos resultados es el Carbopol como en un estudio llevado a cabo para mejorar la farmacocinética del fluconazol ⁽²²⁾, así como otras muchas asociaciones con diversos polímeros o sustancias que tengan capacidad de adherirse a las mucosas.

En resumen, podemos afirmar que la perspectiva actual de los liposomas, vesículas que llevan siendo investigadas desde la década de los 80 para la vía ocular, pasa por avanzar de la mano de estos polímeros con capacidad de bioadhesión para mejorar significativamente su eficacia terapéutica y ampliar las posibilidades de uso, así como favorecer el desarrollo del campo de

la terapia tópica ocular. No obstante, a la espera de la comercialización de alguno de estos sistemas, su uso puede ir cayendo, en favor de otro tipo de nanosistemas.

5.3 DENDRIMEROS

Siguiendo con el proceso de investigación en la liberación y transporte a nivel del ojo, se llega a desarrollar los dendrímeros. La primera descripción de dendrímeros o de una "estructura dendrimerica", así como de su fabricación, data del año 1985 ⁽²⁴⁾. Se comentaba la principal diferencia de estas estructuras con los polímeros u oligómeros ya conocidos: la estructura ramificada. Ya entonces se empezaba a especular con las múltiples posibilidades a nivel de jugar con distintos pesos moleculares y grupos funcionales para conseguir una liberación en el lugar deseado.

Los dendrímeros son nanopartículas con una estructura única por sus múltiples ramificaciones ⁽²³⁾. Constan de tres partes diferenciadas: un núcleo central, las ramificaciones y la parte más distal con numerosos y variados grupos funcionales. Las unidades ramificadas se organizan en capas llamadas "generaciones", y representan la unidad monomérica de repetición de estos polímeros, el dendrón (Imagen 3). Al ser moléculas con una gran variedad de grupos funcionales en superficie, estos sistemas se pueden funcionalizar con ligandos específicos que permitan alcanzar la diana en el organismo. Son moléculas de peso molecular conocido con unas propiedades que las han hecho de interés para la farmacia. Una característica propia de los dendrímeros es que cuentan con una propiedad conocida como monodispersidad. La monodispersidad hace referencia a que, dado que su origen es industrial, todos ellos contendrán secuencias similares en cuanto a los monómeros, por eso las masas son muy similares, lo cual puede comprobarse por espectrometrías o cromatografías. Son biodegradables y compatibles con los tejidos humanos, además de ser solubles en agua. Si bien, se puede referir cierta toxicidad en dendrímeros neutros o catiónicos en función de la dosis administrada y directamente proporcional al número de generaciones, algo que no parece pasar cuando se trata de polímeros aniónicos. Los mecanismos de toxicidad, al igual que en los liposomas, parece estar relacionado con las interacciones con la superficie de las células que esté cargada negativamente causando fenómenos de lisis. Sin embargo, este problema de citotoxicidad puede enmascarse de cierta forma mediante la modificación parcial, en mayor o menor medida, de los restos catiónicos superficiales en neutros o aniónicos ⁽²⁵⁾. En este caso se añadió polietilenglicol en la superficie.

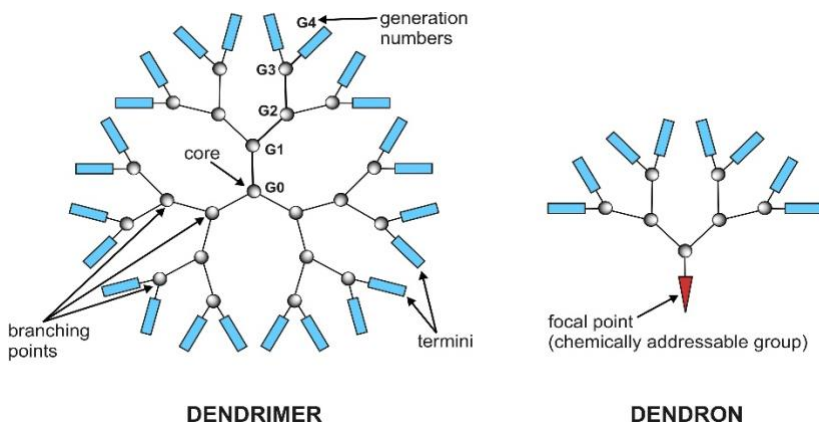


Imagen 3. Obtenida de: <https://es.wikipedia.org/wiki/Dendr%C3%ADmero#/media/Archivo:Graphs.jpg>

La estructura peculiar de los dendrímeros permite su uso para incluir o atrapar diversos agentes terapéuticos. Los fármacos de naturaleza lipófila se encuentran normalmente en el interior de la estructura, mediante interacción hidrofóbica. Los fármacos hidrófilos, en cambio, se encuentran generalmente en la superficie del dendrímero, gracias a la formación de complejos o de conjugados. Sea cual sea el caso, la ventaja que presentan es que consiguen una liberación en un lugar específico y que la liberación se produce de forma constante y sostenida, alcanzando cinéticas muy interesantes y evitando los efectos sistémicos indeseables.

