

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE VALENCIA



**“Estudio de la modificación en la absorción de fármacos
en giardiasis y nuevas estrategias de formulación”**

Verónica Vivancos Gómez

Directores:

Dr. Vicente G. Casabó Alós

Dra. Isabel González Álvarez

Dra. Marta González Álvarez

Valencia, 2016

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE VALENCIA



**“Estudio de la modificación en la absorción de fármacos
en giardiasis y nuevas estrategias de formulación”**

Trabajo presentado por Verónica Vivancos Gómez para obtener el grado de Doctor en Farmacia.

Fdo. Verónica Vivancos Gómez

D. VICENTE GERMÁN CASABÓ ALÓS, Doctor en Farmacia y Catedrático de la Universidad de Valencia, Dña. MARIA ISABEL GONZÁLEZ ÁLVAREZ, Doctora en Farmacia y Contratada Doctor en la Universidad Miguel Hernández de Elche y Dña. MARTA GONZÁLEZ ÁLVAREZ, Doctora en Farmacia y Contratada Doctor en la Universidad Miguel Hernández de Elche certifican que:

El presente trabajo: *“Estudio de la modificación en la absorción de fármacos en giardiasis y nuevas estrategias de formulación”*, presentado por Dña. Verónica Vivancos Gómez para optar al grado de Doctor ha sido realizado bajo su dirección y una vez revisado, no encuentran objeciones para que sea presentado a su lectura y su defensa.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Valencia, a 5 de mayo de dos mil dieciséis.

Fdo. Vicente Germán
Casabó Alós

Fdo. María Isabel
González Álvarez

Fdo. Marta González
Álvarez

Agradecimientos

Antecedentes

Recapitulando donde lo dejamos, en julio de 2012 era una estudiante de máster recién licenciada que se adentraba en el mundo de la investigación. Llena de entusiasmo, incertidumbre y alegría ponía fin a una etapa y comenzaba otra más emocionante si cabe: el doctorado.

En octubre de 2012 empecé esta andanza con mis queridos tutores: Isabel, Marta y Vicente; y aunque la termine con dos firmas, sé que mi querido tutor estaría muy orgulloso de mí y me acompañaría en este día con una sonrisa y un fuerte abrazo.

A el gran **Vicente G. Casbó "V.G"** le quiero agradecer todo lo que me enseñó, la paciencia que tuvo y sobretodo su buen humor, alegrando los días de clase y laboratorio.

A **Isa**, mi madrina de promoción, fue la que me orientó cuando estaba indecisa y me enseñó con pasión este camino. Experimentos interminables, horas de Excel, dudas en horario no procedente...pero también muchas risas, confesiones, paseos, tardes de compras y pizzas. Muchas gracias por todo lo que has compartido conmigo, puedo decir que tras estos años me llevo una amiga para siempre, te quiero mucho.

A **Marta**, una profe de las que se hacen querer, que te aprieta cuando hace falta pero nunca te deja caer. Muchas gracias por lo mucho que me has enseñado, por tu implicación, tu energía, tus ánimos, tu alegría, tu cariño, tu paciencia y sobre tu amistad. Te quiero.

Material y Métodos

Durante estos años me he cruzado con personas maravillosas, con las que he compartido momentos de todo tipo, pero que me han servido para crecer. Ellos han sido los "materiales y métodos" gracias a los cuales he podido llevar a cabo mis experimentos, porque no hay que olvidar que siempre hemos sido el "**dream team**", y que nuestra forma de trabajar es la más bonita y efectiva que he visto jamás. Siempre ayudándonos los unos a los otros, nunca sientes estar solo, pues sabes que algún miembro de la "familia" estaba ahí para echarte una mano.

Marival, has sido como una madre para mí y para todos nosotros. Un honor formar parte de esta familia que has creado tras muchos años de esfuerzo y dedicación. Tus enseñanzas, tus consejos, siempre llenos de cariño y alegría porque eres todo corazón. Mil gracias por dejarme formar parte de este grupo.

Víctor Mangas, has sido el doctorando mayor desde que llegué y he tenido el honor de verte conseguir tu grado de doctor. Una persona trabajadora, siempre dispuesto a ayudar a sus compañeros en todo momento. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado y los consejos que me has dado.

Sarín, una de las personas más importantes de mis años de doctoranda. Contigo he pasado la frontera de la amistad, convirtiéndonos casi en hermanas. Hemos compartido muchos momentos tanto dentro como fuera del laboratorio. También agradecer a **Ignacio** por sus dibujos tan bonitos y colocar las pipetas tan bien. Ahora en Venezuela pero siempre en mi corazón, gracias.

Isa Lozoya, comenzamos juntas este viaje, y aunque no nos conocíamos pronto nos hicimos amigas. Máster, tesis, cursos, congresos...siempre juntas y compartiendo todo lo que sabemos y todo lo que tenemos. Muchas gracias a ti y a **Adri** por vuestro apoyo y acogida.

Carmen, gran apoyo en mis primeros pasos por el laboratorio. Siempre dispuesta a ayudar y a enseñar. Un placer cruzarme contigo en la vida y muchas gracias por todo. **Nasim**, thank you very much for all your help during my PhD life. Always in my heart. **Mayte**, recuerdo nuestros primeros pasos, aprendiendo a hacer curvas de calibración y mira ahora como hemos avanzado. Gracias por tu ayuda y ánimo en lo poco que te queda. **Nachete**, aunque ya hayas echado a volar, mucho ánimo en tu última etapa de tesis. Gracias por todos los momentos vividos. **Alejandrino**, un placer haber compartido estos años contigo, con tu alegría, tu disposición y ayuda en todo momento. Sigue así, tienes algo "mágico". **Adrián**, me alegro mucho de haber compartido contigo este tiempo. Siempre recordaré los momentos vividos, las risas y todo lo aprendido. Gracias y mucho ánimo, el camino es largo pero al final se llega. **Andrés**, llegado desde muy lejos y pese a las dificultades encontradas siempre has tirado para delante con una sonrisa, gracias a ti también por los momentos compartidos. **Tere**, tan dulce y alegre, gracias por los momentos vividos y mucha suerte en tu nuevo camino. **Estela**, la última incorporación, mucho ánimo: aprovecha, aprende y disfruta, pues estos años pasan muy rápido. Gracias a ti también por los ratos compartidos. **Migue** y su grupo, también habéis formado parte de mi tesis y me habéis aconsejado con alegría cuando lo he necesitado. Gracias.

A mis compañeros de departamento y máster, técnicos, y profesores de la **Universidad de Valencia**, en especial a **Mati, Virginia** y **Mamen**, quiero agradecer vuestra ayuda y apoyo en este largo camino.

A **Marusi**, mi otra “tutora”, de la **Universidad CEU Cardenal Herrera** de Valencia. Parte de esta investigación no hubiese sido posible sin tu ayuda y tu conocimiento sobre los parásitos. Muchas gracias.

A **Ramón Martínez Mañez** y **Carmen Coll** de la **Universidad Politécnica de Valencia** por su inestimable ayuda en la síntesis y caracterización de las micropartículas.

Mi última parte del experimental la llevé a cabo en la Universidad de Portsmouth (Reino Unido), una etapa que me daba mucho miedo pero que resultó ser una de las mejores de mi vida. Pues aunque estés a miles de kilómetros de tu realidad, cuando amas lo que tienes, tienes todo lo que necesitas. Enriquecedora e intensa en todos los sentidos, pues pude conocer la metodología que siguen las universidades europeas, convivir con diferentes culturas y aprender algo nuevo cada minuto.

Thanks to **Katerina**, my supervisor. You taught me about nanotechnology and helped me when I needed.

Thanks to all my lab friends: **Diana, Louise, Ryan, Mohsen, Salman** (and family), **Amber** and **Anthony**. I had a really nice stage in your lab. You welcomed me as one of yours, you helped me in and out of the lab and you gave me something unique moments. Out of the lab, I met “my family” there: **Alain, Jorge, Joaqui, Arthur, Marta, Nerea** and **Amanda** and all the International people I met. Thanks for all.

Resultados

Tras volver de Inglaterra, comencé con el momento temido por todos los doctorandos: “la escritura de la tesis”. Una época en la que tienes que ser constante, paciente y estar motivado y seguro de lo que estás haciendo, pues tienes que recapitular todo lo que has trabajado estos años y prepararlo para este DÍA. Por esto quiero agradecer a todas las personas que me he ido cruzando en Alicante, Valencia, Murcia y Granada, en especial a mis **monstruos, amigos de la uni/allicantinos, boticarias, mangueros, compañeras de piso, compis de trabajo, scouts, maristeñas, Feli**, mi **compi, hermano**, mi **Cuqui** y demás personas que me han hecho sentir como en casa durante estos años.

Al equipo de **INESEM Business School**, en especial a mis compañeros y amigos del claustro académico, por su apoyo, ayuda, alegría y paciencia en estos últimos meses. Un placer empezar esta nueva etapa con vosotros. Muchas gracias.

Por último agradecer a mi **padre**, mi **madre** y mi **hermano**, por la paciencia y el respeto que han tenido hacia mis horarios y mi trabajo interminable. Porque hoy se verá recompensado el esfuerzo de todos.

A mis **abuelas** y **tita Mili**; y al resto de mi querida familia: los **Vivancos**, los **Gómez**, y mis buenos amigos **Ruiz-Nicolás**.

En especial a mis primas: **Ana**, **Leyre**, **Mariajo**, **Laura**, **Marta** y **Mavi** por las largas conversaciones y por confiar en mí en todo momento.

Cerrando felizmente una etapa en la que he aprendido y disfrutado a partes iguales. Porque en el equilibrio está el éxito.

“The scientist is not a person who gives the right answers; he is one who asks the right questions”.

Claude Levi-Strauss (French Anthropologist)

ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo
ANOVA: Análisis de varianza
APS: Persulfato de amonio
ATG o TGA: Análisis termogravimétrico
ATCC: American Type Culture Collection
ATP: Trifosfato de adenosina
AUC: Área bajo la curva
b: ordenada en el origen de la recta
BBMV: Brush Border Membrane Vesicles
BLMV: Basolateral Membrane Vesicles
BSA: Seroalbúmina bovina
C: concentración
CAT: Catalasa
CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
 C_{dador} : Concentración de fármaco el compartimento dador
 $C_{\text{dadorINICIAL}}$: Concentración inicial de fármaco el compartimento dador
 $C_{\text{experimental}}$: Concentración calculada mediante la interpolación en la recta de calibración
 C_{receptor} : Concentración de fármaco el compartimento receptor
 $C_{\text{receptor0}}$: Concentración de fármaco en el compartimento receptor al inicio del intervalo de tiempo considerado
 $C_{\text{teórica}}$: Concentración teórica de la muestra patrón
c.s.: cantidad suficiente
cm: centímetros
 C_{max} : Concentración plasmática máxima
COSY: Correlation Spectroscopy
CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio
CV (%): Coeficiente de variación
DE: Desviación Estándar
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Dimetil sulfóxido
E: Concentración obtenida experimentalmente
 E_a/ε_a : Error absoluto

E_r (%) / ε_r (%): Error relativo
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EP: Farmacopea Europea
ES: Error Standard
FDA: American Food and Drug Administration (Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos)
FeSSGF: Fluido gástrico simulado en estado postprandial
FeSSIF: fluido intestinal simulado en estado postprandial
FLUO: Fluorescencia
FQ: físico-químicas
G: presencia de *Giardia*
GPX1: Glutación peroxidasa
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution (Solución salina equilibrada de Hanks)
HEPES: Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina, N-2-etanosulfónico (tampón)
HPLC: High Performance Liquid Chromatography Cromatografía líquida de alta resolución
IPMC: Ionic Polymer Metal Composites
 k_a/k_{ap} : Constante de absorción o constante de velocidad de absorción intrínseca
 k_0 : constante de velocidad de reabsorción de agua
LC: Límite de cuantificación
LCST: Temperatura Crítica de Disolución
LD: Límite de detección
LIOF.: liofilizado
L-Y: Lucifer Yellow
 m : pendiente de la recta
MCM-41: Mobil Composition of Matter No. 41
mEq: mili equivalentes
min.: minuto
mL: mililitro
mOsm: mili osmoles
MRP1: Multidrug Resistance-associated Protein 1
MRP2: Multidrug Resistance-associated Protein 2
mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero

μM : micro molar
NG: ausencia de *Giardia*
NHS: N-Hidroxisuccinimida
nm: nano mol
NS: no existen diferencias estadísticamente significativas
OAT1: Organic Anion Transporter 1
OATP: Organic Anion-Transporting Polypeptide
OCT: Organic Cation Transporter 1
OGG1: Oxoguanina glicosilasa
OMA: Otitis Media Aguda
OMS: Organización Mundial de la Salud
 P_{AB} o P_{ab} : Permeabilidad Apical-Basolateral
 P_{BA} o P_{ba} : Permeabilidad Basolateral-Apical
PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PAMPA: parallel artificial membrana permeation assay
PARP1: Poli-ADP Ribosa Polimerasa
PBS: Phosphate Buffered Saline (solución tampón)
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
 P_{eff} : Coeficiente de permeabilidad efectiva
PEI: polietilenimina
PEPT1: Peptide Tansporter 1
P-gp: Glicoproteína-P
PM: Peso Molecular
PNIPAM: poli(N-isopropilacrilamida)
 Q_{total} : cantidad total de fármaco en el sistema
R: Radio intestinal efectivo
RAD51: Recombinasa de ADN
Rpm: Revoluciones por minuto
 r^2 : coeficiente de correlación
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
ROS: Especies Reactivas de Oxigeno
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RX: Rayos X
S: existen diferencias estadísticamente significativas
S: área del inserto en centímetros cuadrados (área de difusión)

SDS: Dodecil Sulfato Sódico
SOD1: Superóxido dismutasa 1
SOD2: Superóxido dismutasa 2
T: Tiempo
T^a: Temperatura
TBS: Tris Buffered Saline (tampón salino Tris)
TEA/TEAH₃: trietanolamina
TEER: Resistencia Eléctrica Transepitelial
TEM: Microscopia Electrónica de Transmisión
TEMED: tetrametiletildiamina
TEOS: tetraetilortosilicato
TFA: ácido trifluoroacético
T.R: Tiempo de retención
TR: Transcripción Reversa
Medio TYI-S: medio de Keister modificado para el cultivo de *Giardia in vitro*
Uds.: Unidades
UV: Ultravioleta
UVM-7: Bimodal mesoporous materials
V: Volumen remanente en intestino a cada tiempo
V₀: Volumen remanente en intestino a tiempo inicial
V_{dador}: Volumen del compartimento dador
Vol. iny.: Volumen de Inyección
V_{receptor}: Volumen del compartimento receptor
V_t: Volúmenes teóricos para cada tiempo de toma de muestra
x: concentración teórica
y: área del cromatograma
z-pot: potencial Z
5HGC: muestra de Glicol Chitosan tras la degradación ácida durante 5 horas
3HGC: muestra de Glicol Chitosan tras la degradación ácida durante 3 horas
λ: longitud de onda
σ: desviación estándar de la ordenada en el origen

Índice

I Resumen	1
I Abstract.....	5
II Objetivos	9
II Objectives	11
III Introducción.....	13
A. <i>Giardia intestinalis</i>	14
1. Ciclo biológico y especies	14
2. Epidemiología	15
3. Signos y síntomas	16
4. Transmisión: prevención y cronificación	17
5. Patogenia en giardiasis	19
6. Diagnóstico.....	27
7. Tratamiento de la giardiasis	28
B. Absorción intestinal	34
1. Sitio de absorción	34
2. Mecanismos de absorción.....	35
2.1. Difusión pasiva.....	36
2.2. Mecanismos especializados de transporte.....	41
3. Métodos de estudio de permeabilidad	49
3.1. Métodos estructurales.....	50
3.2. Métodos funcionales	51
4. Regla de las 3 Rs.....	70
C. Fármacos en pediatría.....	72
1. Analgésicos/Antipiréticos.....	73

1.1. Paracetamol	74
1.2. Ibuprofeno	75
2. Antiarrítmicos/ Antipalúdicos	76
2.1. Quinidina	76
3. Antibióticos β -lactámicos	77
3.1. Amoxicilina	79
3.2. Cefadroxilo	79
4. Antiepilépticos	80
4.1. Carbamazepina	81
4.2. Diazepam	83
4.3. Fenobarbital	84
5. Antituberculosos	86
5.1. Isoniazida	88
5.2. Rifampicina	88
D. Tratamientos no convencionales	90
1. Aplicaciones de los sistemas inteligentes	99
IV Material y Métodos	103
A. Compuestos ensayados	104
1. Soluciones de fármacos	104
2. Nuevas formulaciones para el tratamiento de la giardiasis	106
2.1. Hidrogel inteligente de Glicol Chitosan cargado con Metronidazol	106
2.2. Micropartículas mesoporosas de sílice con puerta molecular pH dependiente para control biológico de <i>Giardia</i> <i>intestinalis</i>	111
B. Condiciones experimentales	115
1. Cultivo de <i>G. intestinalis</i>	115

2. Ensayo en animales	116
2.1. Diseño del ensayo	116
2.2. Animales de experimentación	117
2.3. Soluciones de trabajo	118
2.4. Técnica experimental en duodeno.....	121
2.5. Ensayo de reabsorción de agua.....	126
2.6. Tratamiento de las muestras	126
3. Ensayos en cultivos celulares.....	129
3.1. Diseño del ensayo de permeabilidad.....	129
3.2. Línea celular Caco-2.....	130
3.3. Soluciones de trabajo	131
3.4. Técnica experimental.....	133
3.5. Estudio de recuperación del compuesto	143
3.6. Tratamiento de las muestras	144
4. Evaluación del daño celular producido por <i>G. intestinalis</i>	146
4.1 Técnica experimental.....	147
4.2 Tratamiento de muestras	147
5. Ensayos de liberación	151
5.1. Ensayo de liberación <i>in vitro</i> del hidrogel de Glicol Chitosan cargado con Metronidazol.....	151
5.2. Ensayo de liberación <i>in vitro</i> de micropartículas mesoporosas de sílice con puerta molecular pH dependiente para control biológico de <i>Giardia intestinalis</i>	152
C. Valoración de muestras	157
1. Elementos cromatográficos.....	157
2. Condiciones cromatográficas	157

D. Validación de los métodos analíticos	159
1. Ensayo de linealidad	159
2. Ensayo de exactitud y precisión	160
3. Límite de detección y cuantificación	161
E. Métodos matemáticos y estadísticos.....	161
1. Análisis de regresión.....	161
2. Pruebas de comparación de medias	162
2.1. Análisis de varianza global: <i>ANOVA</i> de un factor y prueba de comparación de dos medias: ensayo <i>t de Student</i>	162
2.2. Prueba de comparación múltiple: <i>Prueba de Scheffé</i>	163
V Resultados y Discusión.....	165
A. Validación del método analítico de los compuestos ensayados..	166
1. Ensayo de linealidad	166
2. Ensayo de exactitud y precisión	169
3. Límite de detección y cuantificación	171
B. Efecto de <i>G. intestinalis</i> sobre la permeabilidad intestinal.....	172
1. Ensayo <i>in situ</i>	174
1.1. Amoxicilina.....	174
1.2. Paracetamol	176
2. Ensayos <i>in vitro</i>	178
2.1. Puesta a punto del método <i>in vitro</i>	178
2.2. Validación del método <i>in vitro</i>	200
2.3. Fármacos a estudio	209
C. Formulaciones	238
1. Hidrogel inteligente de Glicol Chitosan cargado con Metronidazol.....	238

1.1. Preparación y caracterización del polímero: Glicol Chitosan (GC).....	238
1.2. Caracterización tras la conjugación del polímero Glicol Chitosan (5HGC) con el tetrapéptido (sensible a Catepsina)	242
1.3. Caracterización del hidrogel tras cargarlo con Metronidazol	243
1.4. Ensayo de liberación del hidrogel.....	244
2. Micropartículas mesoporosas de sílice con puerta molecular pH dependiente para control biológico de <i>Giardia intestinalis</i> ...	246
2.1. Descripción del sistema de puerta molecular.....	246
2.2. Caracterización de los materiales preparados	247
2.3. Ensayos de liberación de las micropartículas.....	253
2.4. Ensayos de viabilidad.....	254
VI Conclusiones	257
VI Conclusions.....	259
VII Bibliografía.....	261

I Resumen

Giardia intestinalis es el agente causal de la giardiasis, una de las patologías intestinales más comunes en todo el mundo, cuya sintomatología principal es diarrea y malabsorción. La OMS indica que la prevalencia mundial es de 200 millones de individuos afectando especialmente a niños entre 2 y 12 años, los cuales son en su mayoría asintomáticos. Diversos estudios demuestran que existe un riesgo importante en la población infantil, pues la carencia de vitaminas y otros nutrientes que provoca esta parasitosis puede ocasionar graves desórdenes, como anemia, retraso del crecimiento y discapacidad intelectual.

Aunque el efecto de *Giardia* sobre la absorción de nutrientes y vitaminas se ha estudiado ampliamente, hay pocos trabajos realizados sobre cómo afecta este parásito a la absorción de fármacos. Craft y col., observaron que la absorción de algunos antibióticos disminuía en pacientes con giardiasis, comprometiendo la eficacia y seguridad del tratamiento farmacológico. Esto supone un peligro para la población pediátrica pues pequeños cambios en la dosis absorbida pueden dar lugar a intoxicación o a infradosificación. Por ello, surge la necesidad de obtener un modelo experimental fiable que permita determinar el efecto de esta parasitosis en la absorción de fármacos, sobre todo de aquellos con estrecho margen terapéutico.

Resumen

Con el fin de valorar el efecto de la colonización de *G. intestinalis* en la absorción intestinal se realizaron estudios *in vitro* e *in situ* en presencia y ausencia de dicho parásito.

Los resultados obtenidos indican que *Giardia intestinalis* modifica la permeabilidad de los fármacos ensayados, lo que concuerda con los hallazgos *in vivo* observados con otros fármacos o nutrientes. Esto puede ser debido a que *Giardia intestinalis* crece formando una monocapa adherida a la membrana intestinal que impide el correcto funcionamiento de los mecanismos biológicos de transporte. En los fármacos que se absorben por difusión pasiva se ve disminuida la permeabilidad debido al impedimento estérico que ejerce el parásito y en aquellos que lo hacen por transporte paracelular la absorción se ve aumentada debido al daño que ocasiona *G. intestinalis* en las uniones intercelulares. Además, los transportadores activos se bloquean en presencia de *G. intestinalis* provocando una disminución de permeabilidad si el fármaco es sustrato de un transportador de absorción o un aumento de permeabilidad si se trata de un transportador de secreción.

Por otro lado, se ha prestado poca atención al tratamiento de esta infección parasitaria. Los fármacos que están disponibles pueden tener efectos adversos e incluso están contraindicados en determinadas situaciones clínicas. El fármaco más utilizado es el Metronidazol. Se ha informado de fallos terapéuticos a causa de la aparición de resistencias y de la dificultad de dosificar correctamente en niños debido al mal sabor del principio activo. En ocasiones, se administra sin que el diagnóstico sea positivo y debido a su elevada biodisponibilidad se va absorbiendo a lo largo del aparato digestivo, por lo que no llegará la totalidad de la dosis al lugar de acción. Así, la dosis inicial que se debe administrar para alcanzar

Resumen

valores adecuados a nivel intestinal es elevada y podría provocar efectos secundarios. A causa de estos inconvenientes, surge la importancia de buscar una nueva formulación que permita que el fármaco se libere únicamente en el lugar de acción. El tratamiento anti-giardiasis puede mejorar diseñando formulaciones más específicas de Metronidazol. En este trabajo se han obtenido hidrogeles de Glicol Chitosan y micropartículas de sílice sensibles a pH. Las micropartículas con puerta molecular permiten la liberación del Metronidazol en el duodeno, que es donde se acumula principalmente la población parasitaria. El hidrogel inteligente ha permitido la liberación del fármaco únicamente en presencia de *Giardia*, lo que posibilitaría la administración de la formulación en casos de diagnóstico dudoso y conseguir solo la liberación del fármaco en el caso de que el niño esté infectado. Ambas formulaciones darían lugar a la reducción de los efectos adversos al disminuir la dosis necesaria, ya que evitan la pérdida de fármaco en los primeros tramos del tracto gastrointestinal, entre otras ventajas.

Resumen

I Abstract

Giardia intestinalis is the causative agent of giardiasis, which is one of the most common intestinal diseases around the world. The World Health Organization (WHO) shows a prevalence of 200 million people worldwide and is more frequent in children between 2 and 12 years of age. The main symptoms include diarrhoea and malabsorption although most are asymptomatic. Several studies evidence a lack of vitamins and nutrients during the infection, which is a risk in childhood as this could lead to serious health alterations such as anaemia, stunting and intellectual disabilities.

The effect of *Giardia* on the absorption of nutrients and vitamins has been widely studied, although there are few studies conducted on how this parasite affects drug absorption. Craft et al., found that the absorption of some antibiotics decreased in patients with giardiasis, compromising the effectiveness and safety of drug therapy. This is dangerous for paediatric patients because small changes in the absorbed dose can lead to toxicity or undertherapeutic drug concentrations. A reliable experimental model for determining the effect that this parasite has on the absorption of drugs is necessary, especially for drugs with narrow therapeutic window.

Abstract

In order to assess the effect of *G. intestinalis* colonization in intestinal absorption, I performed *in vitro* and *in situ* studies in the presence and absence of the parasite.

The results suggest that *Giardia intestinalis* modifies the permeability of the drugs tested, which is consistent with the *in vivo* findings observed in other drugs or nutrients. The growth of *Giardia intestinalis* involves the formation of a monolayer that adheres to the intestinal membrane and prevents the correct performance of biological transport mechanisms. The permeability is reduced in drugs absorbed by passive diffusion due to steric hindrance exerted by the parasite. Conversely, the absorption is increased in drugs transported via the paracellular pathway due to the damage of tight junctions caused by *G. intestinalis*. Furthermore, active carriers are blocked in the presence of *G. intestinalis* causing a decrease in permeability if the drug is carried by influx, or an increase in permeability if it is carried by efflux.