No todo son ventajas respecto a estos agentes. Los dendrímeros son moléculas muy prometedoras, sí. Sin embargo, su eficacia *in vivo* tiene que perfeccionarse aún, a pesar de que van aumentando los estudios y revisiones favorables. Además, su capacidad de contener y transportar moléculas está limitada, solo admiten una determinada cantidad que podría considerarse insuficiente si se comparan con otros transportadores más rodados como los liposomas ⁽²⁶⁻²⁸⁾.

En cuanto a los tipos de dendrímeros según su composición: los dendrímeros se pueden sintetizar a partir de compuestos metabólicos naturales que incluyen aminoácidos como lisina, valina y leucina, azúcares, α -hidroxiácidos, ácidos grasos e intermedios metabólicos, como ácido cítrico o ácido fumárico. Pero los más estudiados son los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM). Los dendrímeros de PAMAM son polímeros líquidos o semisólidos con un número de grupos carboxilo, hidroxilo y amino determinados en su superficie, que va aumentando conforme aumentan las generaciones. Sabiendo esto se puede estudiar qué efecto tiene el cambio en el número de grupos, en el tamaño o el peso en el transporte ocular. Para ello se determina la actividad *in vivo* de la pilocarpina y la tropicanamida en los dendrímeros, con actividad miótica (para el tratamiento del glaucoma) y midriática respectivamente. A pesar del amplio conocimiento de estos dendrímeros, este es uno de los pocos estudios conocidos que se trabaja *in vivo*. Para empezar, en ninguna de las formulaciones de estos dos principios activos se produjo irritación, algo que no en todos los fenómenos de bioadhesión por medio de polímeros puede decirse. En la actividad miótica se consiguió el mejor efecto y más prolongado en los dendrímeros de PAMAM de cuatro generaciones con grupos hidroxilo en la superficie. En cuanto a la midriasis, aunque la mayoría de las variantes consiguieron una dilatación pupilar significativa, volvemos a encontrar que la mayor biodisponibilidad se alcanzó con los de cuarta generación y grupos hidroxilo. Así se puso de manifiesto el efecto de las diversas generaciones y los grupos de superficie en la actividad farmacológica, en función de la interacción que consiguen en la superficie ocular ⁽²⁹⁾.

De esta manera se desarrolló años más tarde un estudio *in vitro* que pretendía medir la adhesión a la córnea por medio de las interacciones con mucinas para el cual diseñaron un sistema de Resonancia y una membrana de mucina artificial ⁽³⁰⁾. Se compararon los fenómenos de bioadhesión de varios polímeros muy empleados en oftalmología. Ácido hialurónico, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa, quitosan y dendrímeros PAMAM. El resultado fue muy prometedor, pues los valores de bioadhesión demostraron que el polímero que mejores interacciones conseguía era el quitosán, seguido de los dendrímeros de PAMAM independientemente de la generación y grupos; en este caso todos eran de generación cuatro, pero diferían en los grupos: NH₂, OH y COOH. Con valores mucho más bajos se situaban los polímeros más usados en terapia ocular mencionados arriba. Esto es muy interesante, pues aunque el quitosan es un polímero bastante bien concebido, no deja de ser de naturaleza

catiónica, y esto significa que puede causar cierta toxicidad. Aunque la toxicidad depende mucho de la sal de quitosán utilizada y de su peso molecular, en general tienen cierta capacidad de lisar los eritrocitos como la mayoría de los polímeros catiónicos, a pesar de ser descrito en la mayoría de publicaciones como biocompatible y no tóxico⁽³¹⁾. En cambio, los dendrímeros sí que pueden presentarse como una alternativa mejor tolerada por el ojo del paciente.

Otra aplicación que ha sido demostrada *in vivo* es el uso de dendrímeros de distinta composición (aniónicos y catiónicos) y tamaño en el tratamiento tópico de la retinopatía diabética con dexametasona. Tras evaluar la inocuidad de los sistemas, se comprobó que efectivamente se aumentaba el transporte a través de la córnea y la esclera, mejorando el transporte a la retina. Los que mejor resultados dieron fueron los de cuarta y quinta generación con grupos carboxilo en la superficie. Por tanto, se concluye que los dendrímeros aniónicos en este caso aumentan la eficacia del tratamiento de la retinopatía diabética con dexametasona⁽³²⁾.

Los dendrímeros PAMAM han demostrado ser útiles también como promotores de la solubilidad y por tanto absorción de muchos compuestos⁽³³⁾. Las referencias a esta propiedad son abundantes en lo referente a vía transdérmica, pero también son útiles en la vía ocular. Dada su alta densidad de cargas en la superficie pueden formar numerosas interacciones con los lípidos de las membranas biológicas. Trabajando con puerarina, una isoflavona con propiedades antihipertensivas a nivel del globo ocular y córneas extrañas de conejos, se estudiaron las propiedades de los dendrímeros como promotores de la absorción corneal. Se trabajó con tres tipos de muestras: una de puerarina en una solución de tampón fosfato; una mezcla de puerarina y dendrímeros PAMAM (de tercera, cuarta y quinta generación, con grupos -NH₂ superficiales) disueltos en tampón fosfato también y la última en la que se formó un complejo de puerarina contenida en el dendrímero que finalmente fue disuelta en tampón fosfato de la manera. En la mezcla, la mayor parte de la puerarina estaba libre o formando débiles interacciones electrostáticas con el dendrímero, solo un poco se encontraba en el interior de estos. En cambio, en el complejo, la mayor parte de la puerarina se encontraba encapsulada dentro de los dendrímeros, desde donde se libera de forma sostenida. El aspecto experimental más interesante de este estudio es que las córneas fueron pretratadas con dendrímeros de tercera, cuarta y quinta generación, todos con grupos -NH₂ en la superficie, como los usados en las mezclas. Estos dendrímeros gracias a su carga catiónica superficial, pueden incorporarse a la membrana lipídica de la córnea, causando una desestructuración de las membranas. El aumento de la permeabilidad es directamente proporcional al tamaño de los dendrímeros, puesto que el número de grupos de superficie y las interacciones son mayores. Así pues, se consiguió el mayor aumento de la permeabilidad (2,5 veces más) en la mezcla de puerarina y el dendrímero de quinta generación, donde la cantidad de principio activo libre era mayor que en el complejo, donde la puerarina se liberaba de forma lenta y controlada como se indica unas líneas más arriba. Por tanto, sacamos en claro el poder que tienen los dendrímeros de más alta generación como promotores de la absorción a través de la córnea.

Yendo más allá de los dendrímeros PAMAM, el diseño de nuevos dendrímeros sigue avanzando. Se desarrolla una serie de dendrímeros con fósforo. Este tipo de dendrímeros lleva más de una década en el panorama terapéutico, pues hay referencias desde el siglo pasado incluso, pero en este caso se trataba de un transportador para la vía ocular. Hablamos de una

estructura con una sal de amonio cuaternario en el núcleo y grupos carboxílicos en la superficie ⁽³⁴⁾. Se usaron como vehículo del carteolol, un antihipertensivo beta bloqueante usado para tratar el glaucoma. Los grupos aminos del carteolol reaccionan con los carboxílicos que se encuentran en la superficie dendrímica y se forma el complejo. El núcleo de amonio cuaternario cumpliría las veces de conservante para evitar el uso de cloruro de benzalconio, sustancia no muy agradable para el organismo y que debe agregarse en la menor cantidad posible. Se administraron los complejos, desde la generación 0 a la 2 y no se produjo irritación ocular. El resultado fue que a pesar de la muy baja solubilidad de la generación segunda, la cantidad de cartelol final aplicada en las gotas era baja, pero la cantidad de cartelol que atravesó la córnea fue 2.5 veces superior a la del cartelol sin dendrímeros. Entonces, a pesar del posible problema que plantea la baja solubilidad, las ventajas como transportador resultan prometedoras en el glaucoma.

Siguiendo con el desarrollo de nuevos dendrímeros aparecen los dendrímeros de carbosilano ⁽³⁵⁾. En esta publicación se desarrollaron dendrímeros de carbosilano, tanto aniónicos como catiónicos y de la generación 1 a la 3 para vehiculizar acetazolamida, un antihipertensivo inhibidor de la anhidrasa carbónica usado en el glaucoma. En los estudios de tolerancia, ambos, catiónico y aniónico resultaron aceptados, pero a la hora de transportar la molécula, los mejores resultados en bajadas de PIO se obtuvieron con los dendrímeros catiónicos de tercera generación, hasta un 5% más que en la misma formulación sin dendrímeros. El resultado en la prolongación de los tiempos de permanencia en la superficie puede explicarse por el efecto tensioactivo de la formulación que podría dar lugar a la formación de una capa acuosa bien adherida a la superficie del ojo.

Por último, una perspectiva interesante en el campo de los dendrímeros es el *crosslinking*. El *crosslinking* es un conjunto de técnicas que suponen la unión de dos polímeros distintos. En las revisiones científicas la mayor parte de las aplicaciones son previa inyección o incisión, aunque se trate de alcanzar el segmento anterior, para sanar heridas de la córnea, por ejemplo ⁽³⁶⁾. Entre las revisiones de administración tópica, encontramos que se diseñó un sistema de un dendrimero PAMAM de tercera generación unido a tres cadenas de PEG para el transporte de los fármacos para el glaucoma brimonidina (un agonista alfa adrenérgico) y timolol en células del epitelio corneal humano *in vivo* y córneas bovinas *ex vivo* ⁽³⁷⁾. El sistema dendrimero-hidrogel aumentó la solubilidad de la brimonidina y mantuvo una liberación sostenida de ambos fármacos, además de aumentar notablemente el transporte vía córnea también en ambos fármacos hasta 4.6 veces más. Las comparaciones se hacen con una solución de los principios activos en tampón fosfato, por lo que no puede conocerse la comparación frente a un sistema solo dendrímérico, sin gel.

Así pues, los dendrímeros suponen un campo de avance con mucho recorrido en la terapia ocular. El principal punto a favor que presentan es, aparte de ser buenos vehículos, es, como hemos visto, su inocuidad y las posibilidades secundarias a la hora de su aumento de la permeabilidad al desestabilizar el epitelio corneal. Sin embargo, las contras, también mencionadas en páginas anteriores, pasan por su relativamente baja capacidad de cargar moléculas y su necesidad de seguir siendo objeto de más estudios experimentales.