The treatment of this parasitic infection has not been extensively studied. The available drugs can cause several adverse effects and are even contraindicated in certain clinical situations. The drug most widely used for this infection is Metronidazole. Therapeutic failures have been reported due to drug resistance and wrong dosage in children because of the bad taste of the active ingredient. The drug is also sometimes administered without a positive diagnosis. Metronidazole is quickly absorbed in the digestive tract due to its high bioavailability, therefore it is difficult for the entire dose to reach the site of action. Thus, the initial dose needed to achieve appropriate values in the intestine is high and could cause undesirable effects. A novel formulation that allows

Abstract

the drug to be released only at the site of action is important because of these drawbacks. The design of new and more specific Metronidazole formulations could improve the current treatment. In this work we have obtained Glycol Chitosan hydrogels and pH sensitive silica microparticles. The microparticles with molecular gate are designed to release the Metronidazole into the duodenum, where the parasite mainly resides. The smart hydrogel allows the drug to be released only in the presence of *Giardia*, therefore the formulation can even be administered in the case of doubtful diagnosis as the drug is only released if the child is infected. Reducing the adverse effects by decreasing the necessary dose and preventing loss of drug in the first sections of the gastrointestinal tract is a main advantage of both formulations.

Abstract

II Objetivos

El objetivo global de esta tesis es determinar cómo afecta la colonización por *Giardia intestinalis* a la absorción de fármacos, así como buscar alternativas más seguras y eficaces al tratamiento convencional de la giardiasis. Para dar respuesta a este objetivo global se establecieron varios objetivos parciales:

- Desarrollar un nuevo modelo experimental *in vitro* que permita predecir el efecto de la giardiasis sobre la absorción de fármacos.
- Valorar el efecto de la colonización de *G. intestinalis* en la absorción intestinal de fármacos de uso pediátrico.
- Buscar nuevas formulaciones orales para mejorar los resultados del tratamiento convencional contra este parásito.

Objetivos

II Objectives

The main objective of this work is to determine the effect of *Giardia intestinalis* colonization on drug absorption as well as seeking safer and more effective alternatives to conventional treatment of giardiasis. Some partial objectives are formulated below to achieve the main goal:

- Developing a new *in vitro* experimental model that predicts the effect of giardiasis on drugs absorption.
- Evaluating the effect of *G. intestinalis* colonization in intestinal absorption of paediatric drugs.
- Improving the results of the conventional treatment against this parasite, finding new oral formulations.

Objetivos

III Introducción

A. Giardia intestinalis

Giardia intestinalis (sinónimo de *lamblia, duodenalis*) es un protozoo parásito flagelado capaz de colonizar el intestino delgado de diversos vertebrados, incluidos los humanos. Presenta una forma proliferativa o vegetativa llamada trofozoíto y una forma de resistencia denominada quiste¹.

Fue identificado por primera vez en el año 1681 por Anton van Leewenhock (inventor del microscopio) en sus propias heces². Posteriormente fue descrita por Lamb, el cual la denominó “*Cercoma intestinalis*” en 1859 y más exhaustivamente por Dobl en 1932³. En 1882, Kunstler estableció el género *Giardia* y en 1888 Blanchard propuso el nombre de *lamblia* para el género, en homenaje al médico Vilem Lamb recibiendo el nombre de “*Lamblia intestinalis*”. En 1915, Stiles propuso la denominación *Giardia lamblia* para este parásito y así es como se conoce actualmente⁴.

1. Ciclo biológico y especies

La infección se inicia con la ingestión del quiste maduro por un hospedador. Cuando éste llega al duodeno se disuelve la pared quística, dando lugar a un individuo tetranucleado⁵, que se divide inmediatamente en dos trofozoítos binucleados los cuales se unen al epitelio intestinal. Los trofozoítos de *Giardia* quedan adheridos a las microvellosidades del intestino delgado (principalmente en el duodeno) por medio de los discos succionarios y del movimiento del segundo y tercer par de flagelos⁶. Los trofozoítos se alimentan y reproducen hasta

que el contenido intestinal inicia el proceso de deshidratación, momento en el que comienza el enquistamiento, se pierden los flagelos, adquieren una forma ovalada y se rodean de una pared quística, formándose así los quistes que son eliminados con las heces.

Normalmente se localiza en la superficie apical del enterocito, por lo que no se considera un organismo invasivo, sin embargo se han descrito casos de parásitos encontrados dentro de la mucosa intestinal⁷.

En base a sus características morfológicas, el género *Giardia* se divide en 3 especies *Giardia agilia* que infecta anfibios, *Giardia muris* que infecta roedores, pájaros y reptiles y *Giardia lamblia* que infecta mamíferos, también denominada *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis*⁸.

2. Epidemiología

Giardia es el agente causal de la giardiasis, una de las patologías intestinales de transmisión fecal-oral más común en el mundo. La incidencia es mayor en regiones de clima templado^{9,10}. La prevalencia en los países en vías de desarrollo es de 20-30% frente a 2-5% en países industrializados¹¹⁻¹⁴. La transmisión aumenta al final del verano y al inicio del otoño, siendo esporádica y epidémica¹⁵. Un estudio realizado recientemente en Cataluña¹⁶ demostró una elevada prevalencia de *G. intestinalis* en la población en comparación con otros parásitos intestinales incluido *Cryptosporidium*^{17,18}. Además, al igual que en otros países, en España se ha comprobado que el grupo más vulnerable es la población infantil^{18,19}. De hecho, un estudio llevado a cabo en guarderías

de Alcoy (Alicante) permitió detectar la presencia de *Giardia intestinalis* en el 11,8% de niños entre 12 y 43 meses²⁰. Esto puede ser debido a la inmadurez inmunológica y al poco desarrollo de hábitos higiénicos en la población infantil²¹.

En septiembre de 2004 debido a su importancia clínica y distribución global, la OMS incluyó a *G. intestinalis* en la iniciativa de “enfermedades huérfanas” con el objetivo de resolver las incógnitas sobre la biología del parásito, la epidemiología, el tratamiento y las interacciones parásito-huésped^{22,23}. La OMS indica que la prevalencia mundial es de 200 millones de individuos infectados afectando especialmente a niños entre 2 y 12 años, los cuales son en su mayoría asintomáticos^{10,24}. También son grupos de riesgo las familias de los niños con giardiasis por infección intra-familiar. En un estudio en familiares de niños infectados se encontraron trofozoítos en las heces en el 25% de los casos². La prevalencia de infección en pacientes con tratamiento de inmunosupresores e inmunodeficiencias como la deficiencia de IgA secretora, varía entre 29 y 71%. El riesgo también está aumentado en pacientes con SIDA^{3,7,9,10,15,25}. La malnutrición también se puede considerar un factor de riesgo o agravante en la giardiasis, ya que se observa un acortamiento del microvilli, lo que se traduce en una disminución de la capacidad de absorción del intestino²⁶.

3. Signos y síntomas

Esta patología cursa con diarrea acuosa, esteatorrea, náuseas, dolor abdominal, vómitos, pérdida de peso y malabsorción de nutrientes, aunque en ocasiones es asintomática²⁷⁻²⁹. La relación entre la

gravedad de las lesiones que el parásito causa en la mucosa asociada a la intensidad de los síntomas y la carga parasitaria, ha sido y sigue siendo motivo de controversia⁴. Además de las alteraciones en el tracto gastrointestinal, la infección puede incluir manifestaciones extra-intestinales como artritis, rinitis e iridociclitis¹⁵. Más raramente se han descrito manifestaciones alérgicas y dermatológicas que obedecen a dos mecanismos: el primero, que el parásito y sus productos metabólicos son antigénicos para el huésped; y el segundo, que el parásito actúa como hapteno, llegando a producir anticuerpos específicos que se encuentran en el suero de los pacientes con giardiasis³⁰.

4. Transmisión: prevención y cronificación

La transmisión de la enfermedad está relacionada con medidas higiénicas deficientes, un bajo nivel socioeconómico y el contacto con aguas contaminadas con heces.

Normalmente se comporta como una infección autolimitante pero se ha descrito una cronificación de la infección en un 15% de los casos^{8,31}. El mecanismo para la perpetuación de la infección por este parásito, o infección crónica, se debe a factores como: inmunosupresión, hipogammaglobulinemia, disminución en el número de células T, desnutrición y supresión en la producción de anticuerpos³².

Existen mecanismos de defensa fisiológicos para prevenir la infección. El primer nivel de defensa contra la infección por *G. intestinalis* es el aumento de la segregación de mucus durante la infección, que se considera un factor fisiológico de protección contra la giardiasis²⁶, ya que este mucus dificulta la adhesión de *G. intestinalis* al intestino. Además, los

linfocitos T segregan linfocinas y posteriormente se generan anticuerpos anti-*Giardia*, además de la respuesta inflamatoria celular con infiltrado de mononucleares y polimorfonucleares.

En cuanto a las medidas de prevención, en los países desarrollados, el tratamiento de las aguas de consumo ha reducido su incidencia, aunque en los últimos años la resistencia de los quistes de *Giardia* a las medidas convencionales de tratamiento de aguas ha contribuido a la aparición de brotes epidémicos³³. La eliminación de las infecciones concomitantes, es una buena medida de protección contra la giardiasis. *Helicobacter pylori*, por ejemplo, causa hipoclorhidria, lo cual favorece el proceso infectivo de *G. intestinalis*. Su erradicación sería una medida preventiva de la reinfección por *G. intestinalis* sobre todo en áreas endémicas¹⁰.

La creación de vacunas para prevenir la infección sería un avance significativo³⁴. Se descubrió que el parásito es capaz de alterar su aspecto a nivel molecular, cambiando su antígeno de superficie entre una variedad de 200 diferentes para evadir la respuesta inmune. Los resultados de este estudio relacionan por primera vez el ARN con el mecanismo de silenciamiento de genes en microorganismos patógenos. A partir de parásitos modificados genéticamente para expresar todas esas moléculas, se abrieron las puertas para el diseño de una vacuna efectiva que puede ayudar al sistema inmune a identificar cualquiera de esos antígenos y de ese modo habilitarlo para que ataque a los parásitos que intenten hospedarse en el intestino superior.

5. Patogenia en giardiasis

Una de las manifestaciones más graves de la giardiasis es la malabsorción de nutrientes. Aunque antiguamente se pensaba que este fenómeno era debido simplemente a la barrera física ejercida por los trofozoítos sobre la superficie de la mucosa intestinal, muchos estudios sugieren otros posibles mecanismos por los que el parásito induciría cambios estructurales y funcionales en el epitelio intestinal. Diversas investigaciones llevadas a cabo en países en vías de desarrollo, donde la infección tiene alta prevalencia, apoyan la hipótesis del compromiso nutricional tras la infección por *Giardia lamblia*. La malnutrición generada por el parásito da lugar a déficit de proteínas, esto altera el sistema inmune del hospedador, el cual no funciona correctamente frente a la infección, produciéndose aumento del infiltrado linfocitario de células T y B. Además se ha visto alteración del borde en cepillo, disminución de las enzimas del intestino delgado y presencia de criptas hipertróficas. Otros autores asocian el aplanamiento del borde en cepillo de la mucosa intestinal al daño directo del parásito. Como resultado, se altera el complejo enzimático lo cual repercute en la absorción y estado nutricional del hospedador. También en modelos animales existe evidencia de que la desnutrición se agrava en presencia de *Giardia*³⁵. En los países en vías de desarrollo, cuya población suele tener un estado nutricional comprometido, este se ve empeorado por la infección lo que conlleva a un gran peligro para su salud.

En niños es especialmente importante ya que las diarreas y la malabsorción de nutrientes son responsables de anemia (déficit en la absorción de vitamina B12 y Fe,) ^{35-42,43}, retraso en el crecimiento (déficit

en la absorción de proteínas, glúcidos y lípidos)⁴⁴⁻⁴⁷ y retraso cognitivo (déficit de zinc y otros nutrientes)⁴⁴. También se ha observado déficit de vitamina A y malabsorción de grasa⁴⁸. Aunque se ha estudiado ampliamente el efecto de la infección por *Giardia* sobre la absorción de nutrientes, hay muy pocos trabajos realizados sobre la absorción de fármacos en individuos que presentan dicha patología.

Se han empleado diferentes modelos para investigar el daño que causa el parásito en el epitelio intestinal tales como modelos de infección en roedores⁴⁸⁻⁵³, cultivos celulares no humanos y humanos⁵⁴⁻⁵⁹ y biopsias humanas^{58,60,61}.

Una de las hipótesis atribuye a *G. intestinalis* lesiones de la mucosa intestinal, alteraciones en la conjugación de sales biliares con cambios de la microflora intestinal y alteraciones del complejo enzimático. Las lesiones del borde en cepillo ocurren principalmente en el duodeno y llevan a la disminución de la actividad de las disacaridasas (lactasa, sacarasa y maltasa). Cuando la disminución enzimática es importante produce cuadros de diarrea y alteraciones morfológicas mayores. Estudios cinéticos en animales muestran que los trofozoítos de *Giardia lamblia* interfieren en los mecanismos de transporte activo de la mucosa, en áreas del intestino aún con morfología normal⁶².

Sin embargo, en estudios *in vitro* como el realizado por M.A Human y col. (2011)²⁷, se observó la alteración estructural y funcional del borde en cepillo a las 24 horas de cultivar *G. intestinalis* en Caco-2/TC7, lo que apoya la teoría de que este parásito podría segregar sustancias dañinas durante la adhesión. Entre las posibles sustancias

que parecen estar implicadas en la infección por *G. lamblia*, se encuentran diversos factores secretados por el parásito como enterotoxinas, proteinasas y lectinas. Algunos estudios indican que las lectinas, presentes en la superficie de *G. intestinalis*, podrían ser útiles para el acoplamiento del parásito a las células hospedadoras durante la infección^{63,64}. Además, parece que el contacto entre el trofozoíto y las células intestinales provoca la liberación de proteasas⁶⁵ y enzimas metabólicas, que facilitarían la colonización del intestino⁶⁶.

La alteración del epitelio parece independiente de la gravedad de las manifestaciones clínicas, ya que se ha observado que tanto pacientes sintomáticos como asintomáticos mostraban similar grado de deterioro de las microvellosidades⁶⁷. En este estudio se vio aumentada la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), por lo que no hubo evidencia de daño estructural o funcional. Sin embargo, en la mayoría de los ensayos esta medida se ve disminuida, debido a la reorganización del citoesqueleto inducida por *G. intestinalis*⁶⁸, existiendo como consecuencia un aumento de la permeabilidad.

Parece que *Giardia*, al igual que otros parásitos, también induce cambios a nivel de citoesqueleto por la reordenación de F-actina y α -actinina⁵⁹. El citoesqueleto tiene como función ser soporte estructural y mantener la polarización de la membrana, por lo que juega un papel importante en la regulación de la absorción de nutrientes al interior de la célula y controla la permeabilidad transcelular parcial^{69,70}. Diversos autores sostienen que el daño en el citoesqueleto está directamente relacionado con la adhesión del parásito a las células del hospedador²⁷, mientras que otros observan reordenamiento de F-actina

incluso en ausencia del trofozoíto, incubando las células únicamente con sobrenadante obtenido tras sonicación del parásito⁵⁹.

Se cree que la mayor parte de los desórdenes funcionales que provoca *G. lamblia* en el epitelio del intestino delgado son debidos a la interacción ligando-receptor entre el disco ventral o suctorio del parásito y el borde en cepillo del enterocito del huésped^{71,72} lo cual causa acortamiento de las microvellosidades y deterioro de la función de barrera epitelial^{13,14,73-75}. El mantenimiento de la arquitectura del disco ventral parece ser indispensable para que se lleve a cabo la unión del parásito a la célula. Se conoce la existencia de 3 clases de proteínas principales en el disco ventral las cuales podrían estar implicadas en la unión de los trofozoítos al epitelio humano: α -, β - y γ -giardinas⁷⁶, y posteriormente se descubrió una cuarta, la δ -giardina. Diversos estudios han demostrado que la unión de anticuerpos (Ac) anti- δ -giardina al disco ventral, afecta a la capacidad del trofozoíto para unirse a la célula, pero el mecanismo que lo produce es desconocido^{77,78}. Este puede ser una interesante diana terapéutica ya que están apareciendo resistencias a los fármacos convencionales.

Los últimos hallazgos muestran la existencia de balsas lipídicas en *G. intestinalis*, las cuales pueden estar implicadas en la adhesión celular del parásito al epitelio intestinal^{27,79}.

La pérdida de las células de borde en cepillo es motivo actual de debate, debido a que es un signo común tanto en giardiasis como en diversas enteritis bacterianas^{80,81}, celiaquía⁸², enfermedad de Crohn⁸³, alergias alimentarias⁸⁴ y enfermedad inflamatoria intestinal⁸⁵. El hecho de que en algunas de estas enfermedades no exista

colonización microbiana, sugiere que el sistema inmune del hospedador puede estar implicado en la patogénesis⁸⁶. En este sentido, los linfocitos T parecen tener un doble papel, por un lado serían los responsables de la atrofia de las microvellosidades en algunas enfermedades⁸⁷⁻⁹⁰ y por otra parte se les atribuye una función protectora en otras como en la giardiasis^{91,92}. Se han visto diversos factores que influyen en la eliminación del parásito como IgA, NO (óxido nítrico), defensinas y mastocitos⁹³⁻⁹⁵.

En algunos estudios se ha observado que las células intestinales infectadas por *Giardia* muestran un perfil particular de citoquinas, implicadas en el reclutamiento de células dendríticas, lo cual puede interferir con la inmunidad innata del hospedador permitiendo al parásito controlar la respuesta inmune de éste^{96,97}. Este control se lleva a cabo gracias a la enzima arginina deiminasa presente en *G. intestinalis* que reduce la formación de arginina. La arginina es necesaria tanto para la formación de NO, como para el correcto desarrollo de la respuesta inmune⁹⁸. Se demostró que la falta de arginina inhibe la función de los linfocitos T13 así como afecta a la diana de Rapamicina en células de mamífero, o mTOR^{99,100}, la cual regula la formación de células dendríticas. La carencia de arginina también hace disminuir los niveles de NO, facilitando la infección. *G. intestinalis* presenta proteínas variables de superficie (VSP)^{101,102} gracias a las cuales puede evadir la respuesta inmune del huésped e infectar con más facilidad.

G. intestinalis es un parásito microaerobio, por lo que la presencia de oxígeno compromete su supervivencia. Este tipo de organismos presentan una serie de enzimas que actúan sin liberar O₂

como producto final. Este es el caso de la superóxido reductasa (SOR)^{103,104}. Por otro lado, la reducción de oxígeno molecular da lugar a especies de oxígeno reactivas (ROS). Estas especies son citotóxicas y pueden dañar a una serie de biomoléculas con funciones clave para el organismo. Para contrarrestar el daño oxidativo, todo ser vivo ha desarrollado sistemas enzimáticos específicos.

Una de las ROS más estudiadas es el anión O_2^- , es una especie muy reactiva producida por la reducción de un electrón de la molécula de O_2 . En muchos microorganismos, este radical es convertido en H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El peróxido producido es eliminado por la catalasa, generando oxígeno y agua. Sin embargo, el genoma de *G. intestinalis*¹⁰³ confirma que carece de estas enzimas responsables de la eliminación de las especies reactivas de oxígeno: SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (GPX), lo que explicaría la alta vulnerabilidad del parásito al daño oxidativo.

A pesar de su susceptibilidad al O_2 , *Giardia* coloniza un tramo del intestino delgado rico en oxígeno (duodeno), por lo que debe utilizar otras vías para controlar el oxígeno y lograr sobrevivir en el lugar de infección. *Giardia* cuenta con flavoenzimas (NADH oxidasa), flavoproteínas y flavohemoglobinas¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ para realizar la detoxificación de O_2 y NO, respectivamente. En un estudio reciente en el que se midieron las enzimas de oxidación en eritrocitos de un grupo de niños de Guatemala, se relacionó la intensidad de la enfermedad con indicadores de oxidación sistémica¹⁰⁸. En un grupo de niños con giardiasis crónica, se vio una menor expresión de la SOD con respecto al grupo control de niños sanos¹⁰⁹.

Estos hallazgos, sugieren que los microorganismos podrían modular la respuesta del hospedador para lograr la infección mediante la modificación de la expresión de proteínas. De hecho, se ha descrito que las infecciones parasitarias suelen ir asociadas a la modificación de la expresión de enzimas implicadas en la reparación del ADN, tales como la Oxoguanina DNA glicosilasa 1 (OGG-1), que además de su acción de reparación también juega un papel importante como modulador del sistema inmune¹¹⁰; la Poli ADP ribosa polimerasa (PARP1), que está activada en la infección por *H. pylori* y *Salmonella*^{111,112} y que también juega un papel importante en la respuesta inflamatoria durante la infección, asociándose al reclutamiento de células inmunes; o la enzima recombinasa RAD51 implicada en la reparación de la doble hélice¹¹³.

Además de los cambios descritos a nivel de la mucosa y de la expresión de proteínas, la infección por *Giardia* se puede asociar a cambios en la permeabilidad celular. Se ha estudiado la existencia de proteínas periféricas de membrana ZO-1, las cuales actúan como unión entre el citoesqueleto y las uniones estrechas u ocluyentes (ZO)^{114,115} y que algunos microorganismos, como *Vibrio cholerae* aumentan la permeabilidad celular por la secreción de una toxina específica para ZO-1¹¹⁶. Las TJs (tight junctions) o uniones estrechas que forman parte del complejo de unión de las células epiteliales, actúan como una barrera semipermeable de difusión entre las células y también constituyen el límite entre el dominio apical y basolateral. Además, ayudan a mantener la polaridad celular. En diversos estudios se ha puesto de manifiesto que algunos tipos de enterobacterias utilizan estas uniones para la colonización del intestino¹¹⁷⁻¹¹⁹. Además, otros ensayos muestran que los cambios en las proteínas asociadas a TJs y la disminución del TEER

dependen directamente de la adhesión de los microorganismos, apoyando la teoría de que las proteínas ZO (Zónula Ocluyente) asociadas a las TJs están conectadas con la F-actina del citoesqueleto^{120,121}. Las claudinas, que se localizan en la membrana celular junto a las ocludinas, forman el esqueleto de las proteínas presentes en las TJs^{122,123}. En el estudio de Troeger y col.¹²⁴ se observa una disminución de claudinas, en pacientes con giardiasis crónica, dependiente de la adhesión. Otros estudios como Muza-Moons y col.¹²⁵ y M.A Humen y col.²⁷ apoyan este hallazgo. Sin embargo no se observó modificación de las ocludinas por medio de la adhesión y sí dependiente de la reordenación del citoesqueleto²⁷. Se cree que esta alteración puede provocar formación de agrosomas, aunque no está del todo claro^{126,127}.

Otra hipótesis defendida por algunos autores es que el aumento de la permeabilidad se debe a que *Giardia* es capaz de inducir apoptosis de las células intestinales. Chin y col.⁶⁸ observaron que *G. intestinalis* inducía apoptosis en células epiteliales del intestino delgado de forma cepa-dependiente y que esto estaba mediado por la enzima caspasa-3. Se sabe que la muerte celular programada contribuye al proceso de inflamación¹²⁸, por lo que el efecto apoptótico de *Giardia* podría explicar los casos de inflamación en tejidos colonizados por este parásito.

La falta de uniformidad en los hallazgos puede ser debida a la diferencia entre sistemas biológicos y el protocolo experimental utilizado¹²⁹. Es por ello que surge la necesidad de obtener un modelo fiable que permita determinar el efecto de esta parasitosis en la

absorción de nutrientes y de fármacos, sobre todo de aquellos con estrecho margen terapéutico.

6. Diagnóstico

Para el diagnóstico de la giardiasis se realiza en primer lugar la anamnesis procurando encontrar síntomas característicos. Esto no sería útil para el paciente asintomático. Para los pacientes que no presentan síntomas, el diagnóstico se realiza mediante la identificación del parásito en heces. El examen coproparasitológico, sin embargo, es un test con muchos resultados falso-negativos, ya que en los cuadros agudos, los síntomas se presentan antes del inicio de la excreción de los quistes. En el caso del síndrome de malabsorción, la biopsia de la mucosa intestinal es de gran valor. También se pueden realizar inmunolectroforesis y ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Giardia*².

Por otro lado las inmunoglobulinas pueden darnos pistas del estado de la infección. Las IgM son específicas de infecciones agudas, con especificidad del 100% y sensibilidad del 98%¹⁰. La presencia de IgG sérica puede ser detectada semanas o meses después de la infección.

El diagnóstico confirmatorio se puede realizar mediante Inmunofluorescencia directa (IFD) que permite identificar con facilidad quistes en heces. En aquellos casos en que no se estén excretando quistes se suele recurrir a una biopsia intestinal o a un enterotest¹³⁰.

7. Tratamiento de la giardiasis

A pesar de conocerse que *G. lamblia* es responsable de infecciones clínicas desde hace más de 40 años, se han realizado pocos estudios sobre el tratamiento de esta infección. Además, los fármacos que están disponibles pueden tener efectos adversos o estar contraindicados en determinadas situaciones clínicas¹³¹.

Es difícil comparar estudios cuando se evalúa la eficacia clínica de los fármacos usados en el tratamiento de la infección por *G. lamblia*, debido a las diferencias en la metodología seguida en las diferentes investigaciones. Hasta el momento, no se cuenta con un fármaco ideal con el que se logre un alto porcentaje de curación con pocos o ningún efecto indeseable¹³¹⁻¹³³.

Históricamente esta parasitosis fue tratada con mercuriales, productos arsenicales y bismuto. Sin embargo, la introducción de la **Quinacrina** en la década de los 30 como agente antimalárico, y su uso más tarde como medicamento anti-giardiasis con eficacia superior al 90%, constituyó un paso importante en el avance de la terapéutica. Independientemente de la eficacia demostrada, este fármaco presenta varios efectos adversos entre los que se incluyen náuseas, vómitos, coloración amarilla-naranja de la piel, esclera y orina, cefalea y malestar general. Por esta razón, su empleo ha caído en desuso¹³¹⁻¹³³.

Los **5-nitroimidazoles** constituyen la familia de fármacos más usados para el tratamiento de la infección por este parásito, debido a las elevadas tasas de curación informadas, el bajo costo y la facilidad con la que se pueden adquirir. Este grupo incluye al Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol y Secnidazol. La introducción de este grupo de medicamentos

se produjo en el año 1955 y en el año 1962 se informó de su efectividad como compuestos anti-giardíacos.

Dentro de este grupo, el Metronidazol [1-(-hidroxi-etil)-2-metil-5-nitroimidazol] ha sido el más estudiado y su tasa de curación oscila entre 60 y 100%^{131,134-137}, siendo el fármaco de elección para el tratamiento de la giardiasis. El mecanismo de la eliminación de *Giardia* por el Metronidazol ha sido estudiado a fondo. Este utiliza las vías metabólicas anaeróbicas presentes en *Giardia*. El fármaco entra en el trofozoíto y una vez que está dentro de la célula, las proteínas de transporte de electrones desde el parásito (ferredoxinas) donan electrones al grupo nitro del fármaco. Este se "activa" por la reducción del grupo nitro y se establece un gradiente que favorece el transporte intracelular del Metronidazol. Como consecuencia, produce daño al ADN el cual sufre pérdida de la estructura helicoidal, deterioro de sus funciones y posterior muerte del trofozoíto.

Además de este efecto, el Metronidazol inhibe la respiración del trofozoíto. La reducción también puede dar lugar a los radicales tóxicos, que reaccionan con componentes celulares esenciales. Dentro de los quistes, los trofozoítos se ven menos afectados por los nitroimidazoles, posiblemente debido a la escasa penetración del fármaco a través de la pared quística^{131,133,138}.

La dosis recomendada es de 250 mg cada 8 horas en adultos y 15 mg por kilogramo de peso corporal distribuidos cada 8 horas en niños, en ambos casos el tratamiento debe cumplirse durante 5-7 días¹³⁸. Se ha informado de fallos terapéuticos a causa de la aparición de resistencias y de la dificultad de dosificar correctamente en niños (que

son los más afectados por esta patología) debido al mal sabor del principio activo^{139,140}. También por la presencia de efectos adversos, entre los que destacan: cefalea, sabor metálico, oscurecimiento de orina, vértigo y náuseas. Con menor frecuencia se ha descrito la aparición de pancreatitis, toxicidad en el Sistema Nervioso Central, neutropenia reversible y neuropatía periférica. No se recomienda el uso de este medicamento en el primer trimestre del embarazo por su potencial teratogénico *in vitro* y en animales experimentales¹³⁸.

Además, en ocasiones, se administra sin que el diagnóstico sea positivo, ante una mínima sospecha. Esto supone un riesgo, pues presenta una biodisponibilidad del 100% lo que se traduce en una buena absorción, pudiendo provocar efectos adversos en un paciente sano. También debido a su elevada biodisponibilidad, se va absorbiendo a lo largo del aparato digestivo, por lo que no llegará la totalidad de la dosis al lugar de acción. Así, la dosis inicial que se debe administrar para alcanzar valores adecuados a nivel intestinal es elevada, y produce efectos secundarios por su absorción en lugares indeseados. A causa de estos inconvenientes surge la importancia de buscar una nueva formulación, que permita que el fármaco se libere únicamente en contacto con el parásito.

Secnidazol y Tinidazol son otros 5-nitroimidazoles utilizados con menos frecuencia en infecciones por *Giardia*. Respecto al Tinidazol, se administra una única dosis de 2 gramos en adultos, siendo un medicamento *off-label* en el caso de la población infantil (50-60 mg/kg en dosis única, máximo 2 gramos). Si la duración es superior a 7 días se aconseja observación clínica y monitorización analítica (control

hematológico) y vigilar la posible aparición de trastornos neurológicos como: mareos, vértigo, incoordinación y ataxia. Puede originar cuadros de sobreinfección (por *Candida*, colitis pseudomembranosa) en tratamientos prolongados. Aunque no hay datos de efectos adversos específicos en niños, en adultos se describen reacciones a nivel gastrointestinal, hematológico, cutáneo y del Sistema Nervioso. El Secnidazol, debido a su absorción lenta, puede permanecer más tiempo en la luz intestinal y realizar su acción *in situ* frente a parásitos intestinales¹⁴¹. Entre las contraindicaciones se encuentra la administración en niños menores de 2 años, siendo este el rango de edad frecuente de la giardiasis. Además, no se encuentra comercializado en España.

Los efectos adversos y los fracasos de algunos tratamientos recomendados actualmente han dado lugar a la necesidad de buscar agentes anti-giardíasicos alternativos. Uno de ellos es el **Albendazol**, un benzimidazol que se utiliza como fármaco de elección en tratamiento de neurocisticercosis e hidatidosis tisulares. Es una nueva propuesta para el tratamiento de la giardiasis, y existen estudios que han demostrado buenos resultados tanto *in vitro* como a nivel clínico¹³⁸. Los benzimidazoles ejercen su efecto tóxico sobre *Giardia*, en parte, por la unión a su citoesqueleto de tubulina¹⁴². Esta unión provoca la inhibición de la polimerización del citoesqueleto y la disminución de la captación de glucosa¹³⁸. Para tratar la giardiasis se administran 400 mg una vez al día durante 5 días¹⁴³. Sin embargo, además de su elevado precio, también cuenta con efectos adversos relevantes en clínica y frecuentes en la población infantil como: trastornos del sistema nervioso, hepatobiliares, gastrointestinales, y cutáneos, los cuales se detallan en la tabla 3.1. Su uso

puede causar anorexia a corto plazo, lo que complicaría aún más la malnutrición asociada a la giardiasis. La alopecia también puede ser un factor que provoque rechazo en el paciente. Albendazol está contraindicado en el embarazo, debido a posibles efectos teratogénicos^{131,143} y no está recomendado en niños menores de 6 años.

Los fármacos más utilizados para tratar la giardiasis, así como las dosis habituales y otras características de interés se describen en la tabla 3.1.

Una vez concluido el tratamiento se recomienda la realización de exámenes de heces a los 7, 14 y 21 días siguientes. Además de repetir el tratamiento después de 2 o 3 semanas.

Introducción

Medicamento	Dosis	Efectos adversos	Comentarios
Metronidazol	15 -20mg/kg/día en 2 a 3 dosis durante 5-7 días	Nauseas, vómitos dolor abdominal, sabor metálico, neuropatía periférica, neutropenia reversible, reacción disulfiran-like.	Eficacia 80 a 95%. 10% de cepas resistentes.
Nitazoxanida	Bebés 100 mg, 4-11 años 200 mg ambos via oral cada 12 h/3 a 5 días	Escasos.	FDA, 2002. Eficacia en el tratamiento 76-80%. Precio elevado.
Tinidazol	60 mg/kg dosis única	-Gastrointestinales (náuseas, vómitos, anorexia, diarrea, sabor metálico). -Piel y del tejido subcutáneo (hipersensibilidad, prurito, urticaria y edema angioneurótico). -Sistema Nervioso (cefalea, neuropatía periférica, mareo, ataxia, crisis comiciales). -Sangre (Leucopenia transitoria, trombocitopenia, pancitopenia). -Otros (Lengua saburral, orina oscura, tromboflebitis).	Eficacia en 85 a 92%.
Secnidazol	40 a 50 mg/kg dosis única, máximo 1,5 g	-Digestivos como náuseas, gastralgia, alteración del gusto (metálico), glositis y estomatitis. -Erupciones cutáneas, leucopenia moderada (reversible después de la suspensión del tratamiento), vértigo, parestesia, incoordinación, ataxia y polineuritis sensitiva y motora.	Eficacia de 92 a 95%.
Furazolidona	5 a 8 mg/kg/día en 4 dosis durante 7-10 días	Disulfiran-like, hemólisis en casos de déficit de G6PDH.	Eficacia del 80%.
Quinacrina	6 a 7 mg/kg/día en 3 dosis por 5 días	Ictericia, sabor amargo, alteraciones neuropsiquiátricas, convulsiones.	Eficacia de 88 a 92%.
Albendazol	200 a 400 mg dosis única	-Sistema Nervioso (cefalea y vértigo). -Gastrointestinales tto. a corto plazo (dolor abdominal, náuseas, vómitos, anorexia y estreñimiento). -Hepatobiliares. -Piel (alopecia reversible). -Generales: fiebre.	Eficacia 24-81% Precio elevado.

Tabla 3.1. Pautas de tratamiento y efectos secundarios más frecuentes en giardiasis.

B. Absorción intestinal

La vía prioritaria de administración de medicamentos es la oral. A lo largo del tracto gastrointestinal se lleva a cabo la absorción de nutrientes, xenobióticos y fármacos administrados por esta vía. Conocer la fisiología del aparato digestivo y estudiar los mecanismos implicados en la absorción oral de fármacos, permite determinar el comportamiento de los medicamentos y diseñar formas farmacéuticas que doten al fármaco de una buena biodisponibilidad.

1. Sitio de absorción

El tracto gastrointestinal se compone de seis partes bien diferenciadas: boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso. La absorción se puede producir en cualquiera de los tramos, pero se realiza principalmente en el intestino delgado que es el tramo especializado en esta función. Este posee diversas estructuras morfológicas dirigidas a aumentar su superficie, y por tanto, su capacidad de absorción mediante difusión pasiva.

A partir de la estructura cilíndrica fundamental se desarrollan una serie de modificaciones^{144,145}. El epitelio intestinal está formado por pliegues circulares o válvulas de *Kerckring* y vellosidades intestinales o *villi*, compuestas de enterocitos y células mucosas. Los enterocitos tienen una estructura de borde en cepillo que presenta microvellosidades (figura 3.1)

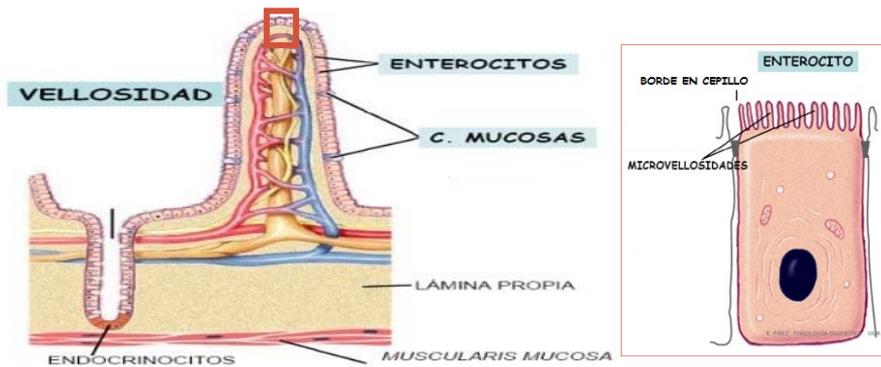


Figura 3.1. Estructura de las vellosidades y microvellosidades. Figura modificada del trabajo de Ximena Paez¹⁴⁶.

Para posibilitar el paso de sustancias a través de la membrana epitelial, existen numerosas proteínas transportadoras que son indispensables para la incorporación de nutrientes y el mantenimiento de la homeostasis. En el intestino delgado pueden tener lugar todos los mecanismos fisiológicos de transporte existentes, los cuales se explican a continuación.

2. Mecanismos de absorción

Los mecanismos de absorción a través de la membrana celular del epitelio intestinal son básicamente de dos tipos: difusión pasiva y mecanismos especializados de transporte, entre los que se distingue transporte activo y transporte facilitado. La absorción de sustancias puede llevarse a cabo por uno o más de los mecanismos mencionados anteriormente. Los tipos de mecanismo de transporte a través de la membrana se representan en la figura 3.2.

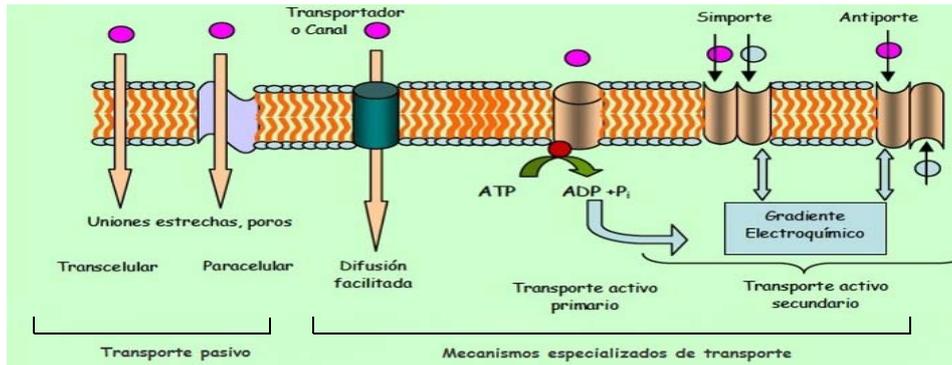


Figura 3.2. Mecanismos biológicos de transporte, modificada de Oltra-Noguera D.¹⁴⁷.

2.1. Difusión pasiva

El proceso de difusión pasiva es el mecanismo predominante en la absorción de sustancias en el organismo. En este tipo de transporte las moléculas de soluto no establecen interacciones específicas con los componentes de la membrana, sino que se disuelven en la bicapa lipídica y difunden en el interior de esta de forma independiente. El transporte se realiza siempre a favor de gradiente de concentración y sin consumo de energía¹⁴⁸. Es un proceso complejo en el que intervienen tanto factores extracelulares (zona luminal) como intracelulares o tisulares (zona basolateral), además de las características de la membrana lipóidea fundamental, situada en el borde superior de las células columnares y alineada paralelamente con la superficie de las microvellosidades¹⁴⁹. Este mecanismo de absorción también depende de las propiedades fisicoquímicas del soluto, especialmente del grado de ionización y de la lipofilia ya que, en general, sólo se absorbe la fracción no ionizada de la molécula¹⁵⁰. La velocidad de absorción por esta vía la determina la Ley de Fick.

El transporte pasivo engloba dos tipos principales de procesos o rutas:

Ruta paracelular

La entrada de xenobióticos ocurre a través de los espacios intercelulares y/o poros acuosos de la membrana. Los poros acuosos se caracterizan por presentar carga eléctrica y poseer un diámetro reducido, lo cual permite la absorción de moléculas o iones de peso molecular inferior a 200-250 Daltons e hidrofilia elevada, en función de la estereoquímica del compuesto^{151,152}.

Ruta transcelular

La ruta transcelular es la vía mayoritaria de absorción de sustancias en el organismo. Consiste en el desplazamiento de las moléculas desde la zona donde se encuentran más concentradas hasta aquella donde la concentración es menor, hasta que se equilibra a ambos lados de la bicapa. Este mecanismo de absorción depende de las propiedades fisicoquímicas del compuesto, sobre todo del grado de ionización y de la lipofilia, ya que en general sólo se absorbe la fracción no ionizada de la molécula, que es más lipófila.

La ruta global de difusión que debe seguir el xenobiótico para alcanzar el plasma puede dividirse en tres zonas:

Interfase lumen-membrana (zona luminal o apical)

Está constituida por tres zonas continuas de distinta naturaleza fisicoquímica. En la figura 3.3 se esquematiza su disposición:

Introducción

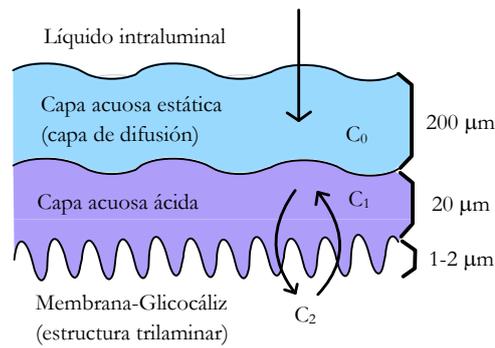


Figura 3.3. Disposición de la interfase lumen-membrana, tomado de González Álvarez, I.¹⁵³.

En contacto con la membrana se encuentra una *capa acuosa ácida* o *microclima* cuyo pH es algo más ácido que el líquido intraluminal, ya que presenta valores entre 5,3 y 6,1¹⁵⁴. Esta capa está poco estudiada, su espesor parece ser del orden de 20 µm y no se ha demostrado que interfiera en el proceso de absorción salvo en casos excepcionales.

En contacto directo con el fluido luminal se encuentra la *capa acuosa estática de difusión* o *capa límite*, que posee un espesor de unos 200 µm. La composición de esta capa y la del fluido luminal es la misma, sin embargo, las moléculas de agua en la capa de difusión generan una resistencia a la penetración de solutos. Esta resistencia es el factor limitativo para la absorción de sustancias de marcado carácter lipófilo. La capa acuosa estática es sensible al arrastre y puede eliminarse parcial o totalmente por agitación, lavado energético del intestino y en presencia de tensoactivos sintéticos^{155,156}. Adyacente a la capa de difusión se encuentra una capa mucosa que contiene más del 90% de agua y entre 0,5 y 5% de mucina¹⁵⁷.

La tercera zona es el lumen intestinal constituido por el *líquido intraluminal*. El pH de este líquido no es homogéneo a lo largo de todo el intestino. De hecho, en el hombre, entre la zona próxima al estómago y el tramo final del intestino el pH oscila entre 6 y 8, respectivamente¹⁵⁸.

Membrana lipoidea

Es una membrana con características diferenciales del resto de membranas celulares. Muestra una estructura trilaminar tras la observación al microscopio. En 1972, Singer y Nicholson explican la mayor parte de las propiedades físicas y termodinámicas de la membrana. Por su configuración dinámica, este modelo recibe el nombre de "Mosaico Fluido", en el que los componentes integrales hidrófobos, como los lípidos y las proteínas de membrana están limitadas en el plano de la membrana, pero son libres de difundir lateralmente. Presenta una bicapa lipídica formada por dos capas fosfolipídicas cuyas cadenas hidrocarbonadas se unen entre sí por fuerzas de Van der Waals, de forma que los grupos polares se orientan hacia el exterior y los apolares formarían la parte interna de la bicapa. Además, existen proteínas globulares que recubren algunas zonas o se interponen entre los lípidos¹⁵⁹. En 1975, P.T. Unwin y Gert Henderson, añaden que las proteínas de la membrana son glucoproteínas las cuales forman masas flotantes en la bicapa lipídica. Se clasifican en dos grupos: las integrales que atraviesan la membrana y las periféricas que están situadas en la superficie de la membrana, no penetran en ella y están adheridas a los lípidos o a otras proteínas. Por último, en 1997, Simons e Ikonen, describen tres tipos de movimiento en la bicapa lipídica: rotación a lo

largo de su eje, difusión lateral (intercambio de lugares) y difusión transversal o “flip-flop” desde una monocapa a otra¹⁶⁰.

Gracias a todos sus componentes, presenta función de “contenedor” para el citosol y los distintos compartimientos internos de las células, así como les otorga protección mecánica¹⁶¹. Se compone principalmente por fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina), colesterol, glúcidos y proteínas (integrales y periféricas). Todas estas estructuras se muestran en la figura 3. 4.

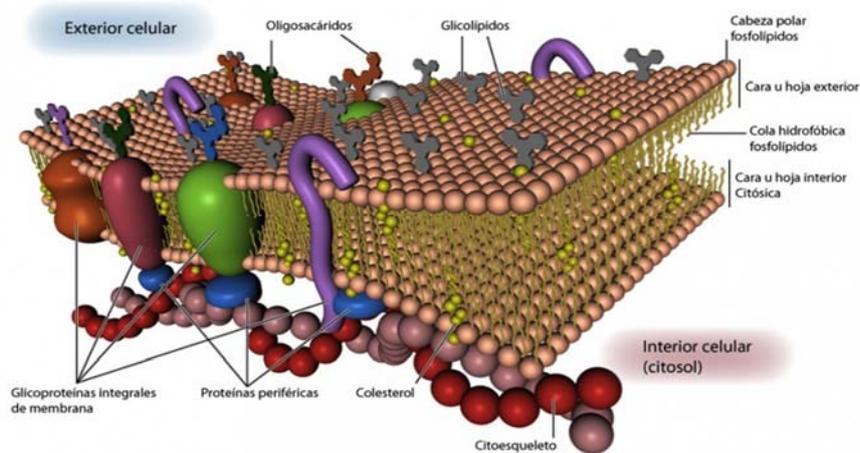


Figura 3.4. Membrana lipóidea, tomado de Wikillerato ¹⁶².

Las principales características de esta membrana son su espesor, una micra superior al resto de membranas biológicas¹⁶³, y su composición química, ya que posee un elevado contenido de proteínas, lo que indica la existencia de enzimas y proteínas transportadoras.

La proporción lipídica también es distinta a otras membranas. Presenta proporciones esfingomielina/lecitina del 30% y

colesterol/fosfolípidos del 20%, que son superiores a las del resto. Además se encuentra una elevada proporción de glicolípidos (54%), debido a la existencia del glicocáliz que es rico en mucopolisacáridos¹⁶⁴. Esta elevada proporción de lípidos le confiere una serie de funciones como: la regulación de la localización y actividad de las proteínas de membrana, la actuación como sensores para el control de las condiciones fisiológicas y la participación en la transducción como mensajeros o reguladores. Además, ciertos cambios en su estructura se asocian al desarrollo de diversas patologías¹⁶⁵.

Interfase membrana-plasma (zona basolateral)

Los xenobióticos deben atravesar distintos elementos que componen esta interfase para llegar al plasma sanguíneo. Aunque esta membrana ejerce menor resistencia al paso de solutos que la membrana apical¹⁶⁶, se pueden producir interacciones con enzimas biotransformadoras capaces de modificar o inactivar el soluto. También se localizan transportadores de diferentes características, pero en menor cantidad que en la membrana lipoidea.

Una vez que el soluto atraviesa esta membrana no encuentra gran resistencia para continuar el proceso de difusión, ya que el torrente sanguíneo, compuesto por endotelios capilares altamente porosos, se sitúa próximo.

2.2. Mecanismos especializados de transporte

Este tipo de transporte se caracteriza por el paso de sustancias a través de la membrana gracias a estructuras proteicas. La unión específica de una sustancia a transportar y una proteína provoca

un cambio en la conformación de esta, permitiendo así el paso de soluto de un lado a otro de la membrana.

Existen dos tipos de proteínas transportadoras: las proteínas canales, que una vez abiertas forman pequeños poros a través de los cuales los iones de tamaño y carga apropiada pueden cruzar la membrana por difusión libre; y las proteínas *carriers* o acarreadoras, que se unen a moléculas específicas y sufren cambios conformacionales abriendo canales a través de los cuales las moléculas que van a ser transportadas pueden pasar y ser liberadas en el otro lado.

Este mecanismo está implicado en la absorción oral y biodisponibilidad de fármacos, así como en la aparición de resistencias^{167,168}. También participa en la excreción de metabolitos en hígado y riñón, interviene en la aparición de toxicidad por algunos fármacos¹⁶⁹ e influye en las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de otros¹⁷⁰⁻¹⁷².

2.2.1. Tipos de transporte especializado

Difusión facilitada

Las moléculas que no pueden cruzar la membrana por difusión simple, pueden hacerlo por la acción de proteínas transmembrana específicas, que actúan como transportadores sin necesidad de aporte de energía¹⁷³. Es un proceso rápido y presenta una considerable especificidad por el sustrato. Las proteínas transportadoras son a menudo inducibles y la velocidad de transporte sigue una cinética de Michaelis-Menten¹⁷⁴. La velocidad de transporte es proporcional al

gradiente de concentración pero nunca puede sobrepasar la velocidad máxima¹⁷⁵.

Los sistemas de cotransporte se pueden clasificar en¹⁷⁴:

-*Simporte*: transporte simultáneo de dos moléculas en la misma dirección.

-*Antiporte*: transporte simultáneo de dos moléculas en direcciones opuestas.

Transporte activo

Consiste en el transporte de un soluto a través de las proteínas de membrana en contra de un gradiente de concentración o electroquímico. Requiere de una fuente de energía para conducir un soluto desde un compartimiento de baja concentración a uno de alta. La unión entre sustrato y transportador es específica y, dado que existe un número determinado de los mismos, el proceso es saturable.

El transporte activo se puede clasificar según la energía necesaria para producirlo y el sentido del transporte:

a) Según el sentido del transporte en el lumen intestinal:

-*Transporte activo de absorción (influx)*: Las proteínas transportan el fármaco a través de la membrana en sentido lumen-sangre.

-*Transporte de secreción (efflux)*: Las proteínas impiden el paso de fármaco a través de la membrana, devolviendo al lumen intestinal las moléculas de fármaco que atraviesan la membrana del enterocito. Como resultado, se absorbe menos sustrato del que se espera.

b) Según la fuente de energía utilizada para producirlo^{176,173}:

-Transporte activo primario (directo): La energía deriva directamente de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP).

-Transporte activo secundario (indirecto): El transportador directo genera un gradiente de concentración que constituye la fuente de energía para el transportador indirecto.

2.2.2. Transportadores

El intestino delgado presenta numerosas estructuras específicas encargadas de facilitar la entrada de solutos al interior celular (figura 3.5)¹⁷⁷. Estas proteínas se pueden encontrar en la membrana luminal y/o basolateral de los enterocitos lo que condiciona que se produzca absorción o secreción de sustratos.

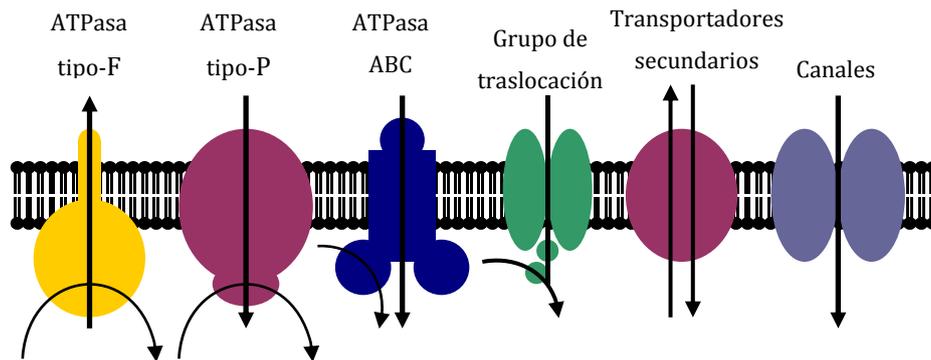


Figura 3.5. Localización de los principales sistemas de transporte del epitelio intestinal, tomado de González-Álvarez, I.¹⁵³.

Inicialmente se estudiaron con detalle los transportadores responsables de la absorción intestinal de sustancias con gran relevancia biológica como aminoácidos, dipéptidos y glucosa. Se demostró su dependencia con la energía y la especificidad para el sustrato, y más tarde surgieron numerosos estudios en los que se puso de manifiesto su

contribución a la absorción de distintas sustancias con actividad terapéutica. En todos ellos se demuestra, por una parte, el carácter no lineal de la cinética de absorción y, por otra, la competencia que provoca la presencia simultánea de sustratos similares desde el punto de vista estructural. Ambas características apuntan hacia el carácter saturable y selectivo de estos fenómenos.