5.4 NIOSOMAS

Los niosomas son vesículas compuestas por tensoactivos no iónicos como Tween, (Tween 60) Span, (Span 20, Span 40, Span 60) o Brij (Brij 72, 76 o78) que se auto-ensamblan en medio acuoso. Son similares a los liposomas presentados en el primer apartado de este trabajo, pues también constan de una o varias bicapas lipídicas encerrando un número igual de compartimentos acuosos (imagen 3). De manera similar a los liposomas y para estabilizar la bicapa, se agrega el colesterol. Además, aceptan en su estructura otra clase de moléculas que puedan agregarse cuando lo que se busque sea conseguir una carga positiva o negativa. La ventaja que presentan estas vesículas frente a los liposomas es una mayor estabilidad química y un coste de fabricación menor, lo cual los hace enormemente atractivos para una posible producción industrial⁽³⁸⁾. Los niosomas al igual que el resto de transportadores vistos en este trabajo datan de mediados de los años 80 con el comienzo de numerosas investigaciones en el campo de las vesículas no iónicas en medio acuoso; los niosomas tuvieron mucha importancia en esos años en el campo de la cosmética. De hecho, la primera mención que se hace de estos niosomas como tal es gracias a un artículo de un grupo de científicos supeditados por la multinacional cosmética francesa L'oreal ®.

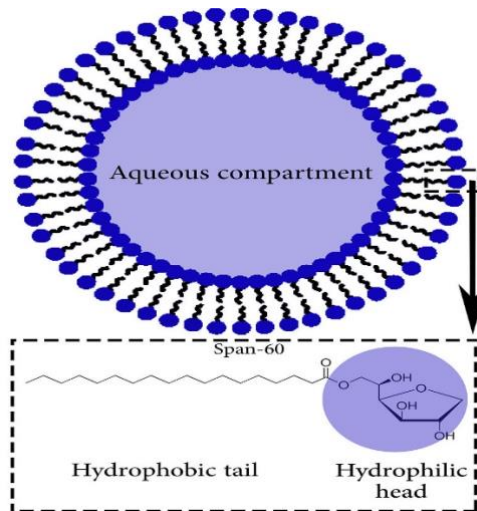


Imagen 3: Obtenida de: <https://es.betweenmates.com/what-is-difference-between-liposomes>

Siguiendo en la línea de los liposomas, al igual que ellos, los niosomas pueden tener diversos tamaños y número de capas, encontrando niosomas multilaminares y unilaminares. Los niosomas son biocompatibles, biodegradables, no inmunogénicos y toleran cierta flexibilidad a la hora de su diseño químico. Al estar compuestos por tensoactivos no iónicos, sus niveles de toxicidad son muy bajos, lo cual presenta otro atractivo más hacia estos sistemas. Por su estructura, pueden encerrar entre sus membranas tanto principios activos hidrosolubles como liposolubles, de la misma forma que lo hacían los liposomas. Pero además presentan una ventaja muy interesante: al igual que hemos visto anteriormente en los dendrímeros de PAMAM los niosomas dado su composición a base de elementos con elevada tensión superficial, pueden actuar como promotores de la absorción al alterar las uniones entre células del epitelio de la córnea. Además, gracias a esas propiedades surfactantes, al aplicarse originan una capa que cubre el epitelio corneal, mejorando los tiempos de permanencia en la

superficie del ojo, consiguiendo así, un mejor paso a través de la córnea para lograr una administración tópica eficaz ⁽³⁹⁾.

En lo relativo a la terapia ocular, estas vesículas no iónicas no fueron muy investigados hasta mediados de los años noventa, cuando en 1996 se desarrolla uno de los primeros estudios en el que se vehiculizaba un fármaco dentro de estos transportadores. Se trató de ciclopentolato, un anticolinérgico usado para producir midriasis. El resultado fue que se consiguió un aumento en la permeabilidad transcorneal de la molécula respecto a la solución de control, además de no provocar irritación ocular ⁽⁴⁰⁾.

Los niosomas comenzaron a contemplarse como alternativas a los liposomas, más baratas y con todas las ventajas que estos presentaban. Pero el bajo costo, la mayor estabilidad y la facilidad de almacenamiento han llevado a la explotación, científicamente hablando, de estos tensioactivos no iónicos (niosomas) como alternativas a los fosfolípidos (liposomas). Al contener colesterol en su estructura, la integridad de la vesícula se mantiene más estable ⁽⁴¹⁾. Dos años después del estudio anteriormente mencionado, se dirige otro enfocado a comprobar el comportamiento de estas vesículas cargadas con timolol para el tratamiento tópico del glaucoma. La conclusión fue que hubo un aumento de aproximadamente 2.48 veces en la biodisponibilidad ocular del maleato de timolol (un fármaco soluble en agua) encapsulado en niosomas en comparación con la solución tamponada de la misma molécula.

En cuanto a los avances en el campo de los niosomas, durante el siglo pasado no hubo un desarrollo tan veloz como de otros sistemas transportadores. Tanto los liposomas como los dendrímeros, tienen una carga de estudios mucho mayor en los años 90. De hecho, si se hace una búsqueda de artículos científicos clasificada por año de publicación se puede comprobar que no es hasta entrada el siglo XXI cuando comienza el verdadero desarrollo de estas vesículas como sistemas de vehiculización de principios activos. Así pues, se reactiva la investigación de estos nanosistemas con el objetivo de poder beneficiarse de todas las ventajas que estos sistemas presentan. Siguiendo con las investigaciones para el tratamiento del glaucoma de forma tópica se desarrolla un sistema niosomal con acetazolamida. Algunos se desarrollaron con Span 40 y otros con Span 60, pero ambos con colesterol en distintas proporciones. El resultado de esta investigación determinó que existía influencia de la composición química del niosoma, al obtenerse los mejores resultados del descenso de la PIO en los niosomas de Span 60 y colesterol en una proporción 7:4 molar ⁽⁴³⁾. Con la acetazolamida surgen nuevas investigaciones posteriores. Existe un ensayo muy interesante donde se trata de nuevo de desarrollar una formulación que sea eficaz en el tratamiento tópico del glaucoma. Para ello decidieron recubrir los niosomas con un polímero bioadhesivo de Carbopol, como muchas otras veces se había hecho con los liposomas, y vehiculizar estos niosomas bioadhesivos en una solución de ácido bórico al 2%, isotónica con el fluido lacrimonal. Este estudio es interesante porque los resultados demostraron un descenso de la PIO de más de un 30% en comparación con una solución comercializada de dorzolamida, Dorzox[®], pero en este caso, con una concentración de principio activo 4 veces menor ⁽⁴⁴⁾.

Dejando a un lado el glaucoma momentáneamente, cabe resaltar también el uso de estos niosomas como vehículos de antibióticos en el tratamiento tópico de infecciones bacterianas. Si bien estas infecciones pueden ya ser tratadas de forma tópica mediante pomadas o gotas, necesitan de repetidas aplicaciones a lo largo del día para cumplir la posología eficaz. Cuando se investigó el comportamiento de estas vesículas con gentamicina, se obtuvieron resultados

de liberación sostenida muy interesantes, al tiempo que los niveles de toxicidad se mantenían bajos ⁽⁴⁵⁾.

Pero sin duda alguna, el grueso de la investigación de los niosomas, tanto para la vía ocular como para otras vías como la vía transdérmica, se da a partir del año 2010. Con la entrada de la nueva década, el número de publicaciones comienza a crecer de forma significativa, según se ha podido comprobar en esta revisión bibliográfica.

Así pues, en 2010 se llevó a cabo una investigación con el objetivo de desarrollar un sistema vesical para el transporte de tartrato de brimonidina, de nuevo buscando alternativas y mejoras en el tratamiento del glaucoma. Se diseñaron para esta prueba experimental dos sistemas, uno liposomal y otro niosomal que se compararon tanto *in vitro* como *in vivo* con una formulación ya comercializada, Alphagan ®, una solución oftálmica de brimonidina. La conclusión propia de los autores realza el mantenimiento del descenso de la PIO en los sistemas experimentales en un tiempo cinco veces mayor que el conseguido por la solución comercializada (60 minutos de descenso máximo frente a 180 minutos). Aunque si se atienden a los resultados obtenidos, se puede observar además que los sistemas niosomales, conseguían una duración del efecto que iba más allá de esos 180 minutos. A ese tiempo, la reducción de la PIO en los sistemas liposomales se empezaba a perder, mientras que en los sistemas niosomales, seguía manteniéndose más tiempo hasta las casi cuatro horas ⁽⁴⁶⁾.

De nuevo, volviendo al campo de las infecciones oculares de etiología bacteriana, ha quedado demostrada la eficacia de estos sistemas en su asociación con la quinolona gatifloxacino, un antibiótico muy usado en diversas infecciones oculares en forma de gotas. En este caso se trataron tanto niosomas tradicionales como niosomas cubiertos de quitosán. Ambos niosomas demostraron una buena eficacia de a la hora de retener el principio activo y de conseguir un correcto paso a través de las córneas de los globos oculares de cabra usados en este experimento, en este último caso el doble de permeabilidad transcorneal. A la hora de la evaluación de los tiempos de retención en la superficie ocular, los niosomal recubiertos de quitosán destacaron sobre sus análogos sin recubrimiento, obteniéndose tiempos de retención de más de 12 horas, frente a las 6 horas conseguidas por los niosomas tradicionales; aun así estos últimos, suponen una mejora respecto a las 3 horas de retención que consiguió la solución simple de antibiótico. Además, demostraron ser seguros en los estudios de toxicidad y daño histológico ⁽⁴⁷⁾.