-Papel de los transportadores en la absorción de fármacos

Las proteínas de transporte tienen un papel esencial en las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos. Estas pueden condicionar la absorción oral y, por consiguiente, la biodisponibilidad, así como la generación de resistencias a la acción farmacológica y/o toxicidad¹⁷⁸. Hay identificados distintos transportadores de membrana que actúan en el sentido inverso al fisiológico (basolateral-apical), es decir, generan un flujo de secreción desde el enterocito hacia el lumen intestinal¹⁷⁹ que provoca que se absorba menos fármaco del esperado modificándose su biodisponibilidad.

-Clasificación de los transportadores

Es necesario clasificar los transportadores debido a la importancia que tienen en la entrada de xenobióticos en el organismo y al elevado número de proteínas identificadas. Existen diferentes fuentes monográficas de las que se obtiene información sobre las diferentes clasificaciones establecidas¹⁸⁰. Entre las páginas web más destacadas se encuentra: *Human Gene Nomenclature Committee* (<http://www.genenames.org>) y <http://nutrigene.4t.com/humanacb.htm>¹⁸¹.

Entre las proteínas transmembrana de transporte activo, destaca la llamada superfamilia de transportadores ABC (ATP-binding cassette)¹⁸². Actualmente hay 49 miembros conocidos de la familia de transportadores ABC clasificados en 7 subfamilias. Esta clasificación se puede encontrar en la página web: <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm> (tabla 3.2). Dentro de esta gran superfamilia los transportadores mejor descritos son: la Glicoproteína-P, también llamada MDR1, y la subfamilia de proteínas de resistencia múltiple, MRP.

En la Figura 3.6 se esquematiza la localización de los transportadores mejor estudiados en las membranas de los enterocitos intestinales y el sentido en el que realizan el transporte. Como se observa, la Glicoproteína-P (MDR1) y los transportadores MRP2, MRP4 y BCRP son capaces de realizar un proceso de secreción activa hacia el lumen intestinal y, por tanto, podrían reducir la absorción de xenobióticos.

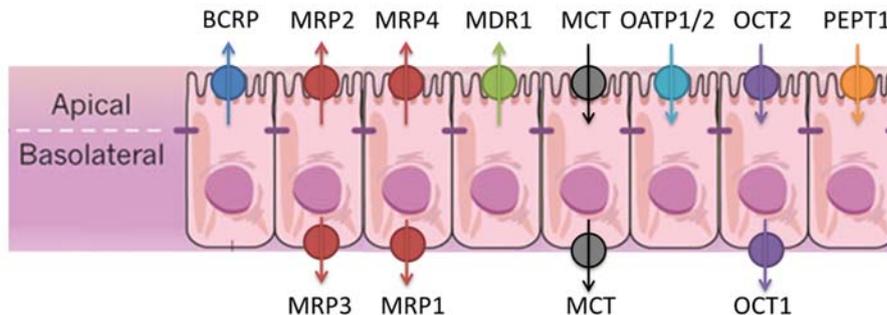


Figura 3.6. Esquema de localización de los transportadores MDR y MRP en la membrana del enterocito, tomado del libro *Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos*¹⁵⁰.

Introducción

En la tabla 3.2 se especifican las diferentes subfamilias en las que se clasifican los transportadores ABC¹⁸³.

ABC1 S familia A	MDR/TAP S familia B	MRP/CFTR S familia C	ALD S familia D	OABP S familia E	GCN ₂₀ S familia F	White S familia G
ABCA1	ABCB1 (MDR1, P-gp)	ABCC1 (MRP1)	ABCD1 (ALDP)	ABCE1 (OABP)	ABCF1	ABCG1
ABCA2	ABCB2 (TAP1)	ABCC2 (MRP2 cMOAT)	ABCD2 (ALDR)		ABCF2	ABCG2 (BCRP)
ABCA3	ABCB3 (TAP2)	ABCC3 (MRP3)	ABCD3		ABCF3	ABCG4
ABCA4	ABCB4 (MDR3)	ABCC4 (MRP4)	ABCD4			ABCG5
ABCA5	ABCB5	ABCC5 (MRP5)				ABCG8
ABCA6	ABCB6	ABCC6 (MRP6)				
ABCA7	ABCB7	ABCC7 (CFRT)				
ABCA8	ABCB8	ABCC8 (SUR1)				
ABCA9	ABCB9	ABCC9 (SUR2)				
ABCA10	ABCB10	ABCC10 (MRP7)				
ABCA12	ABCB11 (BSEP, SPGP)	ABCC11 (MRP8)				
ABCA13		ABCC12 (MRP9)				
		ABCC13				

Tabla 3.2. Clasificación de la familia de transportadores ABC en subfamilias, modificada de Couture, L, et al. ¹⁸³.

En la figura 3.7 se muestra la localización subcelular de la familia MRP. En la célula de la izquierda están representadas las MRPs con tres TMD y en la célula de la derecha las MRPs con dos TMD¹⁸⁴. La presencia de una MRP en ambas ubicaciones (apical y basolateral) indica que la célula presenta diferencias específicas en la distribución subcelular. En el caso de las MRPs 7, 8 y 9 el signo de interrogación indica que se desconoce su localización subcelular exacta¹⁸⁴.

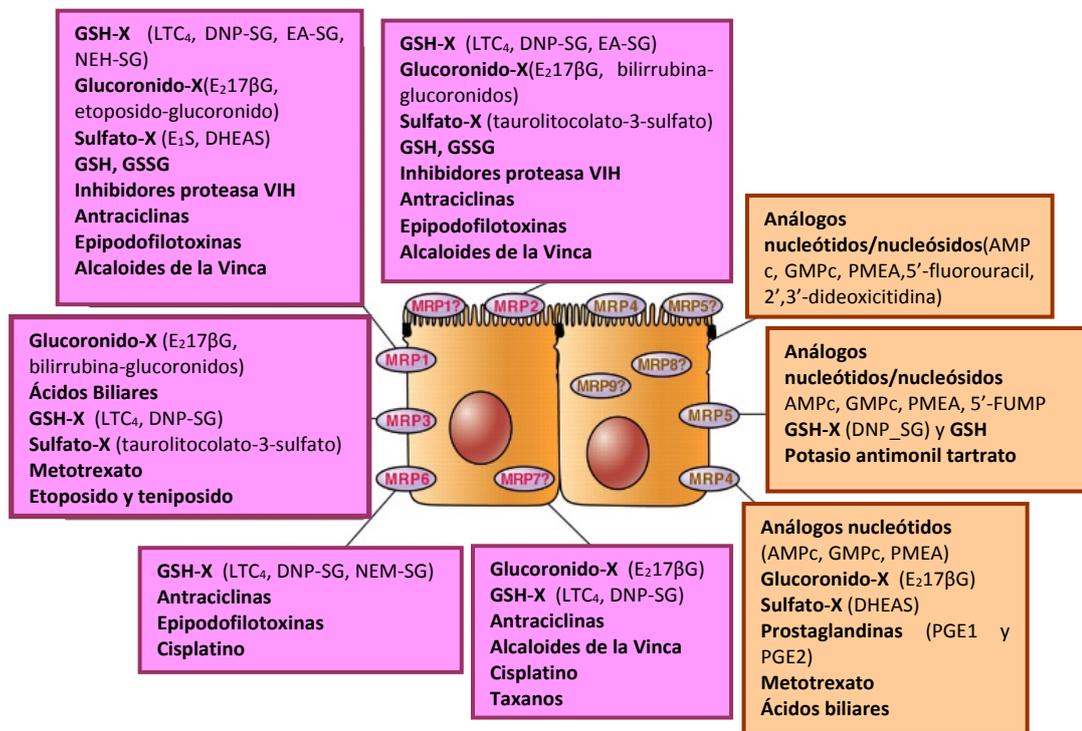


Figura 3.7. Localización subcelular y sustratos específicos de las MRPs, tomada de Deeley, R. G. et al.¹⁸⁴.

En la tabla 3.3 se detalla la nomenclatura y distribuciones de la familia de transportadores MRP:

Familia MRP	Familia ABCC	Otros nombres	Distribución
MRP1	ABCC1	MRP	Pulmón y la mayoría de tejidos
MRP2	ABCC2	cMOAT EBCR	Hígado, intestino delgado y riñón
MRP3	ABCC3	MOAT-D MLP-2	Riñón, intestino delgado, colon, páncreas y vesícula biliar
MRP4	ABCC4	MOAT-B	La mayoría de tejidos
MRP5	ABCC5	MOAT-C	La mayoría de tejidos y cerebro
MRP6	ABCC6	MOAT-E MLP-1 ARA	Riñón e hígado
CFTR	ABCC7		Pulmón, intestino y colangiocitos
SUR1	ABCC8		Páncreas
SUR2	ABCC9		Corazón
MRP7	ABCC10		Colon, piel y testículos
MRP8	ABCC11		Mama y testículos
MRP9	ABCC12		Mama y testículos
MRP10*	ABCC13		Colon, glándulas salivares, médula ósea y en hígado fetal

Tabla 3.3. Nomenclatura y distribución de los transportadores MRP (*nombre no confirmado), modificado de *Human ATP transporters 2002*¹⁸⁵.

3. Métodos de estudio de permeabilidad

Los métodos de estudio de la permeabilidad intestinal se enfocan desde perspectivas distintas, que se combinan para conseguir la máxima información acerca de los transportadores: dónde se expresan, en cuanta proporción lo hacen, cómo actúan, qué fármacos

son sustratos de ellos, etc. En líneas generales se pueden definir dos métodos de estudio: estructurales y funcionales.

3.1. Métodos estructurales

Los métodos estructurales emplean técnicas de biología molecular para la determinación de sistemas secretores.

Uno de estos métodos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un método rápido y sencillo que consiste en la ampliación *in vitro* de secuencias de ADN. Se utiliza una ADN polimerasa termoestable, ADN molde, cebadores, los cuatro desoxinucleótidos trifosfato, un tampón adecuado y sales.

En primer lugar se aplica una temperatura elevada con el objetivo de desnaturalizar el ADN que se disocia en dos cadenas sencillas. Posteriormente se hibridan los cebadores con el ADN de cadena sencilla bajo condiciones que permitan la unión del cebador a los sitios homólogos del molde. Por último, la enzima ADN polimerasa sintetiza el nuevo ADN por medio de la extensión de cebadores en dirección 5'-3'.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se realiza la determinación de los niveles de expresión de ARN mensajero que codifica para la proteína MDR-1. Los cebadores empleados serán específicos para este transportador. Para determinar la cantidad de ARN mensajero del gen presente en cada uno de los tejidos seleccionados se procede al análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

3.2. Métodos funcionales

Como se expuso anteriormente el intestino delgado es el tramo del tracto gastrointestinal especializado en la absorción. Toda sustancia ingerida por vía oral pasa por este tramo intestinal, por lo que se considera órgano diana para los fármacos que entran al organismo.

Existen diferentes métodos de investigación que permiten la realización de estudios fiables de transporte. Cada modelo presenta una serie de ventajas e inconvenientes a tener en cuenta a la hora de elegir cual utilizar en un estudio¹⁸⁶. La búsqueda de un método sencillo, rápido, fiable y económico es uno de los campos activos de la investigación. Las técnicas *in vivo* son las más fiables, ya que reproducen todas las condiciones fisiológicas del organismo, aunque esto precisamente las dota de complejidad, por lo que se requiere mucho tiempo para llevarlas a cabo. Esto restringe su aplicabilidad en las etapas tempranas de desarrollo y lleva asociado problemas éticos del uso de animales en experimentación. En la tabla 3.4 se muestran los diferentes métodos existentes con sus ventajas y limitaciones.

Introducción

Sistema	Método	Ventajas	Limitaciones
<i>In silico</i>	Computador	Posibilidad de cribado previo al experimento. Predicción de la absorción. Rapidez en la obtención de los resultados.	Complejidad de los programas. No es un modelo real.
<i>In vitro</i>	Membranas artificiales	Clasifica los compuestos que se absorben pasivamente. Rapidez en obtención de resultados. Ensayos múltiples.	Dificultad para extrapolar <i>in vivo</i> . Sistema poco caracterizado.
	Fracciones subcelulares	Puede realizarse en tejidos humanos. Compuestos que se absorben por la ruta transcelular.	Dificultad para extrapolar <i>in vivo</i> . Puede dañar las membranas.
	Tejidos aislados	Nivel de complejidad medio-alto.	Puede afectar a la actividad enzimática. Menor rapidez en la obtención de resultados.
	Cultivos celulares	Buena correlación <i>in vitro-in vivo</i> . Rapidez en obtención de resultados. Caracterizar transportadores.	Variabilidad de resultados intra-laboratorio.
<i>In situ</i>	Con recirculación	Aporte sanguíneo y linfático permanece intacto. Buena predicción de k_a pasiva.	Menor precisión de la estimación de compuestos hidrófilos. Menor rapidez en la obtención de resultados.
	Sin recirculación	Aporte sanguíneo y linfático permanece intacto. Buena predicción de K_a pasiva.	Condiciones hidrodinámicas distintas a los ensayos <i>in vivo</i> .
<i>In vivo</i>	Animales	Buena predicción de la k_a pasiva. Reproduce condiciones fisiológicas.	Complejidad. Menor rapidez en la obtención de resultados.
	Humanos	Cuantifica y evalúa los mecanismos de absorción de fármacos. Reproduce condiciones fisiológicas.	Inconvenientes éticos.

Tabla 3.4. Ventajas y limitaciones de los diversos modelos de experimentación, modificada de González-Álvarez, I.¹⁵³.

A continuación se detallan algunos de los métodos experimentales que se utilizan en los estudios de transporte de fármacos¹⁸⁷.

3.2.1. Métodos *in silico*

Los métodos experimentales necesitan que el fármaco esté sintetizado y disponible en ciertas cantidades para efectuar los estudios correspondientes. El cribado inicial se realiza mediante métodos computacionales (*in silico*) que, mediante sistemas informáticos, predicen la absorción intestinal a partir de las estructuras químicas de los compuestos. Estos sistemas se basan en la elaboración de bases de datos que incluyen determinados parámetros estructurales, como solubilidad acuosa, lipofilia o tamaño molecular, que influyen en la absorción de sustancias^{188,189}. Posteriormente, se introducen las estructuras químicas de los fármacos que se desea estudiar para estimar el parámetro de absorción¹⁹⁰.

3.2.2. Métodos *in vitro*

Los estudios *in vitro* se basan en realizar un determinado experimento en un ambiente controlado fuera del organismo vivo. Este tipo de investigación se lleva a cabo en órganos, tejidos, células, componentes celulares, proteínas y/o biomoléculas. Los resultados pueden ser poco exactos pues las condiciones experimentales a veces pueden no corresponder a las condiciones dentro del organismo. Aunque el uso de animales es imprescindible para algunos tipos de experimentación en el área de las ciencias de la salud, la metodología *in*

vitro consigue sustituir eficientemente estos estudios *in vivo*¹⁹¹. El método de cultivos celulares es útil para realizar estudios de absorción y toxicidad de sustancias, pues las líneas celulares son capaces de expresar los transportadores adecuados y mantener funciones celulares similares a las de los enterocitos humanos.

-Membranas artificiales

Los ensayos de permeabilidad en membranas artificiales se conocen con las siglas PAMPA (*parallel artificial membrane permeation assay*)¹⁹². El objetivo de estos estudios es clasificar los compuestos que se absorben de forma pasiva, y dentro de estos aquellos que lo hacen por transporte transcelular¹⁹³. Más adelante se han hecho modificaciones en el método para tener en cuenta la difusión paracelular¹⁹⁴.

El método PAMPA se basa en la utilización de una placa de microvaloración, con insertos de naturaleza hidrofóbica como soporte, y una membrana formada por una mezcla de lípidos y un disolvente orgánico inerte¹⁹⁵. Su principal ventaja es la posibilidad de investigar numerosos compuestos al día ya que se pueden realizar ensayos múltiples. Existen diferentes factores que influyen en el valor de permeabilidad obtenida, como la composición de la solución en los compartimentos dador y receptor, el pH y la temperatura de incubación¹⁹⁶. Sin embargo, el parámetro más estudiado es la composición de lípidos de la membrana¹⁹².

Se han correlacionado los datos obtenidos por este método con datos de permeabilidad en Caco-2 de numerosos compuestos¹⁹⁷, así

como datos de permeabilidad transdérmica^{198,199} y modelos *in situ* de barrera hematoencefálica²⁰⁰.

-Fracciones subcelulares

Este método consiste en la preparación de vesículas de membrana para estudiar los mecanismos de transporte de los compuestos que se absorben a través de la vía transcelular. Existen diferentes tipos de vesículas como, las vesículas de membrana obtenidas del borde en cepillo de los enterocitos ("*Brush Border Membrane Vesicles*", BBMV) o las vesículas de la membrana basolateral de estos ("*Basolateral Membrane Vesicles*, BLMV)^{201,202}. También se han realizado estudios utilizando preparaciones simultáneas de ambas²⁰³.

Las vesículas se obtienen a partir de diversos tejidos. Estos tejidos proceden de especies animales como la rata, el ratón y el cerdo, o con menor frecuencia de seres humanos. Se preparan por homogeneización, sedimentación diferencial y posterior fraccionamiento. En el caso de BLMV se lleva a cabo, además, un subfraccionamiento. Finalmente se caracterizan los transportadores de membrana mediante marcadores enzimáticos²⁰⁴.

Aunque se pueden utilizar tejidos humanos, las fracciones subcelulares pueden no ser útiles para el estudio de la absorción oral, ya que la extrapolación de la magnitud y la velocidad de absorción obtenidas en este sistema a un sistema *in vivo* resulta muy difícil. Además puede dañarse la membrana durante el proceso de fraccionamiento.

-Tejidos aislados

Los tejidos aislados se obtienen generalmente de animales, aunque en ocasiones se emplean tejidos humanos. Las cámaras de difusión y los sacos evertidos son dos subgrupos dentro de los modelos que emplean tejidos aislados.

La cámara de difusión es un modelo de absorción que cuantifica el flujo de fármacos a través del tejido epitelial intacto. El segmento intestinal a estudio se aísla y secciona con el fin de obtener capas planas de tejido. Estas se disponen, posteriormente, sobre las células de difusión estándar (disponible comercialmente) y se rellenan con un tampón adecuado que simula el fluido extracelular²⁰⁴. Este sistema experimental es muy versátil y permite la cuantificación de la permeabilidad, el transporte intestinal paracelular y transcelular, la secreción intestinal y la influencia del metabolismo intestinal en la biodisponibilidad de los fármacos²⁰⁵.

El método de sacos evertidos se emplea en la realización de estudios de acumulación de fármaco en segmentos intestinales completos. Para ello, los segmentos intestinales se invierten y dividen en pequeñas secciones a modo de anillos^{206,207}. Estos se incuban, en tampones oxigenados que contienen el fármaco problema, bajo condiciones de agitación y temperatura controladas²⁰⁸. El sistema de sacos evertidos permite estudiar la biodisponibilidad de fármacos, las limitaciones de la absorción intestinal de un fármaco debido a su solubilidad, la evaluación de la conversión de un profármaco en fármaco por la acción del tejido intestinal, así como la discriminación

de los mecanismos de absorción de fármacos en transporte pasivo o activo (de absorción o secreción)^{206,208,209}.

- Cultivos celulares

Los modelos celulares aparecen con el objetivo de obtener sistemas experimentales homogéneos, reproducibles, fáciles de manipular y que presenten características morfológicas y funcionales similares a los enterocitos maduros²¹⁰.

Los cultivos celulares presentan una serie de ventajas frente a otros modelos de absorción como, la rápida determinación de la permeabilidad y metabolismo de los fármacos, la posibilidad de estudiar mecanismos de absorción bajo condiciones controladas, la minimización de la experimentación animal, la existencia de bancos de células de fácil acceso y la posibilidad de trabajar en pequeña, media y gran escala (entre otras)²¹¹. Sin embargo, el empleo de un sistema tan simplificado también supone una serie de limitaciones. En primer lugar, el comportamiento es distinto al del organismo completo. Además, se necesitan instalaciones adecuadas que garanticen la esterilidad, material específico y personal cualificado, lo que encarece el coste de la investigación con este modelo. También existe una gran variabilidad inter-laboratorio, la cual se intenta reducir aunando protocolos entre diferentes investigadores²¹².

Las células aisladas del epitelio gastrointestinal humano, aunque se obtienen fácilmente, no forman monocapas celulares que son imprescindibles para realizar ensayos de absorción²¹³. Otra dificultad para trabajar con enterocitos es que son células altamente polarizadas,

por lo que en suspensión celular se fusionan y despolarizan rápidamente perdiendo sus características morfológicas y biológicas²¹¹. Así, los estudios de este tipo están limitados a la determinación de acúmulo de fármaco en el interior de las células más que a estudios de transporte. Por tanto, el método ideal para el estudio de transporte y metabolismo de fármacos sería aquel en el que el cultivo celular creciera formando monocapas celulares similares a las que se encuentran en el intestino delgado y que mantuvieran la polarización y uniones intercelulares adecuadas en todo momento²⁰⁴.

En sustitución a los enterocitos se emplean líneas celulares transformadas. Las líneas celulares obtenidas a partir de adenocarcinomas pueden clasificarse en cuatro tipos, según su grado de diferenciación²¹⁴:

Tipo 1: Se diferencian espontáneamente bajo condiciones normales de cultivo. En ellas se observa una polarización de las células y formación de domes y un óptimo desarrollo de los bordes en cepillo apicales con gran cantidad de hidrolasas, como la lactasa y la sucrasa-isomaltasa. Únicamente una línea celular pertenece a este grupo, las células Caco-2.

Tipo 2: No se diferencian espontáneamente, sólo bajo determinadas condiciones. A este grupo pertenecen tres líneas: las HT-29, las HCT-EB y las HCT-GEO. Su diferenciación se puede inducir por alteración de las condiciones de cultivo, como sucede con las HT29 al reemplazar glucosa por galactosa¹⁵².

Tipo 3: No se diferencia espontáneamente pero sí se organizan en monocapas polarizadas con formación de domes, pero sin presentar ninguna de las características de la diferenciación enterocítica. Por

ejemplo, no expresan hidrolasas en el borde en cepillo. Dentro de este tipo se incluyen ocho líneas celulares entre las que destacan las HRT-18 y las SW-1116²¹⁵.

Tipo 4: No se diferencian y crecen en multicapas. Dentro de este grupo se incluyen las líneas celulares HCA7 y SW480.

Para llevar a cabo los cultivos celulares, además de la existencia de una línea celular adecuada, se requiere la utilización de un soporte apropiado para cultivar las células. Generalmente se utilizan filtros de policarbonato o celulosa, que permiten la fijación y el crecimiento celular. Es importante la elección adecuada de las características de la membrana y del tamaño de poro o el área de contacto²¹⁶.

En este contexto cabe citar las células de carcinoma de colon humano, como Caco-2 y HT-29, que sufren diferente nivel de diferenciación celular en cultivo. Las células Caco-2 son las que se han estudiado de forma más minuciosa por presentar, de forma espontánea, mayor diferenciación que las HT-29 o las T84^{152,210}.

-Línea celular Caco-2

La línea celular Caco-2 fue establecida por Fogh y colaboradores en 1977 a partir de carcinoma de colon humano. Como se ha expuesto anteriormente, es la única línea celular capaz de diferenciarse morfológica y funcionalmente a células con gran similitud a los enterocitos, de manera espontánea^{217,218}.

Esta línea celular crece formando monocapas celulares que presentan características morfológicas, bioquímicas y funcionales similares a las de los enterocitos diferenciados²¹⁹. Se utilizan para la realización de estudios de transporte transepitelial de numerosos fármacos y nutrientes²²⁰. En muchos casos, es posible investigar si un fármaco es transportado de forma activa o pasiva a través del epitelio intestinal y, si el transporte es activo, permite identificar el transportador más importante^{216,221}. En la figura 3.8 se representa el montaje utilizado para realizar los experimentos *in vitro* con monocapas de células Caco-2 sobre membranas de policarbonato.

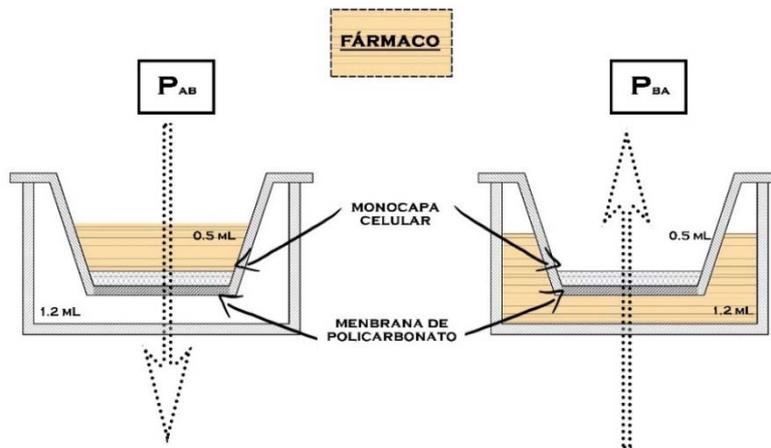


Figura 3.8. Esquema de la técnica de estudio del transporte transepitelial de un compuesto *in vitro* con monocapas Caco-2.

Se trata de células que presentan uniones estrechas (tight junctions), además de una clara polarización (cara apical y basal). En la cara apical muestran crestas y el borde en cepillo^{222,223}. Otra característica importante que asemeja esta línea celular a la membrana intestinal es la existencia de muchas de las enzimas del borde en cepillo

como hidrolasas (aminopeptidasa-N, fosfatasa alcalina, olipeptidilpeptidasa IV, sacarosa-isomaltasa, lactasa)^{224,225}, enzimas de fase III como la glicoproteína-P, y otros sistemas de transporte especializado para aminoácidos, dipéptidos, vitaminas y citostáticos²²⁶. Asimismo, la membrana basolateral está asociada a actividad ATP-asa dependiente de sodio-potasio y a receptores hormonales. También se encuentran enzimas intracelulares, tanto de fase I (oxidación), como las CYP, incluida la CYP3A, y de fase II (conjugación), como la glutatión S-transferasa y sulfotransferasa²²⁷⁻²³⁰.

Existe una excelente correlación demostrada entre los coeficientes de permeabilidad en células Caco-2 y la biodisponibilidad oral de fármacos en humanos^{231,152,211,232}. Este modelo *in vitro* permite clasificar la permeabilidad de los fármacos de forma similar a otros modelos de absorción más complejos, como los tejidos intestinales aislados o los modelos de perfusión *in situ*²³³.

Nuestro grupo de investigación ha validado el modelo de transporte de fármacos a través de células Caco-2 y ha liderado varios proyectos internacionales para establecer correlaciones entre las distintas técnicas experimentales utilizadas para los estudios de absorción¹⁵³. Concluyendo que este modelo es una base fiable para desarrollar modelos de enfermedad^{129,234}.

Por tanto, las monocapas de células Caco-2 pueden utilizarse para predecir el transporte de sustancias y fármacos a través de diferentes vías del epitelio intestinal²³⁵. Las mejores correlaciones con la fracción absorbida *in vivo* se obtienen para fármacos que se absorben de forma pasiva y rápida²³⁶.

La falta de uniformidad en los hallazgos sobre la patogenia y tratamiento de la giardiasis, incita a buscar nuevos modelos experimentales que reproduzcan de forma fiable el comportamiento de los enterocitos humanos y el parásito durante la infección. Los métodos *in vitro* son el primer paso en la búsqueda de respuestas, sin embargo no existen muchos estudios que utilicen modelos *in vitro* de infección con *Giardia* quizás porque no se ha encontrado un método fiable y reproducible.

Los primeros estudios de este tipo se realizaron midiendo la adherencia de los trofozoítos a recipientes de cristal o plástico²³⁷⁻²³⁹ y aunque mostraron resultados útiles, estos materiales diferían mucho de las células intestinales. También se han utilizado segmentos aislados de intestino de rata o humano²⁴⁰ y cultivos celulares como la línea de riñón de perro (MDCK)⁵⁵ o la línea Caco-2, entre otras.

En 1990, MacCabe R.E y col.²⁴¹ realizaron un estudio *in vitro* empleando la línea celular IEC-6 para detectar la adhesión de los trofozoítos de *Giardia*, marcados con un radioligando, a las células. Esta línea celular deriva del intestino de rata y conserva las características funcionales, morfológicas, enzimáticas e inmunológicas de las células de las que provienen²⁴²⁻²⁴⁴, por esto ha sido empleado en diversos estudios con *Giardia*²⁴⁵⁻²⁴⁷. Este método resultó simple, barato, rápido y reproducible. El ensayo mostró que el parásito se une a los trofozoítos mediante el disco ventral, lo que podría inducir daño directo del parásito consiguiendo la deformación del núcleo celular. Sin embargo una limitación destacable fue el empleo de un medio aerobico para la supervivencia de la línea celular IEC-6, lo cual podría influir en la

viabilidad y el metabolismo de este parásito anaerobio. El ensayo llevado a cabo por Sousa M.C., y col.⁵⁸ realizado en células Int-407, confirmó el papel del disco ventral en la adhesión del parásito a la célula. Además, se observó que al administrar Colchicina y Mebendazol, sustancias que alteran la formación de los microtúbulos, se producía una pérdida de adhesión del parásito. La línea celular Int-407 proviene del intestino delgado humano, siendo esto una ventaja frente a las líneas procedentes de carcinomas. Es fácil de manipular y capaz de reproducir los fenómenos que ocurren *in vivo*. Así, resultó ser un buen modelo para estudiar tanto la patogénesis como el efecto de los fármacos en presencia de *G. intestinalis*; sin embargo, no se estudió la viabilidad celular, el potencial de membrana o la actividad disacaridasa, necesarias para clarificar las alteraciones que produce *Giardia* sobre las células Int-407.

En el campo del estudio de comportamiento de los fármacos o complementos alimentarios, Pérez P.F, y col.²⁴⁸ comprobaron la influencia de la microflora intestinal en la colonización de *Giardia*, pues estudios previos evidencian el efecto protector de *Lactobacillus* frente a diversos patógenos²⁴⁹. En concreto, estudiaron el efecto antagónico de *L. Johnsonii* La1 sobre *G. intestinalis*, confirmando que la administración de probióticos puede ser una estrategia útil para la prevención de la giardiasis, pues modifica el ciclo celular del parásito. Sin embargo, el mecanismo por el que se produce no pudo ser evidenciado. Recientemente, Emery S. J., y col.²⁵⁰ han ido más allá diseñando un modelo de co-incubación para esclarecer qué ocurre en la relación parásito-huésped desde el punto de vista de la proteómica. Se utilizó la línea celular HT-29 como modelo *in vitro* y se midieron las secreciones celulares durante y tras la co-incubación con el parásito, empleando por

primera vez en *Giardia* el marcado de las proteínas del parásito. Los resultados apoyan la hipótesis de que *G. intestinalis* secreta factores de virulencia, como catepsina-B^{66,251,252} en presencia de señales emitidas por el huésped, siendo este fenómeno independiente de la adhesión del parásito a las células.

La línea celular Caco-2 presenta una serie de ventajas, comentadas anteriormente, por eso ha sido utilizada en la mayoría de estudios con *Giardia* para esclarecer los mecanismos de infección, el comportamiento de los quistes de *Giardia*, la influencia del parásito en el transporte y absorción de sustancias, entre otros^{54,99,253-255}. Sin embargo, aun siendo reconocida por la FDA como una línea celular adecuada para el estudio de permeabilidad y metabolismo de compuestos²⁵⁶, no hay muchos trabajos sobre este tema. Algunos de ellos se exponen a continuación. En el estudio realizado por Maia-Brigagão C., y col.,²⁵⁴ en células Caco-2, se observó que transcurridas 24 horas de infección, aparecían alteraciones en la permeabilidad paracelular y en la distribución de proteínas de las uniones estrechas, apoyando la teoría de que la adhesión del parásito produce alteraciones en las células del huésped que afectan a la permeabilidad de sustancias. Un estudio llevado a cabo por Hernández-Covarrubias C., y col.,²⁵⁵ comprobó la permeabilidad y actividad contra *Giardia* de 28 derivados de benzimidazoles y en otro ensayo realizado por Stadelmann B., y col.,⁹⁹ se estudió el papel de la arginina en la proliferación de las células del epitelio intestinal empleando un modelo celular Caco-2. En los últimos años, el grupo de Fisher B.S, y col.⁵⁴ ha desarrollado un modelo de co-incubación de *G. intestinalis* con la línea celular Caco-2, en el que se define en primer lugar, el tipo de medio de cultivo idóneo para el

mantenimiento y desarrollo de la línea celular durante largos periodos de tiempo. Así se consigue un modelo celular que permite la caracterización a largo plazo de las interacciones huésped-*Giardia*. La importancia del hallazgo reside en que desde ese momento se pueden estudiar fases de la patogenicidad que ocurren transcurridas unas semanas de la infección, pues los modelos existentes hasta la fecha sólo lograban mantener las células sin degradarse unos días. De este modo se podrá estudiar la fisiología de la enfermedad, incluyendo los mecanismos de infección, el papel de la inmunidad así como, diseñar nuevas dianas terapéuticas, entre otras ventajas.

3.2.3. Modelos animales

-Modelos animales *in situ*

Estos estudios se realizan, en la mayoría de los casos, en animales, aunque también se han realizado estudios similares en humanos^{257,258}. Los órganos a estudio deben aislarse de los tejidos periféricos. Este aislamiento no es necesariamente físico, ya que es importante mantener una buena vascularización del órgano.

Las técnicas de perfusión intestinal más utilizadas son: el modelo de paso único sin recirculación (*single pass*) y el método de Doluisio (*closed loop*).

En el método de paso único se perfunde el tramo de interés, a velocidad controlada, con la solución a estudio. Este sistema permite el control de la concentración del fármaco, el pH, la osmolaridad y la velocidad de entrada del mismo. El cálculo de la permeabilidad se realiza mediante la medida de la desaparición del

fármaco del lumen intestinal, en estado estacionario²⁵⁹. En la figura 3.9, se muestra un esquema del procedimiento experimental del método de paso único sin recirculación.

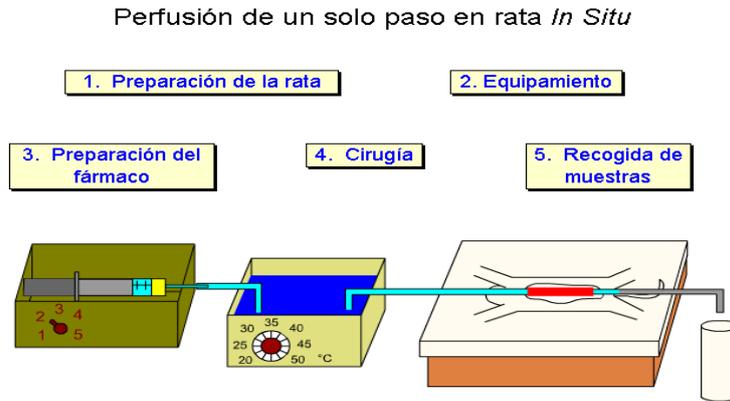


Figura 3.9. Esquema de la técnica de perfusión de un solo paso en rata *in situ*. Tomado con permiso de "Biofarmacia Moderna V.6.0".

El esquema de la técnica de Doluisio se muestra en la figura 3.10.

Técnica de perfusión sin recirculación: método de Doluisio

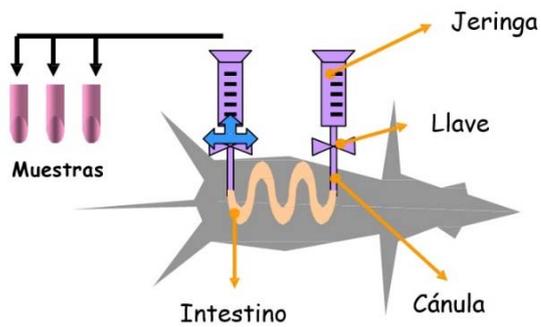


Figura 3.10. Esquema de la técnica de perfusión sin recirculación basada en el método de Doluisio, tomada de González-Álvarez. I.¹⁵³.

En el método de Doluisio, la solución a ensayar se mantiene en el segmento intestinal del cual se toman muestras para observar la desaparición del fármaco^{260,261}.

Con estas técnicas *in situ*, el aporte neural, endocrino, sanguíneo y linfático de la zona a estudio permanece intacto, señalándolo como un modelo idóneo para el estudio de absorción de fármacos²⁶².

-Modelos animales *ex vivo*

En estos modelos se emplean segmentos intestinales (generalmente de animales aunque en ocasiones se usan tejidos humanos) para el estudio de la absorción de fármacos. El ensayo consiste en administrar la solución de fármaco sobre el tejido y determinar la velocidad con la que atraviesa la barrera intestinal. Existen dos tipos de sistemas experimentales: las cámaras de difusión y los sacos evertidos.

Las cámaras de difusión son modelos de absorción que determinan el flujo transepitelial de un fármaco a través del tejido epitelial intacto. Se aísla un segmento intestinal y se secciona para obtener capas planas del tejido. Éstas se disponen sobre células de difusión que se rellenan con un tampón que simule el fluido fisiológico. Este sistema experimental permite determinar la permeabilidad del fármaco y, con un diseño adecuado, discernir entre transporte paracelular, transcelular, secreción intestinal e incluso la influencia de metabolismo intestinal que determinará la biodisponibilidad oral del fármaco.

Los sacos evertidos se utilizan en estudios de acumulación de fármaco en un segmento intestinal. Para ello se invierte el segmento intestinal y se divide en pequeñas secciones como si fueran anillos. En este sistema se

incubaban los anillos en tampones oxigenados controlando la agitación y la temperatura. Esta técnica permite estudiar las limitaciones que puede presentar un principio activo frente a la absorción intestinal debido a la solubilidad y los mecanismos de transporte implicados.

-Modelos animales *in vivo*

Mediante los estudios *in vivo* de permeabilidad en animales se obtiene una mejor predicción de la constante de velocidad de absorción que con los estudios *in vitro*.

Los ensayos *in vivo* permiten determinar la biodisponibilidad oral. La técnica quirúrgica consiste en la implantación de un catéter de silicona en la vena yugular de la rata. A través de este catéter se pueden obtener muestras plasmáticas, tras la administración del fármaco por vía oral, sin sufrimiento para el animal y sin tener que recurrir a anestesia para cada toma de muestra. Esta técnica permite la construcción de curvas de nivel plasmático orales e intravenosas. Los diferentes tratamientos matemáticos de los datos, utilizando métodos compartimentales y no compartimentales, permitirán establecer la biodisponibilidad de los fármacos estudiados.

3.2.4. Modelos en humanos

La experimentación en humanos es un tipo de investigación apropiado para cuantificar y evaluar mecanismos de absorción de fármacos y, observar los efectos finales de un experimento en el sujeto vivo. Los experimentos *in vivo* en humanos proporcionan una mayor información que el resto de modelos, ya que las células contienen varios tipos de maquinaria y pequeñas moléculas que influyen en el experimento. Al mismo tiempo esto es una desventaja, ya que tiene

demasiados parámetros que no se pueden controlar correctamente *in vivo*. Por otra parte, los organismos vivos exhiben una gran variabilidad, incluso con el tiempo, que no puede ser controlada totalmente por el investigador.

El ensayo clínico es la forma de investigación en humanos. Antes de los ensayos clínicos (fase preclínica), el fármaco es testado mediante estudios químicos de pureza y estabilidad, estudios farmacológicos de eficacia e inocuidad, y estudios *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio. La necesidad de realizar los ensayos clínicos se debe a que los resultados de todos los demás modelos existentes guían la investigación, pero no son directamente extrapolables al ser humano²⁶³.

Los dos pilares de la regulación de la experimentación humana son el Código de Núremberg (1947)²⁶⁴ y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (1964)²⁶⁵. Estos documentos son la base de los comités de ética institucionales para la investigación humana. En ellos se resumen los principios éticos en investigación sobre seres humanos, los cuales se citan a continuación²⁶⁶:

- Consentimiento informado.
- La investigación se debe basar en trabajos previos en animales.
- Los riesgos se deben justificar por los beneficios esperados.
- La investigación se debe conducir por científicos calificados.
- El sufrimiento físico y mental debe ser evitado.
- La investigación en la cual se espera la muerte o lesión invalidante no debe ser conducida.

4. Regla de las 3 Rs

Dado que la investigación con animales suscita polémica social y un dilema moral para los investigadores, surge la necesidad de establecer una normativa que proteja a los animales, regule el uso y cuidado de los animales de laboratorio y minimice su sufrimiento. Después de un debate social de varios siglos, en el año 1959, Russell y Burch²⁶⁷ introdujeron en su libro *“The principles of Humane Experimental Technique”* el lema o principio de las tres R: reducción, refinamiento y reemplazo que ha sido la base de las leyes que se han promulgado para regular el uso de animales de experimentación desde entonces, y que están presente en todos los estudios científicos que se realizan en la actualidad²⁶⁸.

La primera R hace referencia al concepto de Reducir. Reducir se refiere a disminuir el número de animales utilizados en un estudio experimental sin que haya una disminución en la calidad, fiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. La reducción implica utilizar métodos o estrategias para obtener la misma información con menos animales, o más información usando el mismo o menor número de animales.

La segunda R de refinamiento consiste en evaluar todas las alternativas y seleccionar las técnicas más adecuadas que produzcan menos dolor o malestar y que garanticen, dentro de lo posible, el bienestar de los animales durante la aplicación del protocolo experimental. Además la selección de las técnicas adecuadas debería permitir la obtención de datos más exactos y mayor número de información con menos experimentos, de manera que, a efectos prácticos, la aplicación de esta R está íntimamente ligada a la R de reducción ya que

generalmente, técnicas más finas implican el uso de un menor número de animales y, a la vez, estos están sometidos a menos sufrimiento.

La R de Reemplazo, se refiere a la sustitución de los experimentos con animales por otros métodos alternativos (como los descritos en el apartado anterior). Esta R es la que más y mejores resultados está proporcionando respecto al objetivo prioritario de disminuir el número de animales. La investigación en este campo ha sido muy activa en los últimos años con un doble objetivo: evitar el sufrimiento animal “evitable” y obtener datos experimentales fiables ya que, tal y como se venía comentando desde siglos anteriores, se ha constatado que los datos obtenidos a partir de ensayos con animales no siempre son extrapolables a humanos²⁶⁹.

Nuestro grupo de investigación, especializado en el estudio de absorción de fármacos y farmacocinética, ha trabajado activamente en la última década con el fin de sustituir los ensayos en animales por ensayos *in vitro*. Para ello se han puesto en marcha modelos celulares de barrera intestinal con células tumorales Caco-2 y TC7, y modelos de barrera hematoencefálica cada vez más perfeccionados que permiten correlacionar los resultados obtenidos con los que se podrían obtener *in vivo*²⁷⁰⁻²⁷². El objetivo actual de nuestro grupo, es obtener modelos *in vitro* capaces de reproducir condiciones de enfermedad que afectan a la permeabilidad de alguna de las barreras biológicas. Los modelos desarrollados suponen una reducción en el número de animales, pero además permiten el análisis simultáneo de un número elevado de moléculas (*highthroughput screening*), una vez que la técnica se ha validado debidamente.

C. Fármacos en pediatría

La malabsorción de nutrientes es una de las consecuencias más graves de la giardiasis, siendo especialmente importante en la población infantil. En los países en vías de desarrollo, en los cuales esta patología es de alta prevalencia, podría verse comprometido aún más el estado nutricional de la población. Esta disminución de la absorción de nutrientes ha sido demostrada en diferentes investigaciones, sin embargo en el campo de la absorción intestinal de fármacos no encontramos muchos trabajos. En los tratamientos farmacológicos pediátricos, la absorción de fármacos es un parámetro importante a tener en cuenta pues pequeños cambios en la permeabilidad de fármaco podrían suponer un peligro para el niño.

Algunos de los principales motivos de consulta de atención primaria pediátrica son la amigdalitis, las infecciones del tracto gastrointestinal y la otitis media aguda. Dentro de los síntomas más comunes de los pacientes que acuden a consulta se encuentran los cuadros febriles y las cefaleas. El dolor musculoesquelético es un síntoma cada vez más frecuente entre la población infantil. Respecto a las patologías neurológicas, la epilepsia se encuentra entre las más comunes de la población pediátrica siendo el evento paroxístico más frecuente en la infancia. Dentro de las infecciones respiratorias, cabría destacar la tuberculosis, pues se considera una de las enfermedades transmisibles que producen mayor índice de mortalidad en niños según el informe de la OMS de 2004, y está situada en el punto de mira de los programas de Salud Internacional.

La eficacia y seguridad de los tratamientos farmacológicos para combatir estos síntomas y patologías está directamente relacionada con las pautas y dosis prescritas. A diferencia de los adultos, en el paciente pediátrico, es de suma importancia conseguir un ajuste adecuado de la dosis en función del peso y la edad, con el fin de maximizar la eficacia y minimizar los efectos adversos de los fármacos.

1. Analgésicos/Antipiréticos

Este grupo de fármacos está indicado en el tratamiento sintomático del dolor ocasional leve o moderado, como dolor de cabeza, dental, muscular o de espalda y, estados febriles.

La fiebre es el principal motivo de consulta pediátrica (25-30%). Constituye un síntoma que acompaña tanto a enfermedades banales y autolimitantes como a enfermedades graves. La etiología es variada, pudiendo ser causada por una infección o pudiendo tener un fondo inmunológico, alérgico y neoplásico, pero lo esencial es que la presencia de fiebre indica actividad inflamatoria²⁷³.

Los dolores de cabeza son los síntomas somáticos de dolor más comunes en la infancia. Entre un 10 y un 25% de los niños tiene cefaleas recurrentes²⁷⁴⁻²⁷⁷. Un informe reciente²⁷⁸, constata un aumento muy importante en los síndromes de dolor musculoesquelético. Estos índices llegan a duplicar o triplicar, en ocasiones y según las franjas de edad, los niveles existentes hace 40 años²⁷⁹.

1.1. Paracetamol

El Paracetamol es un fármaco analgésico y antipirético, inhibidor de la síntesis de prostaglandinas periféricas y centrales por acción sobre la ciclooxigenasa. Bloquea la generación del impulso doloroso a nivel periférico, así como actúa sobre el centro hipotalámico regulador de la temperatura. Se emplea en el tratamiento sintomático del dolor leve o moderado y de la fiebre, por lo que es prescrito en la mayoría de patologías infantiles más comunes, como coadyuvante de un proceso infeccioso, vírico, febril, dolor a causa de un traumatismo, etc.

La farmacocinética en el niño se supone similar a la del adulto (aunque no existen estudios). La absorción depende de la rapidez del vaciamiento gástrico y del metabolismo hepático²⁸⁰. Por vía oral la biodisponibilidad de Paracetamol es del 75-85%. Se absorbe amplia y rápidamente por difusión pasiva. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en función de la forma farmacéutica, con un tiempo de 0,5 a 2 horas.

La dosis diaria recomendada de Paracetamol en niños menores de 10 años es aproximadamente de 60 mg/kg/día, que se reparte en 4 o 6 tomas diarias. Niños a partir de los 10 años: 500-650 mg/4-6 horas; máximo 4 g/día²⁸¹. La dosis tóxica corresponde a 150 mg/Kg, manifestándose principalmente como hepatotoxicidad. Dosis elevadas pueden saturar los mecanismos habituales de metabolización hepática, lo que hace que se utilicen vías metabólicas alternativas que dan lugar a metabolitos hepatotóxicos y posiblemente nefrotóxicos, por agotamiento de glutatión²⁸¹. Por el contrario, si se administra menos dosis de la necesaria, no se conseguirían los efectos de reducción de dolor

o, lo que es más grave, el control del estado febril. Es importante administrar la dosis exacta en el paciente pediátrico respetando las posologías definidas en función del peso.

1.2. Ibuprofeno

Ibuprofeno es un compuesto no esteroideo derivado del ácido propiónico con marcadas propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Su mecanismo de acción es debido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Las prostaglandinas desempeñan un papel esencial en la aparición de la fiebre, del dolor y de la inflamación.

En niños mayores de 3 meses se usa como tratamiento sintomático de la fiebre y el dolor de intensidad leve o moderada, como dolor de cabeza, dolor dental, dolor post-operatorio, dolor musculoesquelético; para el tratamiento de la artritis reumatoide infantil y de otros procesos reumáticos agudos o crónicos que cursen con dolor e inflamación²⁸².

Ibuprofeno tiene una farmacocinética de tipo lineal, es decir, la velocidad del proceso es proporcional a la concentración (C_0) en ese instante. Es una sustancia altamente lipofílica, por lo que puede atravesar las membranas por difusión pasiva sin necesidad de transportadores específicos. Es un ácido débil, por lo que difundirá bien en los medios ácidos, al encontrarse su mayor parte en la forma no ionizada. Se considera un fármaco de clase II, por su elevada permeabilidad y baja solubilidad. Por vía oral se absorbe rápido, y aproximadamente un 80% en el tracto gastrointestinal.

La dosis pautada es de 20 mg/Kg/día cada 6-8 horas para menores de 12 años. Se considera dosis tóxica, una dosis igual o superior a 100 mg/Kg. La intoxicación aguda con AINE afecta sobre todo a los siguientes aparatos o sistemas: gastrointestinal, renal, SNC y piel²⁸².

2. Antiarrítmicos/ Antipalúdicos

2.1. Quinidina

La Quinidina es un medicamento que actúa a nivel del corazón como agente antiarrítmico clase I y, químicamente, es un estereoisómero de la quinina, un derivado original de la corteza desecada de tallos y raíces de la quina (*Cinchona calisaya*, *Rubiaceae*)²⁸³. Tiene una biodisponibilidad del 75%.

Es tratamiento de segunda elección para controlar las arritmias cardíacas supraventriculares y ventriculares y para combatir las infecciones por *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria, por vía oral y parenteral.

La dosis de prueba es de 2 mg/kg y si se tolera se administran 6 mg/kg cada 4 o 6 horas. Si se sobrepasa la dosis terapéutica pueden aparecer alteraciones gastrointestinales (vómitos, diarrea, dolor abdominal), del SNC (cefalea, vértigo, ataxia, coma, convulsiones, depresión respiratoria), cardíacas (taquiarritmias, insuficiencia cardíaca, hipotensión arterial), hipopotasemia, auditivas y visuales. Se deben vigilar algunos parámetros durante el tratamiento como, electrocardiograma, tensión arterial, electrolitos, alteraciones SNC y concentraciones séricas. Si se produjese la sobredosificación podrían

aparecer estos peligrosos efectos, y si no se alcanzase la dosis terapéutica el paciente no lograría la curación²⁸⁴.

3. Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos constituyen uno de los grupos más importantes dentro de la terapéutica, puesto que continúa siendo el tratamiento de primera elección en numerosos procesos infecciosos. Están indicados en el tratamiento de infecciones sistémicas o localizadas causadas por microorganismos gram-positivos y gram-negativos. Las más comunes en la infancia son^{285,286}:

- Infecciones de la piel y tejidos blandos debidas a *Streptococcus* α -y β -hemolítico, *Staphylococcus spp.*, o *E. coli*.
- Infecciones del tracto genitourinario, debidas a *E. coli*, *Proteus mirabilis*, o *Enterococcus faecalis*.
- Infección de orina que, de hecho, figura entre los motivos de consulta ambulatoria más frecuentes y repetidas de la práctica pediátrica, solo precedida por las infecciones del aparato respiratorio.
- Infecciones odontoestomatológicas.
- Infecciones del tracto gastrointestinal (fiebre tifoidea y paratifoidea).
- Infecciones otorrinolaringológicas (amigdalitis, faringitis, otitis media...) y del tracto respiratorio inferior, debidas a especies de *Streptococcus* α -y β -hemolítico, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus spp.*, o *Haemophilus influenza*.

Dentro de éstas, la amigdalitis y la faringitis son patologías muy comunes en los primeros años de vida. En concreto, la faringoamigdalitis por *Streptococcus pyogenes* es de las enfermedades

bacterianas más prevalentes en la infancia y adolescencia. En España unos 16 millones de consultas médicas anuales en toda la población son a causa de odinofagia en general, siendo un 20% del total de las consultas pediátricas y un 55% del total de prescripciones antibióticas en este grupo de edad²⁸⁷.

La Otitis Media Aguda (OMA) es uno de los principales motivos de consulta en Atención Primaria pediátrica, y el principal motivo de prescripción de antibióticos. Aunque hay pocos datos válidos sobre prevalencia, en el año 2000 se realizó un estudio de cohortes en Valencia que indicaba que el 60% de los niños valencianos menores de tres años había tenido al menos un episodio de OMA²⁸⁸.

Los antibióticos betalactámicos, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de antibióticos de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad. La mayoría son hidrófilos, y, por consiguiente, difunden escasamente a través de las membranas. Penetran en la célula por medio de transportadores específicos.