Otra aplicación más allá de mejorar la farmacocinética de ciertos fármacos, es la de proteger a fármacos sensibles a algún factor ambiental o proceso fisicoquímico. En este sentido surge una posible aplicación para los niosomas, junto con naltrexona. La naltrexona es un opioide capaz de bloquear el receptor del factor de crecimiento opioide. Esto posiciona a la naltrexona como un tratamiento muy eficaz para enfermedades que afectan a la córnea, como las complicaciones derivadas de la diabetes. El problema es que la naltrexona es muy sensible a fenómenos de autooxidación inducida por la luz, lo cual limitaba su aplicación en forma de gotas tradicionales. Al formularse en el interior de los niosomas, estos fueron capaces de proteger eficazmente a la naltrexona de la luz al ser sometidos a pruebas con luz artificial durante repetidos intervalos. Esta propiedad, unida a su ya conocida capacidad de transporte de moléculas, posicionarían los niosomas como posibles transportadores de este opioide para tratar ciertos problemas a nivel de retina ⁽⁴⁸⁾.

En cuanto a posibles alternativas de futuro, cabe mencionar una forma alternativa de

presentación de los niosomas, los **proniosomas**. Como venimos comprobado parte del éxito de los niosomas viene de ser sistemas transportadores más estables que los liposomas ante fenómenos de hidrólisis u oxidación, además de otras ventajas obtenidas gracias a su estructura formada por tensoactivos y colesterol. Pero, al igual que los liposomas, los niosomas también sufren algunos problemas de estabilidad física. Aunque menos probables, estos fenómenos son: agregación, fusión o pérdida o hidrólisis de la molécula que encierran en su interior entre otros. Dados estos problemas, se empezaron a proponer alternativas para remediarlos, pues suponen dificultades serias ante un teórico proceso de almacenado o transporte. Así, desarrollaron un producto seco, en polvo, que simplemente necesitase hidratación momentos antes de ser aplicado para reconstituirse y formar las vesículas clásicas. En comparación con los niosomas preparados por medios convencionales, los niosomas derivados de proniosomas son superiores en su tolerancia almacenamiento, transporte y liberación de fármaco. Los datos de liberación indican que los niosomas derivados de proniosomas son al menos tan efectivos como los niosomas convencionales y, por lo tanto, pueden ofrecer una biodisponibilidad mejorada de algunos medicamentos con baja solubilidad, formulaciones de liberación controlada o efectos adversos reducidos de algunos medicamentos, pero suprimiendo buena parte de los problemas mencionados anteriormente ⁽⁴⁹⁾.

De nuevo encontramos que la vía ocular no es la más cultivada en este nuevo avance, al contrario que la vía transdérmica, por ejemplo. Si bien, se puede rescatar un estudio de vehiculización del macrólido tacrolimus. Se usaron proniosomas a base de poloxamer y fosfatidilcolina como tensoactivos y colesterol con una pequeña cantidad de etanol. El paso a través de córneas de conejo *in vitro* y su retención en ella fue superior al ser comparado con las pomadas que había en el mercado. Además, los estudios de toxicidad *in vivo* fueron muy favorables también, posicionando a los proniosomas como posibles y prometedores transportadores transcórnea ⁽⁵⁰⁾.

Por último, siguiendo con los avances en el campo de los niosomas, aparecieron los etoniosomas. Los etoniosomas constituyen el último avance en cuanto a diseño de estructura del niosoma. Se trata de niosomas que contienen etanol a cambio de una menor cantidad de colesterol, de forma que el etanol otorga a los niosomas plasticidad y elasticidad. Estos niosomas fueron testados como transportadores de prednisona. La estabilidad de estos niosomas se mantuvo durante dos meses. En cuanto a su eficacia terapéutica *in vitro*, los tiempos de curación de inflamación se vieron disminuidos a la mitad, al tiempo que los efectos secundarios que provoca la prednisona en forma de aumento de la PIO, fueron mucho menores ⁽⁵¹⁾.

6. CONCLUSIÓN

La Farmacia siempre se ha situado a la vanguardia de la investigación e innovación científica. Los centros de Investigación y desarrollo no cesan en su afán de obtener tanto nuevas moléculas farmacéuticas como nuevas formas de presentar dichas moléculas para mejorar su efectividad o seguridad. Así es como se han ido desarrollando y perfeccionando todos los sistemas transportadores de los que se ha hablado en páginas anteriores. Desde su descubrimiento hasta el día de hoy han pasado más de tres décadas y son numerosos los

sistemas que han demostrado su eficacia teórica *in vitro*, pero también *in vivo*. Tanto liposomas, niosomas o dendrímeros serían capaces de ser eficaces en el tratamiento tópico de enfermedades normalmente tratadas de forma intravítrea, muy molesta y desagradable para el paciente, como el glaucoma; o también de permitir posologías más simples en terapias antibióticas por ejemplo.

El problema, es que la mayoría de estos experimentos son realizados en ratas o conejos. La Industria farmacéutica es el paradigma de la calidad y seguridad y pasan muchos años en forma de fases experimentales para que una nueva molécula o un nuevo sistema de transporte de una molécula puedan ser autorizados en su comercialización. En el presente estudio bibliográfico, no se han encontrado formulaciones autorizadas para su comercialización en el tratamiento tópico de enfermedades del globo ocular, como sí que se ha comprobado que existen en otras vías de administración como la transdérmica.