En un estudio²⁸⁹ realizado por Craft y col. (1987) se asoció la malabsorción de antibióticos con la presencia de *G. intestinalis* en niños. Todos los antibióticos incluidos en este trabajo tenían en común su forma de atravesar la membrana plasmática, mediante transporte activo. Por lo que se cree que la terapia antibiótica podría estar comprometida en presencia de *G. intestinalis*.

3.1. Amoxicilina

La Amoxicilina es un ácido débil, por lo que es estable en medio ácido. Gracias a esta propiedad, es de elección dentro de la familia, ya que es mejor absorbido que otros antibióticos β -lactámicos. Se absorbe rápidamente después de la administración oral, alcanzando los niveles máximos en 60-150 minutos. Es sustrato de glicoproteína-P y atraviesa la membrana plasmática mediante transporte activo. Es un antibiótico potente, de amplio espectro bactericida y baja toxicidad.

La dosis pediátrica recomendada para niños de menos de 40 kg es 25-50 mg/kg/día cada 8 horas y para niños de más de 40 kg, la dosis diaria total es 500 mg, 3 veces al día o 1g, 2 o 3 veces al día.

La dosis máxima en niños es 150 mg/kg/día. En neonatos y menores de 2 meses la dosis máxima es 30 mg/kg/día, en intervalos de 12 horas. La ingestión de dosis muy altas puede ocasionar cristaluria, por lo que es esencial mantener una adecuada diuresis, también puede ocasionar diarrea. Es importante evitar las dosis subterapéuticas, pues el antibiótico podría no hacer efecto además de crear resistencias, comprometiendo su eficacia contra futuras infecciones.

3.2. Cefadroxilo

El Cefadroxilo pertenece al grupo de primera generación de Cefalosporinas. Presentan buena actividad frente a infecciones causadas por bacterias gram-positivas y gram-negativas²⁹⁰.

Este antibiótico es absorbido prácticamente en su totalidad en el tracto gastrointestinal. Su absorción se produce por mecanismos especializados de transporte²⁹¹. La absorción intestinal de Cefadroxilo es un proceso coordinado en el que la captación celular del lumen se

produce a través del transportador PepT1 y el transporte de secreción a través de la unión a los transportadores de la familia ABC, transportadores MRP3 (Abcc3) y MRP4 (ABCC4)²⁹². PepT1 y MRP4 se encuentran en la membrana apical del epitelio del intestino delgado y renal²⁹³, y MRP3 se encuentra en la membrana basolateral de los enterocitos^{294,295}. Dada la multitud de proteínas transportadoras que se encuentra Cefadroxilo en las membranas biológicas, es posible que este antibiótico β -lactámico pueda mostrar una farmacocinética no lineal, especialmente en el intestino delgado donde las altas concentraciones de fármaco, después de la administración oral, pueden saturar la absorción eficiente de Cefadroxilo a través de PepT1. Además es poco soluble en lípidos y se ioniza totalmente en el intestino.

La dosis diaria recomendada en niños es de 25 a 50 mg/kg/día cada 12 horas. La dosis máxima es de 2g/día²⁹⁶. Un aumento de la absorción de fármaco llevaría a efectos nocivos sobre el sistema digestivo y problemas tipo alérgicos como erupciones y fiebre. Se deben evitar también las dosis subterapéuticas pues podrían aparecer resistencias además de no conseguir la cura del paciente.

4. Antiepilépticos

La epilepsia es una enfermedad crónica del sistema nervioso central que se caracteriza por dos o más crisis paroxísticas espontáneas de diferentes características, originadas por una descarga excesiva de un grupo de células de la corteza cerebral. Es una de las patologías neurológicas más comunes en la población pediátrica²⁹⁷⁻³⁰¹, siendo el

evento paroxístico más frecuente en la infancia y ocupa el segundo lugar entre las enfermedades neurológicas ³⁰².

Las cifras disponibles respecto a la incidencia anual de epilepsia infantil son muy variables, oscilando entre 41 y 100 casos por 100.000³⁰³⁻³⁰⁵, generalmente debido a razones metodológicas que hacen difícil la comparación de resultados. En relación a la edad, el inicio de la epilepsia acontece sobre todo durante el primer año de vida, para ir disminuyendo gradualmente en la adolescencia³⁰⁶. En un estudio³⁰⁷ se obtuvo una prevalencia de la epilepsia en la población escolar estimada en 5,72/1000 casos.

El tratamiento se basa en fármacos antiepilépticos que, bien administrados, han demostrado ampliamente su eficacia. La epilepsia se puede controlar de manera sencilla con tratamiento crónico, sin embargo algunos de los fármacos que se utilizan son de estrecho margen terapéutico y es importante ajustar la dosis correctamente. A continuación se detallan: Carbamazepina, Diazepam y Fenobarbital.

Carbamazepina y Fenobarbital son fármacos de estrecho margen terapéutico³⁰⁸, por lo que es especialmente preocupante que se produzcan modificaciones en la absorción. Si se incrementa levemente la absorción de estos fármacos puede aparecer toxicidad. También son peligrosas dosis inferiores a las recomendadas, pues no se conseguirá el control de las crisis epilépticas con el consiguiente fracaso terapéutico.

4.1. Carbamazepina

Es un antiepiléptico de elección en epilepsias parciales y generalizadas, aceptado para su uso en niños por su baja capacidad depresora central. Este fármaco antiepiléptico actúa inhibiendo la

propagación del impulso nervioso desde el foco epiléptico. Otras acciones son la reducción de la transmisión nerviosa a nivel del núcleo trigeminal, sedante, anticolinérgica, antidepresiva, relajante muscular, antiarrítmica, antidiurética e inhibidora de la transmisión neuromuscular.

Se estima que la absorción varía entre el 72% y el 96%, siendo esta lenta e irregular, con una tMAX que varía entre 4 y 24 horas. En niños, existe una relación dosis/concentración plasmática más baja que en adultos, probablemente por un aclaramiento más rápido. Debido a su lipofiliidad, penetra fácilmente en los tejidos y líquidos del organismo por difusión pasiva a través de las membranas celulares³⁰⁹. Presenta, simultáneamente, transporte de excreción mediado por glicoproteína-p³¹⁰.

La dosis recomendada para niños menores de 6 años es de 10 a 20 mg/kg/día dos o tres veces al día inicialmente, aumentándola de 20 a 60 mg cada dos días. En los mayores de 6 años, el tratamiento puede iniciarse con 100 mg/día incrementándolo en 100 mg a intervalos semanales. En los niños menores de 6 años no se pueden realizar recomendaciones referentes a la seguridad de Carbamazepina para uso con dosis por encima de 35 mg/kg/día. Es un medicamento de estrecho margen terapéutico³⁰⁸, de ahí la importancia de la correcta dosificación. Si se aumenta levemente la absorción del fármaco puede aparecer toxicidad. La clínica de la intoxicación es fundamentalmente neurológica, siendo el síntoma más frecuente y característico el nistagmo. Los pacientes pueden tener otras manifestaciones clínicas como ataxia, disminución de conciencia y coma; taquicardia, arritmias, bradicardia e hipotensión arterial; depresión respiratoria y convulsiones³¹¹. También

son peligrosas dosis inferiores a las recomendadas, pues el paciente pediátrico no sería capaz de controlar las crisis epilépticas, comprometiendo gravemente su salud.

4.2. Diazepam

El Diazepam es un derivado benzodiazepínico que actúa sobre el sistema límbico, el tálamo y el hipotálamo. No produce una acción de bloqueo autonómico periférico ni efectos secundarios extrapiramidales, como ocurre con otros fármacos que se prescriben para las mismas patologías.

Se emplea en la población pediátrica como tratamiento de las crisis epilépticas, además de como ansiolítico y sedante. Las dosis son diferentes para cada indicación³¹²:

-Anticonvulsivante: su eficacia para controlar las crisis y su perfil seguro, así como la posibilidad de administración rectal, lo hace un fármaco habitual en el tratamiento de las crisis y del *status* epiléptico. La dosis recomendada es 1 mg/kg/día cada 8 horas. Se recomienda empezar el tratamiento ante el primer signo de fiebre y continuar hasta 24 horas después de su remisión.

-Ansiolítico: para reducir síntomas de ansiedad, agitación e irritabilidad secundarios a una patología de base o a estrés ambiental. La dosis recomendada es 0,12-0,8 mg/kg/día cada 6-8 horas. La tasa general de prevalencia de los trastornos de ansiedad durante la infancia es de un 18%³¹³. Los niños que los padecen experimentan importantes problemas relacionados con fracaso escolar, baja autoestima, soledad y, también con la salud física³¹⁴.

-Sedante moderado para procedimientos cortos: aunque su efecto ansiolítico puede aportar cierto efecto sinérgico, dada su vida media larga, no suele ser el fármaco de elección para procedimientos invasivos. La dosis recomendada es 0,2-0,3 mg/kg (máximo 10 mg).

La absorción gastrointestinal del Diazepam administrado por vía oral es rápida y prácticamente completa (99%). El Diazepam, administrado por esta vía, alcanza a los 30-90 minutos la concentración máxima de nivel plasmático.

Debido a la respuesta de los fármacos que actúan sobre el SNC, en niños se recomienda iniciar la terapia con dosis bajas de 1 a 2,5 mg, 3 o 4 veces por día y aumentar según la necesidad de 0,1 a 0,3 mg/Kg/día. No debería administrarse a niños menores de 6 meses, pues no hay estudios probados en ellos.

Se considera dosis tóxica si la ingesta es 5 veces superior a la dosis terapéutica. Los síntomas más prevalentes tras una intoxicación por Diazepam son neurológicos, siendo él más frecuente la ataxia. Esta aparece como síntoma aislado en aproximadamente el 17% de los casos, por lo que se ha de incluir la intoxicación por benzodiazepinas en el diagnóstico diferencial de la ataxia aguda en la infancia. También puede producir alucinaciones, confusión, agitación y coma. Dependiendo de la dosis, puede aparecer una clínica más severa con depresión del centro respiratorio, bradicardia e hipotensión.

4.3. Fenobarbital

El Fenobarbital es un barbitúrico que, como tal, posee efectos hipnóticos, anticonvulsivos y sedantes. Los barbitúricos actúan

Introducción

como depresores no selectivos del sistema nervioso central y son capaces de producir todos los niveles de alteración del estado anímico del sistema nervioso central, desde excitación hasta sedación ligera, hipnosis y coma profundo. La sobredosis puede producir la muerte.

Es uno de los fármacos de elección en el tratamiento del *status epilepticus* y de las convulsiones febriles. Otras indicaciones son el síndrome de abstinencia en niños nacidos de madres adictas a los opiáceos o barbitúricos, y la hiperbilirrubinemia debido a la inducción de enzimas microsomales hepáticas, lo que acelera el aclaramiento de la bilirrubina.

El Fenobarbital es un ácido débil que se absorbe y distribuye rápidamente a todos los tejidos y fluidos, generando altas concentraciones en cerebro, hígado y riñones. El Fenobarbital es el barbitúrico menos liposoluble y el que menos se une a las proteínas plasmáticas y cerebrales. El Fenobarbital está clasificado como barbitúrico de acción prolongada cuando se administra por vía oral. Su inicio de acción se produce en 1 hora o más, y su duración de acción oscila entre 10 y 12 horas.

Es muy importante asegurar la dosificación exacta, pues es un medicamento de estrecho margen terapéutico. El rango de dosis utilizado en niños es de 4-5 mg/kg tres veces al día. Sin embargo, debido a la variación entre pacientes, debería ser ajustado de acuerdo a las concentraciones plasmáticas y efectos clínicos en cada individuo, es decir, se deben monitorizar los niveles plasmáticos (Rango terapéutico: 15-40 µg/mL).

Si se sobredosifica (dosis tóxica $\geq 50 \mu\text{g/mL}$), puede dar lugar a una intoxicación aguda, con los siguientes síntomas^{315,316}: confusión grave, nistagmo de posición terminal, nistagmo en visión frontal, disminución de la atención, reducción de los reflejos, ligera ataxia, ataxia con tendencia a la caída, somnolencia, fiebre, hipotermia, semi-coma, depresión respiratoria, latidos cardíacos lentos, habla balbuceante y shock con pupilas dilatadas. Por otro lado, los síntomas de toxicidad crónica son: confusión grave, irritabilidad continua, escasa capacidad de raciocinio, problemas para dormir y lesión hepática. También es importante evitar las dosis subterapéuticas, pues el paciente pediátrico no sería capaz de controlar las crisis epilépticas, comprometiendo su vida. Tras una administración prolongada puede desarrollarse dependencia, por lo que para retirar el fármaco, se debe disminuir la dosis progresivamente durante meses.

5. Antituberculosos

La tuberculosis constituye un grave problema de salud pública en los países en vías de desarrollo, y en las poblaciones marginadas económica y socialmente de los países industrializados. Está considerada como una de las enfermedades transmisibles que producen mayor índice de mortalidad en niños, según el informe de la OMS de 2004. La aparición de tuberculosis farmacorresistentes a nivel mundial y los altos niveles de incidencia y mortalidad en regiones de Asia y África, la sitúan en el punto de mira de los programas de Salud internacional. La giardiasis también es frecuente en estos tipos de población, por lo que es probable que algunos niños presenten ambas infecciones.

Introducción

El número de casos ha aumentado considerablemente durante los últimos años incluso entre la población infantil. Los niños pueden sufrir tuberculosis a cualquier edad pero con más frecuencia entre los 1 y 4 años. En concreto, en España, la incidencia de la enfermedad es de 5 casos/100.000 niños entre 5-14 años y 13 casos/100.000 niños entre 0-4 años³¹⁷.

Es una patología causada por el bacilo de *Koch*. La infección en los niños se produce tras la inhalación de gotas contaminadas (tos, estornudos) procedentes de personas con secreciones respiratorias infectadas con el bacilo²⁸⁷. Las bacterias que causan esta enfermedad pueden vivir de forma inactiva en el organismo, pero puede activarse un tiempo después de que se haya producido el contagio. La infección tuberculosa no suele presentar síntomas, mientras que la enfermedad tuberculosa cursa fundamentalmente con fiebre no muy elevada y tos. La forma pulmonar es la más frecuente.

Para el tratamiento de la tuberculosis existen protocolos terapéuticos que varían la dosis y la duración de los distintos antibióticos en función del estadio de la enfermedad. Isoniazida y Rifampicina son fármacos antituberculosos empleados con frecuencia.

Durante el tratamiento existe riesgo de crisis convulsiva, por lo que es necesario vigilar la dosis y administrar anticonvulsivantes si es necesario; también puede aparecer toxicidad hepática y neuropatía periférica.

5.1. Isoniazida

Isoniazida es un bactericida para los microorganismos en rápida división. Actúa específicamente sobre *Mycobacterium Tuberculosis* y algunas micobacterias atípicas (*M. bovis*). Carece de actividad sobre bacterias, hongos y virus.

Sobre el mecanismo de acción de Isoniazida, se han propuesto diversas hipótesis. La acción primaria de este fármaco sería la inhibición de la biosíntesis de los ácidos micólicos, que son componentes lipídicos específicos e importantes de la membrana de las micobacterias. Penetra con facilidad en la célula y ha demostrado la misma eficacia frente a los bacilos que están creciendo en el interior de la célula, que frente a los que están creciendo en medios de cultivo.

Su peso molecular es bajo, lo que le confiere una elevada capacidad de difusión. Su acción farmacoterapéutica no se modifica por las variaciones de pH del medio.

Isoniazida es el antibiótico antituberculoso más utilizado. La dosis pautada en niños es de 10-20 mg/kg/día en dosis diaria única, (dosis máxima de 300 mg/día); o 20-40 mg/Kg intermitente 2-3 veces a la semana (dosis máxima de 900 mg/día). La intoxicación por este fármaco produce un síndrome caracterizado por convulsiones, acidosis metabólica y, en casos severos, depresión respiratoria y coma^{318,319}.

5.2. Rifampicina

Rifampicina es un fármaco de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis, siendo necesario su uso en combinación para evitar la aparición de resistencias. Es un antibiótico bactericida,

perteneciente al grupo de las rifamicinas. Es activo frente a bacterias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), algunas micobacterias (especialmente *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* y muchas estirpes de *M. kansasii*) y frente a algunas bacterias gram-negativas (incluyendo *Brucella sp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N.meningitidis* y *Legionella pneumophila*).

Es un fármaco muy liposoluble, por lo que difunde adecuadamente a través de las membranas. También penetra por medio de macrófagos, lo que le hace útil para el tratamiento de infecciones causadas por parásitos intracelulares. También presenta transporte de secreción.

La dosis recomendada en lactantes y niños es 10-20 mg/kg/día vía oral al menos 30 minutos antes de las comidas o, 2 horas después en dosis única. La dosis máxima es 600 mg/día. Rifampicina es un fármaco de estrecho margen terapéutico³⁰⁸, e interacciona con una gran variedad de fármacos. Tanto antes como durante el tratamiento es necesario vigilar los diferentes parámetros, como: antibiograma, enzimas hepáticos, bilirrubina, creatinina sérica, recuento sanguíneo y plaquetario; pues es posible que se vean afectadas. En este caso es muy importante el control de la dosis, pues pequeños cambios en ella supondrían un peligro para el paciente.

D. Tratamientos no convencionales

Los tratamientos actuales contra la giardiasis se engloban dentro de las estrategias convencionales pero, debido a las características de la infección, sería interesante proponer tratamientos nuevos basados en tecnologías novedosas.

Una tercera parte del total de los fallos de nuevas formulaciones tiene su origen en problemas relacionados con sus propiedades biofarmacéuticas, debido a la creciente complejidad de las nuevas entidades químicas. La mayoría de fármacos en fase clínica, no llegan a dar resultados favorables al no tener la capacidad de alcanzar el lugar de acción con niveles adecuados de principio activo. Una parte del fármaco administrado se distribuye por tejidos u órganos que no están involucrados en el proceso patológico, provocando a menudo efectos secundarios graves.

Para evitar este tipo de situaciones y tratar de desarrollar medicamentos que puedan ser utilizados con unos niveles aceptables de eficacia y seguridad, se está recurriendo a técnicas de formulación innovadoras que liberen el fármaco o agente bioactivo en el sitio de acción deseado³²⁰. Esto, incrementaría la adherencia del paciente al tratamiento y la eficacia terapéutica de los agentes farmacéuticos, además de mejorar las propiedades farmacocinéticas y la biodistribución³²¹⁻³²³. Existen varios artículos en la bibliografía en los que se demuestran las ventajas de estos sistemas en la distribución y liberación de formulaciones orales³²⁴. Estos sistemas de liberación

específicos se componen de: un agente terapéutico y un sistema de transporte.

Dentro de los nuevos sistemas de liberación de fármacos, los que parecen más prometedores son los denominados “materiales inteligentes”³²⁵. La base de esta nueva tecnología consiste en utilizar estructuras que transporten el fármaco hasta la zona dañada y, solamente cuando han reconocido esa zona, lo liberen como respuesta a un cierto estímulo. Las moléculas sensibles a estímulos muestran cambios drásticos en sus propiedades frente a ligeros cambios en el ambiente, temperatura, luz, concentración salina o pH, entre otros. Este comportamiento puede ser utilizado en la preparación de estos sistemas.

Los sistemas de liberación inteligentes son capaces de reproducir el comportamiento propio de los sistemas biológicos, haciendo posible que se active o se module la liberación de un fármaco en respuesta a señales emitidas desde el exterior o por efecto de cambios en el entorno biológico.

Entre estos sistemas inteligentes, existe un interés creciente en el uso de polímeros sintéticos como agentes terapéuticos en los sistemas de dosificación de fármacos. El conjugado fármaco-polímero ofrece, por lo general, una mejora de la farmacocinética, presentando tiempos de circulación más largos y permitiendo ser dirigido específicamente hacia el tejido diana³²⁶. La elección de la molécula transportadora es muy importante porque, de esta dependerán las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco. El fármaco se puede incorporar al sistema por transporte pasivo o conjugación química.

El dispositivo (nanosistema o hidrogel) puede ser diseñado para responder ante una gran variedad de estímulos. A continuación se detallan los más utilizados:

Temperatura

Para preparar sistemas inteligentes se pueden utilizar materiales sensibles a la temperatura. La hidrosolubilidad de los polímeros convencionales se incrementa a medida que aumenta la temperatura, mientras que los polímeros termosensibles se mantienen hidratados y con las interacciones intra- e interpoliméricas minimizadas por debajo de su Temperatura Crítica de Disolución (LCST)³²⁷. Cuando se supera este valor crítico, los puentes de hidrógeno polímero-agua se destruyen, se intensifican las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas, y el agua se expulsa del entramado. La LCST es característica de cada polímero pero se puede incrementar o reducir introduciendo en su estructura grupos hidrofílicos o grupos hidrofóbicos³²⁸.

Se han ensayado diversos geles inteligentes termosensibles para aplicaciones en liberación de fármacos³²⁹. El más utilizado es la poli(N-isopropilacrilamida)(PNIPAM)³³⁰, aunque presenta la desventaja de que libera el fármaco a temperatura fisiológica, por lo que al entrar en contacto con el organismo el fármaco se liberaría en ocasiones sin haber alcanzado el lugar de acción. Para evitar esto, se recubre la PNIPAM con diferentes copolímeros, como la polietilenimina(PEI)^{331,332}, que hacen que se modifique su LCST. También se ha estudiado el uso de micelas poliméricas formadas por copolímeros anfifílicos, termosensibles y biodegradables³³³.

En el campo de la radioterapia, M. Hruby et al.³³⁴ desarrollaron un sistema termosensible, el cual precipita a temperatura corporal cuando se inyecta en un tejido afectado.

Respecto a las partículas porosas sensibles a la temperatura, la estrategia es tan simple como recubrir las mismas con una sustancia cuyo punto de fusión esté dentro del margen de temperatura que podemos aplicar. En este sentido, se han desarrollado partículas de sílice mesoporosas recubiertas con distintas sustancias que permiten la liberación de fármacos a temperaturas, dentro del rango fisiológico^{335,336,337,338}.

pH

Los polímeros sensibles al pH son polielectrolitos con grupos ácidos o básicos que aceptan o ceden protones en respuesta a cambios en el pH del medio³²⁶. Para dotar a las micelas poliméricas y a los hidrogeles de propiedades de liberación modulables por cambios de pH, se incorporan a su estructura polímeros con grupos ionizables³³⁹. La ionización genera fuerzas electrostáticas repulsivas que pueden conducir a la desestabilización del núcleo de la micela o, si se trata de un hidrogel, a un marcado incremento de volumen.

Los ácidos y bases débiles como los ácidos carboxílicos, el ácido fosfórico y las aminas respectivamente, muestran cambios en su estado de ionización bajo variaciones de pH. Esto conduce a un cambio conformacional del polímero soluble y a un cambio en el hinchamiento de los hidrogeles cuando los grupos ionizables están unidos a la estructura polimérica³⁴⁰.

Los monómeros clásicos utilizados con este fin son el ácido acrílico, el ácido metacrílico, el anhídrido maleico y el N, N-dimetilaminoetil metacrilato. Se han descrito polímeros que contienen derivados del ácido fosfórico^{341,342}. Más recientemente se ha publicado que funcionalizando quitosano con determinados copolímeros se pueden obtener nuevos polímeros o hidrogeles catiónicos o polianfóliticos con comportamiento pH dependiente que pueden tener una aplicación potencial en biomedicina³⁴³.

También se han desarrollado, en esta misma línea de trabajo, materiales mesoporosos con puertas sensibles cuyo mecanismo de apertura/cierre está controlado por cambios de pH. El grupo de Martínez-Mañez³⁴⁴ desarrolló un material híbrido a partir de sólidos mesoporosos MCM-41 y UVM-7 funcionalizados con poliaminas en el exterior y con grupos tiol en el interior. Este mismo grupo ha publicado otros materiales sensibles a pH cada vez más perfeccionados^{345,346}. Frasier y col.^{347,348} han desarrollado nanoválvulas basadas en rotaxanos y pseudorotaxanos con ciclodextrinas para el control de transporte de masa mediante cambios de pH.

Las aplicaciones más importantes de este tipo de polímeros en biomedicina son los sistemas de liberación de fármacos y sensores de glucosa³⁴⁹.

Luz

Las moléculas fotosensibles son aquellas que muestran cambios en sus propiedades como respuesta a un estímulo luminoso³⁵⁰. La incidencia de la luz puede producir cambios en su viscosidad, solubilidad, pH, conductividad, etc. En el proceso reversible de la

fotoisomerización se produce un cambio conformacional en el polímero, el cual causa un cambio en sus propiedades³²⁹.

Sus principales aplicaciones son como fotosensores, dispositivos de almacenamiento de información o como equivalente molecular de fotoprotectores en sistemas biológicos.

En el trabajo publicado por A. Suzuki y T. Tanaka³⁵¹ en 1990, se explica cómo se prepararon geles de N-isopropilacrilamida y un cromóforo sensible a la luz. Los resultados mostraron que el gel sensible a la luz se hincha en ausencia de esta, y se colapsa en presencia de luz visible. Este material marcó el inicio de una nueva estrategia terapéutica y actualmente se utilizan sistemas similares en la creación de músculos artificiales fotosensibles y dispositivos de memoria.

Los materiales mesoporosos que liberan el fármaco bajo efecto de cambios luminosos han sido y son ampliamente estudiados^{352,353}. El grupo de Fujiwara obtuvo una serie de materiales mesoporosos tipo MCM-41 funcionalizados con derivados de Cumarina los cuales, al ser irradiados con luz ultravioleta, se dimerizan intramolecularmente. El dímero es lo suficientemente voluminoso como para evitar, por impedimento estérico, la salida del fármaco contenido en el interior de los poros³⁵⁴⁻³⁵⁶. También se han obtenido otras puertas moleculares con control fotoquímico utilizando moléculas fotoisomerizables, como los azobencenos^{357,358,359} o moléculas que cambian de estructura y conformación como los espirobenzopiranos³⁶⁰.

Este tipo de materiales se emplea con frecuencia en la terapia contra el cáncer. En el trabajo realizado por Nikola Ž. Knežević³⁶¹, se muestra la utilidad de materiales mesoporosos cargados con

Camptotecina y funcionalizados con sulfuro de cadmio a través de enlaces fotoescindibles. Tras la exposición de estos a luz UV se libera Camptotecina, lo que disminuye la viabilidad de las células cancerosas. Debido tanto a su reacción ante la luz como a su actividad magnética proporcionada por el Cadmio, hacen de este un sistema idóneo para el tratamiento específico del cáncer.