Con los avances en tecnología farmacéutica seguramente estemos a punto de contemplar cómo alguno de estos sistemas vesiculares o dendriméricos llega al mercado tras probar su eficacia y seguridad, pero de momento habrá que esperar.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Chen H, Jin Y, Sun L, Li X, Nan K, Liu H, Zheng Q, Wang B. Recent Developments in Ophthalmic Drug Delivery Systems for Therapy of Both Anterior and Posterior Segment Diseases. *Journal of drug targeting*. 2015. 23. 7.
2. Bravo-Osuna I, Andrés-Guerrero V, Pastoriza Abal P, Molina-Martínez I.T.,Herrero-Vanrell R. Pharmaceutical microscale and nanoscale approaches for efficient treatment of ocular diseases. 2016.
3. Barber R, Shek P. Pharmaceutical particulate carriers therapeutic applications. Liposomes as a topical ocular drug delivery. 1993. 1. 1-16.
4. Meisner D. Pharmaceutical particulate carriers therapeutic applications. Liposomes as a pulmonary drug deliver system. 1993. 3. 37-39
5. Bangham A, Standish M y Watkins J. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Mol. Bio*. 1965. 13. 238-252.
6. Smolin G, Okumoto M, Felier S, Condon D. Idoxuridine-Liposome Therapy for Herpes Simplex Keratitis. *Am. F. Ophtalmol*. 1991. 91. 220-225.
7. Schaeffer H and Krohn D. Liposomes in topical drug delivery. *Invest ophtalmol. Vis. Sci*. 1982. 22. 220-227.
8. Yoshihara E, Nakae T. Cytolytic activity of liposomes containing stearylamine. *Biochim. Biophys. Acta*. 1986. 854. 93-101.
9. Guo L, Radhakrishnan R, Redemann C. Adhesion of Positively Charged Liposomes to Mucosal Tissues. *Liposome Res*. 1990. 1. 319-337.
10. Norley S, Huang L and Rouse B. Targeting of drug loaded immunoliposomes to herpes simplex virus infected corneal cells: an effective means of inhibiting virus replication in vitro. *F. Inmunolol*. 1986. 136, 681-685.
11. Barber R, Shek P. Tear-induced release of liposome-entrapped agents. *International journal of pharmaceutics*. 1990. 60. 219-227.

12. Durrani A, Davies N, Thomas M, Kellaway W. Pilocarpine bioavailability from a mucoadhesive liposomal ophthalmic drug delivery system. *International Journal of pharmaceuticals*. 1992. 88. 409-415.
13. Davies N, Farr S.J, Hadgraft J. and Kellaway, I.W. Assessment of precorneal clearance of mucoadhesive polymer coated liposomes in the rabbit. *Pharm. Pharmacol*. 1992. 9. 1137-1144.
14. Greaves J, Wilson C. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1993. 11. 349-383.
15. Budaia L, Hajdúa M, Budaia M, Gróf P, Bécic S, Noszál B. Gels and liposomes in optimized ocular drug delivery: Studies on ciprofloxacin formulations. *International Journal of Pharmaceuticals*. 2007. 343. 34-40.
16. Hosny K. Preparation and Evaluation of Thermosensitive Liposomal Hydrogel for Enhanced Transcorneal Permeation of Ofloxacin. *AAPS PharmSciTech*. 2009. 10. 1336-1342.
17. Moustafa M, Wessam E, El-Refaie M, Abdallahb O. Hyalugel-integrated liposomes as a novel ocular nanosized delivery system of fluconazole with promising prolonged effect. *International Journal of pharmaceuticals*. 2017. 534. 14-24.
18. Chen H, Pan H, Li P, Wang H, Wang X. The potential use of novel chitosan-coated deformable liposomes in an ocular drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016. 143. 455-462.
19. Tan G, Yu S, Pan H, Li J, Liu D, Yuana K. Bioadhesive chitosan-loaded liposomes: A more efficient and higher permeable ocular delivery platform for timolol maleate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. 94. 355-363.
20. Cheng T, Li J, Cheng Y, Zhang X, Qu Y. Triamcinolone acetonide-chitosan coated liposomes efficiently treated retinal edema as eye drops. *Experimental Eye Research*. 2019. 188.
21. Khalil M, Hashmi U, Riaz R, Rukh S. Chitosan coated liposomes (CCL) containing triamcinolone acetonide for sustained delivery: A potential topical treatment for posterior segment diseases. *International Journal of biological macromolecules*. 2020. 143. 483-491.
22. Moustafa M, Wessam E, El-Refaie M, Abdallahb O. Gel in core carbosomes as novel ophthalmic vehicles with enhanced corneal permeation and residence. *International Journal of pharmaceuticals*. 2018. 546. 166-175.
23. Lancina III M, Yang H. Dendrimers for ocular drug delivery. *Canadian Journal of Chemistry*. 2017. 95. 897-902.
24. Tomalia D, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G. A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polymer journal*. 1985. 17. 117-132
25. Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown N, D'Emanuele A. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *International Journal of Pharmaceuticals*. 2003. 252. 263-266.
26. Rodríguez J, Guzmán M, L. Rodríguez Villanueva. Dendrimers as a promising tool in ocular therapeutics: Latest advances and perspectives. *International Journal of pharmaceuticals*. 2016. 511. 359-316.
27. Spataro G, Malecaze F, Turrin C, V. Soler. Designing dendrimers for ocular drug delivery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 45. 1. 2010. 326-334.
28. Esfand R, Tomalia D. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today*. 2005. 6. 427-436.

29. Vandamme T, Brobeck L. Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. *Journal of controlled release*. 2005. 102. 23-38.
30. Bravo Osuna I., Noray M., Briand E., Woodward M., Argüeso P., Molina Martinez I.T. Interfacial Interaction between Transmembrane Ocular Mucins and Adhesive Polymers and Dendrimers Analyzed by Surface Plasmon Resonance. *Pharmaceutical Research*. 2012. 29. 2329-2340.
31. Carreño-Gómez B, Duncan C. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *International Journal of pharmaceuticals*. 1997. 148. 231-240.
32. Yavuz B, Pehlivan S, Bozdagğ V , Imran U. In Vitro/In Vivo Evaluation of Dexamethasone—PAMAM Dendrimer Complexes for Retinal Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015. 104. 3814-3823.
33. Yao Y, Sun K ,Liu Y, Liang N, Mu H, Yao C. Effect of Poly(amidoamine) Dendrimers on Corneal Penetration of Puerarin. *Biol. Pharm. Bull.* 2010. 33. 1371—1377.
34. Spataro G, Malecaze F, Turrin C, Soler V, Duhayon C. Designing dendrimers for ocular drug delivery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010. 45. 326-334.
35. Bravo-Osuna I, Vicario-de-la-Torre M, Andrés-Guerrero V, Sánchez-Nieves J, Guzmán-Navarro F, de la Mata F. Novel Water-Soluble Mucoadhesive Carbosilane Dendrimers for Ocular Administration. *Mol. Pharmaceutics* 2016. 13. 2966-2976.
36. Grinstaff M. Designing hydrogel adhesives for corneal wound repair. *Biomaterials*. 2007. 28. 5205-5214.
37. Holden C, Tyagi P, Thakur A, R. Kadam. Polyamidoamine dendrimer hydrogel for enhanced delivery of antiglaucoma drugs. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012. 8. 776-783.
38. Uchegbu I, Florence T. Non-ionic surfactant vesicles (NSVs or niosomes): physical and pharmaceutical chemistry. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1995. 58. 1-55.
39. Chandu V. P, Arunachalam A, Jeganath S, Yamini K, Tharangini K, Chaitanya G. Niosomes: a novel drug delivery system. *International journal of novel trends in pharmaceutical sciences*. 2012.
40. Saettone M, Perini G, Carafa M, Santucci E, Alhaique F. Non-ionic surfactant vesicles as ophthalmic carriers for cyclopentolate. A preliminary evaluation. *S.T.P. Pharma. Sci.* 1996. 6. 94-98.
41. P. Kaur I, Garg A, K.Singla A, Aggarwa D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *International journal of pharmaceuticals*. 2004. 269. 1-4.
42. Vyas SP, Mysore N, Jaitely V, Venkatesan N. Discoidal niosome based controlled ocular delivery of timolol maleate. *Die Pharmazie*. 1998. 53. 466-469.
43. Guinedi A, Mortada N, Rania S, Hathout M. Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005. 306. 71-82.
44. Kaur I, Mitra K, Aggarwal D. Development of a vesicular system for effective ocular delivery of acetazolamide A comprehensive approach and successful venture. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2007. 17. 33-41.
45. Abdelbary G, El-gendy N. Niosome-Encapsulated Gentamicin for Ophthalmic Controlled Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2008. 9. 740-747.

46. Prabhu P, Nitish KR, Koland M, et al. Preparation and Evaluation of Nano-vesicles of Brimonidine Tartrate as an Ocular Drug Delivery System. *J Young Pharm.* 2010. 2. 356–361.
47. Zubairu Y, Negi LM, Iqbal Z, Talegaonkar S. Design and development of novel bioadhesive niosomal formulation for the transcorneal delivery of anti-infective agent: In-vitro and ex-vivo investigations. *Asian J Pharm Sci.* 2014. 10. 322–330.
48. Abdelkader H, Wu Z, Al-Kassas R, Alany RG. Niosomes and discomes for ocular delivery of naltrexone hydrochloride: Morphological, rheological, spreading properties and photo-protective effects. *Int J Pharm.* 2012. 433. 142–148.
49. Hu C, Rhodes DG. Proniosomes: A novel drug carrier preparation. *Int J Pharm.* 1999. 185. 23–35.
50. Li Q, Li Z, Zeng W, Ge S, Lu H, Wu C, et al. Proniosome-derived niosomes for tacrolimus topical ocular delivery: In vitro cornea permeation, ocular irritation, and in vivo anti-allograft rejection. *Eur J Pharm Sci.* 2014. 62. 115–123.
51. Gaafar PM, Abdallah OY, Farid RM, Abdelkader H. Preparation, characterization and evaluation of novel elastic nano-sized niosomes (ethoniosomes) for ocular delivery of prednisolone. *J Liposome Res.* 2014. 24. 204–215.