Campo eléctrico

Otro de los estímulos externos que se ha utilizado en el desarrollo de materiales inteligentes son los movimientos de electrones. Las moléculas electro sensibles son aquellas que sufren cambios reversibles en alguna de sus propiedades tras la aplicación de un campo eléctrico externo controlado³²⁹. Los materiales con grupos funcionales, que se puedan romper en presencia de moléculas con propiedades redox, son idóneos para preparar estos sistemas.

Estos se pueden clasificar en dos grandes grupos en función de su principio de funcionamiento³⁶². Los materiales electrónicos se basan en la fuerza electrostática, incluyendo los elastómeros y los polímeros ferroeléctricos. Los materiales iónicos requieren una carga eléctrica y un transporte de masa para lograr el efecto electromecánico, entre los que podemos destacar los polímeros conductores, los nanotubos de carbono y los IPMC (Ionic Polymer Metal Composites).

Estos materiales electroactivos se utilizan para la fabricación de actuadores³⁶³, músculos biológicos³²⁹ y nanopartículas. Las nanopartículas con puerta sensible a electrones, pueden ser utilizadas para la liberación de sustancias en el interior de la célula, ya que en el citoplasma hay muchas reacciones redox. El grupo del profesor Zhang³⁶⁴,

ha publicado recientemente una nanoplataforma poliprofármaco utilizando Camptotecina-polietilenglicol como fármaco modelo. Tanto *in vitro* como *in vivo* las nanopartículas alcanza su diana terapéutica y la carga se libera en respuesta a estímulos redox, produciendo una respuesta muy rápida.

Campo magnético

Los materiales magnetoactivos se preparan mediante dispersión coloidal de partículas magnéticas con un tamaño típico aproximado de 10 nm³²⁹. Los ferrogeles, así como las partículas magnéticas, se forman introduciendo magnetita en el material, lo que provoca que el sistema se vuelva sensible a campos magnéticos externos³⁶⁵.

En un estudio llevado a cabo por Reséndiz-Hernández y col.³⁶⁵, se vio que los ferrogeles de polivinilalcohol(PVA)-magnetita presentan propiedades supermagnéticas, lo cual es útil para los sistemas de liberación de fármacos y diseño de músculos artificiales. Otros estudios, proponen el uso de ferrogeles bifásicos con propiedades mejoradas respecto a los anteriores, entre las que destacan menor toxicidad, por contener menor contenido en óxido de hierro, y menor tamaño. También presentan mayor porosidad, una mayor deformación y todo esto sin aumentar el tamaño del gel. Por estas características son útiles para liberación tanto de fármacos como de células, siendo su nuevo campo de actuación las terapias regenerativas³⁶⁶.

Reconocimiento molecular

Los geles de reconocimiento molecular, son aquellos que sufren un cambio de hinchamiento y contracción cuando identifican una sustancia química específica, como un catalizador o enzima^{367,368}. Las partículas con puertas susceptibles de apertura/cierre por reconocimiento molecular están constituidas por el sustrato de una enzima, por un antígeno o por una cadena de ADN. Cuando las micro o nanopartículas entran en contacto con la enzima correspondiente, el anticuerpo o la cadena complementaria de ADN produce la apertura de la puerta y consecuente liberación del fármaco³⁶⁹⁻³⁷⁸. En un estudio llevado a cabo en 2012 por el grupo Martínez-Mañez³⁷⁷, se comprobó el correcto funcionamiento de una de estas partículas mesoporosas combinadas con un anticuerpo de reconocimiento frente a la Finasterida. En el interior de las partículas se encontraba el colorante Rodamina B. Al incorporar las partículas a una solución que contenía Finasterida, se producía la apertura de los poros y la liberación del colorante.

Se han desarrollado sistemas que, a semejanza de los receptores biológicos, las enzimas o los anticuerpos, pueden adoptar conformaciones específicas para formar centros activos que actúan como puntos de anclaje selectivo³⁷⁹. De esta manera, este polímero inteligente presentará una afinidad por las moléculas de fármaco, mejor y más específica que el polímero convencional de la misma composición.

1. Aplicaciones de los sistemas inteligentes

Las patologías intestinales presentan tratamientos convencionales, en los que a menudo se reportan efectos tóxicos y formación de resistencias. Para evitar estas situaciones, así como mejorar las características biofarmacéuticas de los fármacos, se están estudiando nuevas formulaciones basadas en la encapsulación de fármacos en hidrogeles o partículas (nano o micropartículas).

Existen diversos estudios que demuestran el éxito que supone la aplicación de las nuevas formulaciones en tratamientos contra las patologías gastrointestinales más comunes.

En *Salmonella*, se vio que creando híbridos con las nanopartículas tradicionales de plata y los nanodispositivos de silicio, además de conseguir el control de la infección, se lograba reducir la acumulación de plata en los tejidos, mejorando la seguridad de este³⁸⁰.

La sobreexpresión de CD98, en la superficie de las células y macrófagos epiteliales del colon, promueve el desarrollo y la progresión de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Se realizó un estudio con el objetivo de reducir los niveles de CD98 en el colon de ratones con colitis³⁸¹. Para ello se desarrolló un hidrogel de administración oral que libera nanopartículas, las cuales tienen anticuerpos CD98 de cadena sencilla en su superficie.

En el ámbito del diagnóstico de parasitosis, también se está empleando la nanotecnología. Los métodos tradicionales de detección de los patógenos, basados en técnicas microscópicas, se mejoraron gracias a la PCR y a los inmunoensayos, que permitían una mayor sensibilidad y

especificidad en el diagnóstico. Sin embargo, estos métodos tienen una aplicabilidad limitada debido al coste de los reactivos necesarios para llevar a cabo las pruebas, la infraestructura necesaria y la necesidad de formación de personal especializado. Recientemente, se ha descrito un nuevo método diagnóstico basado en la detección colorimétrica utilizando nanopartículas de oro. Las nanopartículas se marcaron con una proteína con capacidad de inducir la amplificación del mRNA del parásito mediante un proceso simple basado en aplicación de calor y, de esta manera, se consiguió la detección de quistes de *Cryptosporidium parvum*. Esta técnica es muy visual para el operario (cambio de color), y para llevarla a cabo se emplean reactivos de menor coste que los tradicionales, los cuales están dando buenos resultados en diagnóstico molecular³⁸².

Respecto al tratamiento de patologías producidas por parásitos, se han probado terapias contra la malaria. La encapsulación del antimalárico Tafenoquina, ha permitido una mejora en la solubilidad, biodisponibilidad y eficacia del fármaco, proporcionando por tanto, un tratamiento mejorado en el que disminuyó la toxicidad con respecto a las formulaciones convencionales³⁸³. En el campo de la leishmaniosis, los tratamientos habituales se consideran insatisfactorios, debido principalmente, a la elevada toxicidad producida y a las numerosas resistencias que están apareciendo. En un estudio se vio que administrando Anfotericina B, usando la técnica del complejo polielectrolito, se conseguía disminuir la toxicidad asociada al tratamiento tradicional³⁸⁴. En este contexto, surge la necesidad de nuevas formulaciones basadas en tecnología reciente.

Introducción

En ese sentido, los estudios publicados avalan la idoneidad de diseñar y obtener nuevos sistemas terapéuticos para mejorar la eficacia y especificidad de las terapias convencionales.

IV Material y Métodos

A. Compuestos ensayados

1. Soluciones de fármacos

Para la realización de este trabajo se seleccionaron un total de 14 fármacos. Un primer grupo está constituido por 3 fármacos de referencia en los estudios de permeabilidad utilizados como control para validar el sistema presentado (Metoprolol, Rodamina y Lucifer Yellow). Las principales características se describen brevemente en la tabla 4.1.

Fármaco modelo	Utilidad
Metoprolol	Patrón utilizado para clasificar los compuestos en alta o baja permeabilidad según el BCS. Marcador de absorción pasiva.
Rodamina	Sustrato selectivo de glicoproteína-P Colorante fluorescente hidrófilo con carga positiva.
Lucifer Yellow	Marcador de transporte paracelular.

Tabla 4.1. Fármacos modelo y utilidad en el estudio

Un segundo grupo de fármacos está constituido por fármacos de **uso pediátrico** seleccionados por ser de elección en patologías frecuentes en la población infantil o por poder presentar serios riesgos si se ve afectada (por exceso o por defecto) la fracción absorbida.

El **Metronidazol** se escogió por ser el fármaco de elección en el tratamiento de la giardiasis.

Material y Métodos

Las concentraciones ensayadas de cada fármaco se seleccionaron por disolverse fácilmente en HBSS y por obtener resultados reproducibles según el método de valoración utilizado.

En la tabla 4.2, se muestran las concentraciones y propiedades físico-químicas de los compuestos ensayados.

Compuesto	Propiedades FQ			Concentración
	PM(g/mol)	logP	pKa	
Amoxicilina	365,40	-2,3	pKa _a =3,23 pKa _b =7,43	100 μM
Carbamazepina	236,269	2,77	pKa _a =15,96 pKa _b =-3,8	100 μM
Cefadroxilo	363,389	-2,4	pKa _a =3,45 pKa _b =7,43	100 μM
Diazepam	284,7	3,08	3,4	100 μM
Fenobarbital	232,235	1,41	7,3	100 μM
Ibuprofeno	206,29	3,84	4,91	100 μM
Isoniazida	137,139	-0,69	pKa _a =13,61 pKa _b =3,35	100 μM
Lucifer-Yellow	444,24	-4,44	0,7	2000 μM
Metoprolol	267,36	1,88	pKa _a =14,09 pKa _b =9,67	100 μM
Metronidazol	171,154	-0,46	pKa _a =15,44 pKa _b =3,09	1 mg/mL
Paracetamol	151,163	0,91	pKa _a =9,46 pKa _b =-4,4	100 μM
Quinidina	324,42	2,51	pKa _a =13,89 pKa _b =9,05	100 μM
Rifampicina	822,94	2,77	pKa _a =6,9 pKa _b =-7,53	100 μM
Rodamina	479,01	6,82	6,13	5,5 μM

Tabla 4.2. Concentraciones y propiedades físico-químicas de los compuestos ensayados³⁸⁵.

2. Nuevas formulaciones para el tratamiento de la giardiasis

2.1. Hidrogel inteligente de Glicol Chitosan cargado con Metronidazol

2.1.1. Preparación y caracterización del polímero: Glicol Chitosan (GC)

Degradación ácida de Glicol Chitosan

La degradación ácida tiene como objetivo reducir el peso molecular del polímero. A mayor tiempo de degradación, menor peso molecular³⁸⁶.

La degradación ácida del Glicol Chitosan (GC) se llevó a cabo según lo descrito previamente³⁸⁷. Se disolvió el Glicol Chitosan (5 g) en Ácido clorhídrico (HCL) (4 M, 380 mL). Se colocó la solución en un baño precalentado a 50°C. A las 3 y 5 horas se paró la reacción y se retiró el producto del baño. Esto dio lugar a dos soluciones: una solución de Glicol Chitosan cuya reacción de degradación fue interrumpida a las 3 horas del comienzo (3HGQ); y una solución de Glicol Chitosan cuya reacción de degradación fue interrumpida a las 5 horas tras el comienzo (5HGC).

El producto se purificó mediante diálisis (Visking Tubing, molecular weight cut off = 12-14 kDa for cytochrome C) contra agua desionizada (5 L), realizando 6 cambios de agua durante 24 horas.

El producto obtenido de la diálisis (pH neutro) fue liofilizado a continuación (modulo Edwards -50°C).

Determinación de la curva de valoración potenciométrica.

Se realizó disolviendo 25 mg del polímero (3HGC y 5HGC) en 5 mL de una solución 0,1M de Ácido clorhídrico (HCL). A continuación se adiciona lentamente el agente valorante NaOH 0,1 M sobre la solución del polímero, en continua agitación. Se registró el volumen de valorante añadido a la solución y el pH resultante tras cada unidad de volumen adicionada. El ensayo se realizó a temperatura ambiente. Esta medida permite determinar el pK_a del polímero.

Espectroscopía 1H RMN y COSY

1H RMN y COSY (Bruker AMX 400 MHz spectrometer, Bruker Instruments, UK) del Glicol Chitosan degradado, se realizaron en D_2O (range c.a. 6.4 mg mL^{-1} to 10 mg mL^{-1})³⁸⁷.

2.1.2. Conjugación del tetrapéptido (sensible a Catepsina) con el polímero Glicol Chitosan (5HGC). Caracterización.

Para conseguir el polímero modificado (GC5H-VV-GFLG-X1) se hizo reaccionar el polímero 5HGC con el tetrapéptido Glicina-Fenilalanina-Leucina-Glicina (Gly-Phe-Leu-Gly) con anhídrido succínico y el éster de N-hidroxisuccinimida.

Reacción del péptido con anhídrido succínico

En primer lugar se llevó a cabo la preparación del tampón fosfato (50 mM, pH=7), para disolver el péptido; y la preparación de la solución de NaOH (2 M) para el ajuste posterior de pH.

Se disolvió el péptido GFLG (4 mg) en tampón fosfato (10 mL) (pH=7) en constante agitación. Se añadió directamente el anhídrido succínico (18 mg) a la solución del péptido. Se controló el pH de la solución (pH=7,6) en cada momento añadiendo NaOH cuando el pH descendía de este valor. El pH se estabilizó después de 5 horas. La solución se mantuvo en agitación toda la noche.

Reacción del polímero (5HGC) con el éster de N-hidroxisuccinimida

Glicol Chitosan (41,4 mg) se disolvió en tampón fosfato. Se añadió N-Hidroxisuccinimida (NHS) (98%, 318,9 mg). Se ajustó el pH a 8. Se mezcló la solución del péptido con la del polímero y se mantuvo en un baño a 37°C durante 3 días. Se observó la aparición de precipitado.

El producto se purificó mediante diálisis (Visking Tubing, molecular weight cut off = 3-5 kDa membrane) contra agua desionizada (5 L) con 6 cambios de agua durante 72 horas, bajo agitación.

Se centrifugó la muestra a 4000 rpm durante 8 minutos (Jouan B4i/BR4i series de Thermo Electron). El pellet y el sobrenadante formados tras la centrifugación se liofilizaron por separado (modulo Edwards -50°C).

La muestra de *5HGC modificado* se caracterizó mediante *Espectroscopía ¹H RMN* y *COSY S* mediante el procedimiento descrito previamente

2.1.3. Carga del polímero modificado (GC5H-VV-GFLG-X1) con Metronidazol

Tras llevar a cabo la conjugación del polímero y el péptido, y su centrifugación, se obtiene un pellet y un sobrenadante. Ambos se cargan de fármaco para comprobar qué parte es la más cargada.

- pellet: Se disolvió Metronidazol (1 mg) y liofilizado 1 (4mg) en 1 mL de tampón fosfato (pH= 7,6). La mezcla se agitó en un vortex, y se sometió a sonicación (Ultrasonic procesor SciMED, 1ciclo, 40% amplitud) durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. Se midió el tamaño de partícula y el potencial zeta del sobrenadante (*ZETASIZER Nano Series, Nano Zeta. Malvern Instruments*).
- sobrenadante: Se disolvió Metronidazol (1 mg) y liofilizado 2 (4 mg) en 1 mL de tampón fosfato (pH= 7,6). La mezcla se agitó en un vortex y se sonicó (Ultrasonic procesor SciMED, 1 ciclo, 40% amplitud) durante 15 minutos. Seguidamente, se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. A continuación se midió el tamaño de partícula y el potencial zeta del sobrenadante al igual que se hace con el pellet.

2.1.4. Purificación de las muestras de Metronidazol

Las muestras obtenidas se filtraron en tubos milipore. Se añade la muestra (1 mL) y se centrifuga (4000rpm, 5 minutos) hasta que quedan 100 μ L sobre el filtro, entonces se añade 500 μ L de agua y se repite la centrifugación hasta que la muestra sobre el filtro vuelve a ser 100 μ L. Una vez desechado el Metronidazol no encapsulado se obtiene el gel. El siguiente mapa conceptual reproduce el esquema de trabajo (figura 4.1.).

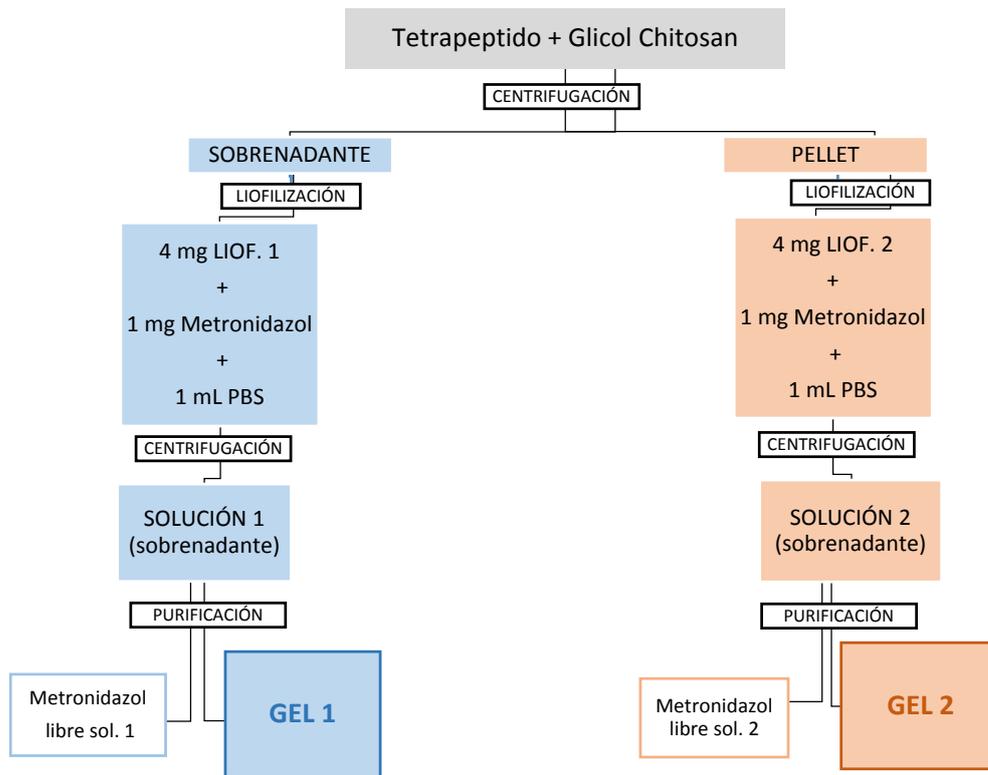


Figura 4.1. Esquema del proceso de carga del hidrogel con Metronidazol.

De manera similar se obtuvo un gel no cargado que se utilizó como control.

2.2. Micropartículas mesoporosas de sílice con puerta molecular pH dependiente para control biológico de *Giardia intestinalis*

2.2.1. Reactivos y disolventes

Para la síntesis de los materiales mesoporosos microparticulados, el tetraetilortosilicato (TEOS), el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y la trietanolamina (TEAH₃) fueron suministrados por Aldrich. El hidróxido de sodio (NaOH) se adquirió en Scharlab. Para la funcionalización de la superficie de los materiales mesoporosos se utilizó la N'-(3-trimetoxisilil)propil dietilentriamina y para la carga de las micropartículas se utilizó Safranina O (para poner a punto el sistema) o Metronidazol. Todos los productos se adquirieron en Aldrich y en Scharlab y se emplearon sin usar ningún método de purificación.

2.2.2. Síntesis del sólido MCM-41 microparticulado.

Para el desarrollo de las micropartículas, se ha seleccionado como soporte una sílice mesoporosa tipo MCM-41. La síntesis del soporte se lleva a cabo siguiendo la denominada “ruta de los atranos”, basada en el uso de complejos que incluye ligandos relacionados con la trietanolamina como precursor inorgánico y un surfactante como agente director de la estructura³⁸⁸.

La relación molar entre los distintos reactivos empleados en la síntesis está fijada en 7 TEAH₃: 2 TEOS: 0,52 CTAB: 0,5 NaOH: 180 H₂O.

En una síntesis típica, se añaden 0,98 gramos de NaOH disueltos previamente en 2 mL de H₂O, a 52,4 gramos de trietanolamina en agitación. La mezcla se calienta hasta que se alcanzan 120°C y posteriormente se deja bajar la temperatura hasta 70°C. En ese momento, se añaden 22 mL de TEOS (98 mmoles) y de nuevo se calienta la mezcla hasta 118°C. A continuación, se adicionan lentamente 9,26 gramos de CTAB que actuará como agente director de la estructura. Una vez disuelto, la mezcla se deja enfriar hasta 70°C y se adicionan lentamente 180 mL de H₂O. Pasados unos minutos, se observa la formación de una suspensión blanquecina. La mezcla se deja envejecer a temperatura ambiente durante una hora y se coloca, a continuación, en un autoclave de teflón y se deja envejecer en una estufa a 100°C durante 18 horas. El material obtenido se recoge por centrifugación y se lava con abundante agua hasta alcanzar pH neutro. Finalmente, el material MCM-41 mesoestructurado obtenido, se deja secar en estufa a 70°C durante 24 horas. Posteriormente, se elimina el surfactante mediante calcinación en aire a temperaturas de 550°C, consiguiendo de esta manera que los poros del material queden libres y vacíos.

2.2.3. Preparación sólido MCM-Met-N₃

En una síntesis típica, 68,5 mg (0,4 mmol) de Metronidazol se suspenden en 15 mL de acetonitrilo. Una vez está totalmente disuelto, se añaden 0,5 g de MCM-41 calcinada dejando la mezcla en agitación durante 24 horas con el fin de que el fármaco difunda hacia el interior de los poros produciéndose así el cargado de los poros. A continuación, se añade sobre la mezcla un exceso de N'-(3-trimetoxisilil)propil dietilentiamina (2,5 mL, 7,5 mmol) y la suspensión se deja 6 horas en

agitación. Durante el proceso de anclado, una fracción importante de los grupos poliamina estarán preferentemente anclados a la salida de los poros ya que se encuentran llenos de fármaco. Finalmente, el sólido obtenido se filtra a vacío y se lava a continuación con agua ajustando el pH a un valor de 2 con H_2SO_4 .

2.2.4. Preparación sólido MCM-Saf- N_3

Se resuspenden 0,5 g de MCM-41 calcinada y 140 mg (0,4 mmol) de safranina O en 15 mL de acetonitrilo, dejando la mezcla en agitación durante 24 horas con el fin de que se produzca el cargado de los poros. A continuación, se añade sobre la mezcla un exceso de N'-(3-trimetoxisilil)propil dietilentriamina (2,5 mL, 7,5 mmol) y la suspensión se deja 6 horas en agitación. Finalmente, el sólido obtenido se filtra a vacío y se lava a continuación con agua ajustando el pH a un valor de 2 con H_2SO_4 .

2.2.5. Caracterización

La caracterización de los materiales se ha llevado a cabo mediante técnicas estándar de la química del estado sólido, como son la difracción de Rayos-X de polvo, la termogravimetría y la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los termogramas para las distintas muestras sólidas se obtuvieron en una termobalanza TGA/SDTA 851e Mettler Toledo. Las muestras se sometieron a una rampa de calentamiento de $10^\circ C$ por minuto, desde $25^\circ C$ hasta $1000^\circ C$, manteniendo a continuación una isoterma a $1000^\circ C$ durante una hora, todo ello en atmósfera de aire y crisoles de alúmina. Las medidas de RX se llevaron a cabo en un difractómetro Bruker axs D8 Advance, utilizando

radiación $\text{CuK}\alpha$ con un programa con un intervalo de barrido $0,73^\circ < 2\theta < 10^\circ$. Además, los espectros de ^1H RMN fueron obtenidos en un equipo Bruker AV400 empleando como señal de referencia la del correspondiente disolvente deuterado, en este caso agua deuterada.

2.2.6. Ensayo de viabilidad

El ensayo de viabilidad se llevó a cabo con tres protocolos distintos en placas de 6 pocillos.

El primer protocolo consistió en adicionar *Giardia intestinalis* (400.000 trofozoítos/pocillo) y mantenerlos durante 2 horas en incubación para permitir la adhesión del parásito a la base de los pocillos. Se adicionó en los pocillos, una solución control o una suspensión de micropartículas (2 mg/mL) cargadas con Metronidazol. A los tiempos prefijados se despegaron los parásitos con hielo y se realizó el recuento de los mismos mediante cámara Neubauer.

El segundo procedimiento consistió en crecer monocapas de células Caco-2 en la base de las placas durante 21 días. Pasados esos días se añadieron 400.000 giardias/pocillo y se mantuvieron en co-incubación durante 2 horas. Posteriormente se añadió la suspensión de micropartículas de Metronidazol (2 mg/mL). Pasadas 24 horas se observaron las monocapas con el microscopio óptico. Como control se utilizaron pocillos con la monocapa de Caco-2 pero no se les adicionó la suspensión de micropartículas de Metronidazol.

El tercer procedimiento consistió en crecer monocapas de células Caco-2 en los insertos de las placas durante 21 días (como para la realización de los ensayos de permeabilidad). Pasados esos días se

añadieron 400.000 giardias/pocillo y se mantuvieron en co-cultivo durante 2 horas. Posteriormente se añadió la suspensión de micropartículas de Metronidazol (2 mg/mL). Como control se utilizaron pocillos en cuyos insertos había crecido la monocapa Caco-2 y, posteriormente se había adicionado *Giardia* pero no micropartículas. Pasadas 24 horas se midió el TEER de las monocapas en todos los pocillos.

B. Condiciones experimentales

1. Cultivo de *G. intestinalis*

Se emplearon trofozoítos de *Giardia* de la cepa ATCC 30957, cultivados en medio TYI-S enriquecido con un 10% de suero bovino fetal y a pH 7. La esterilización se realizó mediante filtración por filtros de 0,22 μm . La composición del medio se describe en la tabla 4.3.

Para el cultivo, se prepararon tubos redondos de 25 mL, a los que se añadieron $2 \cdot 10^6$ trofozoítos, y medio de cultivo hasta condiciones de microaerofilia, manteniéndose en estufa a 37°C. En estas condiciones los trofozoítos se disponen adheridos a la superficie interna de los tubos. Para el mantenimiento de los cultivos se realizaba un cambio de medio cada 3-4 días.

Para la preparación de los inóculos de *Giardia* para los correspondientes ensayos, es necesario despegar los trofozoítos de las paredes de los tubos, para ello, los tubos se disponen en baño de hielo durante 10-20 minutos y a continuación se centrifugan a 1500 rpm

durante 5 minutos. Finalmente el pellet se resuspende en el tampón correspondiente según el ensayo y se procede al recuento de los trofozoítos en la cámara de Neubauer, para ajustar la dosis de inóculo.

Compuesto	Cantidad
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
NaCl	1 g
Extracto de levadura	30 g
Bilis bovina	0,5 g
glucosa	10 g
L-cysteina HCl	2 g
Ac. Ascórbico	0,2 g
Citrato férrico amónico	0,022 g
Vitaminas Diamond	10 mL
Penicilina	0,1 g
Estreptomina	0,1 g
Suero bovino fetal	100 mL
H ₂ O destilada	c.s.p. 1000 mL

Tabla 4.3. Componentes del medio TYI-S modificado.

2. Ensayo en animales

2.1. Diseño del ensayo

2.1.1. Ensayo de absorción *in situ* de fármacos en disolución

Los experimentos de absorción *in situ* se realizaron con el objetivo de conocer los valores de permeabilidad de los fármacos en distintas condiciones.

El estudio de absorción intestinal se llevó a cabo en duodeno. El ensayo se realizó en dos condiciones:

- En ausencia de *G. intestinalis* (control).
- En presencia de *G. intestinalis*. Para ello se inocularon a la rata, $2 \cdot 10^6$ giardias, 2 horas antes del ensayo.

2.1.2. Ensayo de absorción *in situ* de fármaco liberado del hidrogel

Se llevaron a cabo estudios para el desarrollo de nuevas formulaciones orales en el tratamiento de la giardiasis. Se ensayó un gel de Metronidazol con el objetivo de que el fármaco llegara inalterado al lugar de acción de *G. intestinalis*. Las ratas fueron inoculadas con una suspensión de $2 \cdot 10^6$ giardias.

Los experimentos de liberación del gel terapéutico *in situ* se llevaron a cabo para comprobar su eficacia. Se realizaron con Metronidazol libre, en ausencia y en presencia del parásito (control), y con Metronidazol encapsulado en el hidrogel inteligente de Glicol Chitosan, en ausencia (blanco) y en presencia de *G. intestinalis*.

2.2. Animales de experimentación

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron ratas albinas macho de raza Wistar procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid. Actualmente es una de las razas de ratas más populares utilizadas para los estudios de absorción de fármacos en laboratorio.

Se caracteriza por su cabeza ancha, orejas largas, y una longitud de cola que es siempre inferior a la longitud de su cuerpo. Es una rata con buena tasa de crecimiento, dócil y fácil de manipular. Para los ensayos se seleccionaron animales con edades entre dos y tres meses. Se

mantienen en perfectas condiciones de higiene y climatización y reciben una dieta equilibrada. El animal se somete a un período de ayuno de 4 horas antes del ensayo, permitiéndole el acceso libre a agua para garantizar su hidratación. Tras el ayuno, su peso oscila entre 250 y 320 gramos.

2.3. Soluciones de trabajo

A continuación se describen las soluciones empleadas en los ensayos *in situ*.

2.3.1. Solución anestésica

Antes de comenzar los ensayos de perfusión *in situ*, es necesario proporcionar al animal anestesia general profunda para realizar la intervención quirúrgica. Para ello se utilizó una solución de Pentobarbital sódico (Eutanax inyectable) preparada a la concentración de 200 mg/mL.

Para facilitar la administración de la anestesia, por vía intraperitoneal, se empleó una solución de Pentobarbital sódico preparada a partir del inyectable comercial (Eutanax inyectable) en proporción 1:10 en agua destilada. De esta solución se administra una dosis de 0,15 mL por cada 100 gramos de peso del animal, lo que equivale a 30 mg de Pentobarbital sódico por kg de animal.

2.3.2. Soluciones de lavado intestinal

Solución de lavado A

La solución de lavado A es un preparado isotónico que permite eliminar restos de quimo que pudieran quedar en la luz intestinal. Su composición se muestra en la tabla 4.4.

Compuesto	Cantidad
NaCl	9,00 g
KCl	0,34 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,19 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O c.s.p.	0,76 g
H ₂ O destilada	1 L

Tabla 4.4. Componentes de la solución de lavado A.

Solución de lavado B

La solución de lavado B se emplea para acondicionar la mucosa intestinal antes de realizar los ensayos de absorción. La composición de esta solución es un preparado de suero fisiológico regulado a pH 7,00 mediante una solución de tampón fosfato según *Sørensen* a razón de 10 mL de tampón por litro de solución. La composición de esta, se muestra en la tabla 4.5.

Compuesto	Cantidad
NaCl	9,00 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 1/15 M	3,9 mL
Na ₂ HPO ₄ 1/15 M	6,1 mL
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 4.5. Componentes de la solución de lavado B.

2.3.3. Soluciones de perfusión

Ensayo de absorción

Los compuestos se disolvieron en solución de lavado B en las mismas concentraciones que en el ensayo *in vitro*, tales se muestran en la tabla 4.6.

Compuesto	Concentración
Amoxicilina	100 μ M
Carbamazepina	100 μ M
Cefadroxilo	100 μ M
Diazepam	100 μ M
Fenobarbital	100 μ M
Ibuprofeno	100 μ M
Isoniazida	100 μ M
Lucifer-Yellow	2000 μ M
Metoprolol	100 μ M
Paracetamol	100 μ M
Quinidina	100 μ M
Rifampicina	100 μ M
Rodamina	5,5 μ M

Tabla 4.6. Concentraciones de las soluciones de fármaco empleadas en los estudios de absorción, tanto *in vitro* como *in situ*.

Ensayo *in situ* del hidrogel

Las soluciones de perfusión del ensayo *in situ* del hidrogel se muestran en la tabla 4.7.

Solución Metronidazol libre	Cantidad
Solución Metronidazol (1mg/mL)	100 µL
HBSS + 2% D-glucosa	4 mL
Solución gel 1	Cantidad
Gel 1 de Metronidazol	200 µL
HBSS + 2% D-glucosa	4 mL
Solución gel 2	Cantidad
Gel 2 de Metronidazol	200 µL
HBSS + 2% D-glucosa	4 mL

Tabla 4.7. Componentes de las soluciones empleadas para el ensayo *in situ* del hidrogel.

2.4. Técnica experimental en duodeno

La técnica de experimentación utilizada es una modificación de la propuesta por Doluisio y colaboradores²⁶⁰.

En primer lugar se procede a anestesiarse al animal con Pentobarbital sódico por inyección intraperitoneal. La anestesia provoca un estado de relajación muscular generalizado que puede llevar a hipotermia, para evitar que esto ocurra se coloca el animal bajo una lámpara que le suministre calor. Tras comprobar que ha alcanzado el grado de anestesia profunda necesario mediante la observación del cese del reflejo palpebral, se coloca en posición decúbito supino sobre el tablero quirúrgico y se inmoviliza por las extremidades con cinta adhesiva sin que adquiera una posición forzada. El grado de anestesia se comprueba frecuentemente a lo largo de la cirugía y toma de muestras para evitar el sufrimiento animal.

El primer paso del procedimiento quirúrgico consiste en descubrir la cavidad abdominal mediante sección de la piel. Se utilizan unas pinzas en forma de diente de ratón para sujetar la piel y unas tijeras de punta roma para realizar la incisión. La incisión se realiza desde 2 cm por encima del poro genital, en forma de diagonal, hasta 1 cm del apéndice xifoides. A continuación se separan los rectos abdominales cortando por la línea alba para minimizar el sangrado. En segundo lugar y tras abrir la cavidad abdominal, se procede a la localización del duodeno. En este desemboca el conducto biliar el cual debe ligarse, con la ayuda de un hilo, para evitar la entrada de secreción biliar al intestino y así evitar la aparición de un ciclo enterohepático. Una vez abierta la cavidad abdominal, se localiza el duodeno, en el que desemboca el conducto biliar. Este conducto debe ligarse con ayuda de un hilo de seda, para evitar el paso de la secreción biliar al intestino y la aparición de un posible ciclo enterohepático.

A continuación, se practica un pequeño corte en bisel en el extremo duodenal. Se introduce la punta de una cánula de vidrio acodada y se fija al intestino. El otro extremo de la cánula se conecta mediante un tubo de polietileno, a una llave de tres pasos tipo Stopcock (esquemática en la figura 4.2). A su vez, ésta encaja a rosca con una jeringa de 2 mL de capacidad, sujeta mediante una pinza a un soporte vertical.

Jeringa-exterior
Permite el paso de solución o aire desde la jeringa al exterior.

Jeringa-intestino
Permite el paso de solución o aire desde la jeringa al intestino o viceversa.

Intestino-exterior
Permite el paso de solución o aire desde el intestino al exterior.



Figura 4.2. Esquema de las tres posiciones de la llave de tres pasos de tipo Stopcock

Posteriormente, se localiza el otro extremo del duodeno y se efectúa una incisión de forma que se proceda sin dificultad a la limpieza de la mucosa, pues para que el ensayo sea reproducible es necesario evitar la obstrucción en las cánulas. La limpieza se realiza con la ayuda de una jeringa conectada a la cánula, a través de la que pasará solución de lavado A o B a 37°C tantas veces como sea necesario hasta que la mucosa quede libre de residuos y sales biliares. En primer lugar, se utiliza la solución de lavado A, para eliminar restos sólidos, y se finaliza la limpieza con solución de lavado B que acondiciona la mucosa y restaura el pH de la zona.

Una vez finalizado el lavado, se conecta otra cánula en el extremo final y esta se une a una llave de tres pasos y a otra jeringa. Todo el conjunto se sujeta a un soporte vertical con la ayuda de unas pinzas. Es importante eliminar los restos de solución de lavado, para evitar que se

diluya la solución de fármaco, cuando entre en contacto con el intestino. Para ello, se bombea aire a través del intestino en ambas direcciones, con precaución de no ejercer demasiada presión sobre el émbolo. Si la presión fuera demasiado alta, podrían aparecer alteraciones en la mucosa y a nivel de perfusión sanguínea.

Durante el procedimiento se debe vigilar la posible desecación de la cavidad abdominal. Esta deshidratación puede incrementar la reabsorción de agua y, por lo tanto, aumentar la concentración de la solución perfundida. Por otra parte, la disminución de la temperatura corporal local puede conducir a un descenso reflejo del flujo sanguíneo mesentérico y, en ocasiones, a una disminución en la velocidad de absorción. Para evitar este problema, se vierte en la cavidad abdominal pequeños volúmenes de suero fisiológico atemperado a 37°C y se cubre con una torunda de algodón empapada en el mismo líquido.

2.4.1. Ensayos de absorción de fármacos en presencia y ausencia de *G. intestinalis*

En las ratas destinadas al ensayo de absorción con *G. intestinalis*, el parásito se añadió 2 horas antes de la perfusión de la solución de fármaco a estudio. Trascorrido ese tiempo, se perfunden 2 mL de la solución de fármaco a ensayar atemperada a 37 °C. Se realizaron en paralelo ensayos de absorción de los mismos fármacos en ausencia de *G. intestinalis*. Cuando toda la solución está en el interior del duodeno se colocan las llaves en posición jeringa-exterior y el intestino se convierte en un compartimento estanco. A partir de ese momento empieza a contar el tiempo de ensayo.

Para tomar las muestras se colocan las dos llaves en posición jeringa-intestino. Se toma aire con el émbolo de la jeringa opuesta al muestreo y se introduce en el intestino pudiendo ver como la solución asciende por la otra jeringa, por la cual se toma la muestra. Tras esto se vuelve a introducir la solución en el intestino a la mayor brevedad. La toma de muestras se realiza cada 5 minutos alternativamente por cada una de las jeringas. La primera muestra se toma por la jeringa distal y la última, por la proximal. Se recoge un total de 6 muestras (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min) de 100 μ L de solución cada una.

2.4.2. Ensayo de absorción de Metronidazol encapsulado en la forma hidrogel

Para llevar a cabo el ensayo de absorción de Metronidazol encapsulado se definieron 4 condiciones de ensayo: a) Metronidazol en solución libre en ausencia de *G. intestinalis*, b) Metronidazol en solución libre en presencia de *G. intestinalis*, c) Metronidazol encapsulado en el hidrogel inteligente en ausencia de *G. intestinalis* y d) Metronidazol encapsulado en el hidrogel inteligente en presencia de *G. intestinalis*.

En las ratas destinadas al ensayo con *G. intestinalis*, el parásito también se incorporó en el intestino 2 horas antes de la adición de la formulación. El ensayo se lleva a cabo de manera similar al descrito anteriormente. Se perfunden 2 mL de la formulación a ensayar atemperada a 37 °C. Cuando toda la formulación esté dentro del duodeno se contabiliza el comienzo del ensayo. La toma de muestras se realiza cada 15 minutos alternativamente por cada una de las jeringas. La primera muestra se toma por la jeringa distal y la última, por la proximal. Se toma muestra hasta las 2 horas. Se recoge un total de 7-8 muestras (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 min) de 100 μ L de solución cada una.

2.5. Ensayo de reabsorción de agua

Existe un proceso de reabsorción de agua simultáneo al proceso de absorción de la sustancia ensayada de modo que la solución remanente en lumen se concentra y puede quedar falseado por exceso³⁸⁹. Con el fin de estimar las concentraciones reales de compuesto se calculó el volumen remanente a cada tiempo de toma de muestra.

Después de tomar la última muestra se lleva a cabo el ensayo de reabsorción de agua. Para ello se desconecta la cánula de la jeringa del final del duodeno y se coloca en un tubo de centrifuga de 15 mL. Con la jeringa que queda conectada, se ejerce presión para extraer el líquido remanente a través de la cánula. Seguidamente se corta el mesenterio y se separa el asa intestinal del resto del animal. Una vez aislado el intestino, se presiona desde el principio hasta el final asegurando que se vacíe completamente. Finalizado el ensayo, el animal se sacrifica usando el mismo compuesto que en la anestesia: Pentobarbital sódico, administrando por vía intraperitoneal una dosis de 90 mg/Kg.

El volumen recogido se centrifuga durante 10 minutos a 5000 rpm. De esta forma, los restos de mucosa arrastrados, sedimentan en el tubo de muestra. A continuación, se retira el residuo y se mide el volumen que ocupa el sobrenadante. Para calcular el volumen final, se le adiciona a este valor el volumen recogido durante la toma de muestras.

2.6. Tratamiento de las muestras

Las muestras biológicas obtenidas se centrifugan a 8000 rpm durante 8 minutos. Tras la centrifugación se procede a valorar los

sobrenadantes de las muestras mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC).

2.6.1 Cálculo de la velocidad de reabsorción de agua

Dado que el volumen varía según una cinética de orden cero³⁸⁹, la ecuación diferencial del proceso y su forma integrada son:

$$\frac{\partial V}{\partial t} = -k_0 \quad (4.1)$$

$$V = V_0 - k_0 \cdot t \quad (4.2)$$

siendo V el volumen remanente en el intestino a cada tiempo; V_0 , el volumen remanente a tiempo inicial y k_0 , la constante de velocidad de reabsorción de agua (mL/min).

Mediante regresión lineal por mínimos cuadrados de los volúmenes obtenidos, se cuantifican los parámetros V_0 y k_0 , con los que se determinan los volúmenes teóricos para cada tiempo de toma de muestra (V_t). Con los V_t se corrigen los valores experimentales de las concentraciones de soluto en las muestras, mediante la siguiente ecuación (4.3):

$$C = E \cdot \frac{V_t}{V_0} \quad (4.3)$$

donde C corresponde a la concentración de soluto corregida y E , a la concentración obtenida experimentalmente³⁸⁹.

Como parámetro representativo del proceso de absorción se calcula la constante aparente de velocidad de absorción, k_a , que lleva implícita la superficie intestinal.

Las constantes aparentes de velocidad de absorción se determinan a partir del modelo representado en la figura 4.3:



Figura 4.3. Modelo para determinar la constante aparente de absorción. Compartimiento A: lugar donde se produce la absorción (intestino). Compartimiento B: organismo.

La desaparición del compuesto del compartimiento A se debe únicamente a la absorción, y durante el tiempo que dura el ensayo sigue una cinética aparente de primer orden, según la siguiente ecuación^{234,390}:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -K_{ap} \cdot C \quad (4.4)$$

donde C corresponde a la concentración remanente de fármaco en el intestino y K_{ap} , a la constante de velocidad de absorción aparente de primer orden. Su forma integrada es:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{ap} \cdot t} \quad (4.5)$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y C_0 , la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ($t=0$). El valor de C_0 obtenido es siempre menor que la concentración perfundida debido a varios procesos simultáneos: dilución con el poco volumen que pudiese quedar de la solución de lavado, adsorción a la membrana intestinal y

entrada rápida del compuesto en los enterocitos. El descenso de C_0 se debe mayoritariamente a la carga de la sustancia en la mucosa, cuyo equilibrio se alcanza en los primeros minutos de la perfusión y pasados 5 minutos el proceso ha finalizado totalmente. Por esta razón, la toma de muestras se inicia a ese tiempo^{158,389}.

Para obtener un valor representativo de la constante de velocidad de absorción, el ensayo se realiza en un mínimo de 5 animales para cada solución ensayada, con lo que se obtiene un valor medio que se considera representativo.

Para poder comparar los resultados obtenidos *in situ*, en intestino delgado, con los obtenidos *in vitro*, en líneas celulares, deben expresarse los valores de k_a en permeabilidades.

$$P_{eff} = \frac{k_a \cdot R}{2}$$

(4.6)

donde R representa el radio intestinal efectivo.

3. Ensayos en cultivos celulares

3.1. Diseño del ensayo de permeabilidad

Estos ensayos se diseñan con el objetivo de obtener un sistema *in vitro* que permita reproducir de manera fiable los resultados de permeabilidad obtenidos *in situ* y los resultados *in vivo* descritos en la bibliografía, con el fin de reducir el número de animales utilizados.

Los estudios de permeabilidad *in vitro* tienen como propósito determinar el coeficiente de permeabilidad apical-basal (P A-B) y basal-apical (P B-A) de fármacos a través de la membrana celular.

Se ensayaron distintas concentraciones de parásito: 100.000 giardias/pocillo, 250.000 giardias/pocillo y 400.000 giardias/pocillo en co-cultivo con las células Caco-2 a distintos tiempos de incubación (2 y 24 horas antes del experimento). A partir de estos ensayos se seleccionaron las condiciones óptimas de ensayo (400.000 giardias/pocillo co-cultivadas durante 2 horas) y se realizaron los ensayos de permeabilidad de todos los fármacos en esas condiciones.

El proceso de absorción de cada fármaco se estudió en 2 condiciones:

- A través de la monocapa Caco-2 (control).
- A través de la monocapa Caco-2 incubada con *Giardia intestinalis* durante 2 horas.

3.2. Línea celular Caco-2

Los estudios de permeabilidad *in vitro* se han realizado en monocapas celulares de carcinoma de colon humano, Caco-2. Se ha utilizado la línea celular ATCC, cedida por el Dr. Hu de Washington State University (EEUU)³⁹¹.

Los requisitos básicos y materiales necesarios para el mantenimiento de esta línea celular son³⁹²:

- Pipeteador automático y pipetas estériles de diferentes volúmenes.
- Frascos de cultivo de poliestireno. Son estériles y con áreas de crecimiento de 25 y 75 cm² para el desarrollo y mantenimiento del cultivo celular.

- Placas e insertos para realizar los experimentos. Los insertos contienen una membrana de policarbonato sobre la que se realizan la siembra de células.
- Estufa de incubación a una temperatura de 37°C, 5% de dióxido de carbono (CO₂) y 90% de humedad relativa para mantener los frascos de cultivo con células en crecimiento.
- Cámara de flujo laminar vertical para trabajar con las células minimizando el riesgo de contaminación del cultivo. La manipulación de las células siempre tendrá lugar en el interior de la cámara.
- Bomba de vacío por membrana. Facilita la aspiración del medio de cultivo y la filtración en la preparación de las diferentes soluciones de trabajo.
- Centrífuga, a ser posible con termorregulación.
- Microscopio para examinar las membranas celulares y contar células.
- Hemocitómetro o Cámara de Neubauer para el conteo de células.
- Baño de agua con agentes inhibidores del crecimiento bacteriano y fúngico, a 37°C, para atemperar las soluciones a utilizar.

Los protocolos utilizados se validaron previamente por el grupo de investigación y se describen en los siguientes epígrafes.

3.3. Soluciones de trabajo

3.3.1. Medios de cultivo

El medio de cultivo se prepara a partir de diferentes soluciones de nutrientes. Se debe mantener a una temperatura de entre 2

y 8°C, siendo su periodo de validez en estas condiciones de aproximadamente 2 meses. Tiene que ser estéril para evitar contaminaciones de las células.

La composición del medio de cultivo de la línea celular Caco-2 se detalla en la tabla 4.8:

Compuesto	Cantidad
Hepes	5 mL
Penicilina G (10 ⁴ uds/mL) -Estreptomicina (10 ⁴ µg/mL)	5 mL
Aminoácidos no esenciales	5 mL
Suero bovino fetal	50 mL
DMEM Glutamax	450 mL

Tabla 4.8. Composición del medio de cultivo empleado en el crecimiento de la línea celular Caco-2.

3.3.2. Soluciones para el pase

PBS-EDTA

Es una solución estéril a pH 7,4 comercializada por *Gibco*®. Es una mezcla de solución salina tamponada con fosfatos *Dulbecco* y EDTA disódico y se utiliza para el lavado de la monocapa y la eliminación de los residuos de suero.

Tripsina-EDTA

Se comercializa en solución estéril por *Gibco*®. Se compone de 0,5% de tripsina y 0,2% de EDTA-disódico libre de Ca⁺² y Mg⁺². Se comercializa en solución estéril por *Gibco*®, la cual se diluye 1/5 en PBS-EDTA estéril. Se utiliza para separar las células de los frascos en el proceso de pase de uno a otro.

3.3.3. Soluciones para el experimento

Solución tamponada HBSS-HEPES

La base es una solución de sales comercializada: *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS). Se añade 5 mL de una solución tamponada de HEPES 1M estéril en 500 mL de HBSS. La solución se adicionó con un 2% de D-glucosa para que al inocular el parásito éste pueda sobrevivir. Antes de realizar el experimento, se lava la monocapa con esta solución.

Solución de compuesto a ensayar

Los compuestos se disolvieron en solución HBSS-HEPES en las mismas concentraciones que en el ensayo *in situ*. Estas se muestran en la tabla 4.6 del apartado 2.3.3, de los ensayos con animales.

3.4. Técnica experimental

3.4.1. Congelación

Las células se pueden mantener indefinidamente inmersas en nitrógeno líquido, pero para conservarlas a tan baja temperatura sin que se produzca ningún daño hay que someterlas a un tratamiento previo. Si la temperatura desciende demasiado rápido o se forman cristales de gran tamaño podrían aparecer daños irreversibles en las membranas celulares así como en otras estructuras de la célula.

El control del descenso de la temperatura, se realiza gracias a un dispositivo específico de criopreservación que contiene una solución de Isopropanol, la cual posee un bajo punto de congelación. En estos crioviales la temperatura desciende a una velocidad de 1°C/min hasta los -80°C. A partir de aquí, la temperatura puede descender a mayor

velocidad. Para evitar la aparición de cristales, se suspenden las células en una solución estéril con alto contenido en proteínas, compuesta por suero bovino fetal y DMSO (1:10). El DMSO es un crioprotector que disminuye la fragilidad de la membrana, pero debido a su toxicidad tanto para el cultivo celular como para el manipulador, el proceso de congelación debe realizarse en el menor tiempo posible.

El procedimiento de congelación comienza con la separación de las células de la pared del frasco de cultivo en el que se están manteniendo, mediante la adición de tripsina. Una vez obtenida la suspensión de células, se centrifuga durante 5 minutos a 1500 rpm y se elimina el sobrenadante. Al sedimento obtenido se le añade 5 mL de medio de cultivo atemperado adicionado con DMSO al 10%. Tras esto, se introduce rápidamente 1 mL de esta solución en cada criovial y se deposita en el dispositivo de criopreservación. Se almacena durante 24 horas en un congelador a -20°C , posteriormente se traslada a un congelador a -80°C durante 48 horas y finalmente se introducen los crioviales en el tanque de nitrógeno líquido.

3.4.2. Descongelación

En primer lugar se extrae el criovial del tanque de nitrógeno, y se introduce en un baño termostático a 37°C para acelerar el proceso de descongelación. Una vez se ha descongelado, el vial se introduce en la campana de flujo laminar, previa pulverización con alcohol al 70%, para llevar a cabo el procedimiento de manera estéril. Se pipetea su contenido, y se introduce en un tubo de plástico estéril con medio de cultivo atemperado, con el fin de disminuir la concentración de DMSO. El proceso de descongelación debe realizarse rápidamente, puesto que las células

están congeladas en una solución de DMSO al 10% que es tóxica para las células a temperatura ambiente. Se centrifuga durante 5 minutos a 1500 rpm, se aspira el sobrenadante que contiene el DMSO y se añade medio de cultivo. Se resuspenden las células en 5 mL de medio de cultivo y se introduce esta suspensión en un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie, el cual se almacena en la estufa de incubación. A las 24 horas se cambia el medio de cultivo del frasco, y se sigue el protocolo de crecimiento de las células en los frascos de cultivo.

3.4.3. Crecimiento en frascos de cultivo

Las células crecen formando monocapas celulares adheridas a la pared de frascos de plástico estériles. Se deben controlar estos dos aspectos para conseguir un correcto crecimiento:

- Cambio de medio de cultivo frecuente, para eliminar los productos procedentes del metabolismo celular, que puedan alterar el pH del medio y reponer los nutrientes necesarios para un correcto crecimiento.
- Cambio de frasco de cultivo de forma habitual, para controlar la densidad de crecimiento y asegurar que las células tienen espacio suficiente para crecer en forma de monocapa.

En primer lugar, los frascos de cultivo se extraen de la estufa de incubación, se pulverizan con alcohol al 70% y se introducen en la cámara de flujo laminar. También se pulverizan las botellas de todas las soluciones estériles que se van a utilizar y que se encuentran atemperándose en el baño a 37°C. Se aspira el medio de cultivo del frasco mediante una bomba de vacío. A continuación se añade nuevo medio

atemperado, con la ayuda de una pipeta unida a un pipeteador automático. Es importante no tocar las paredes de las botellas y frascos con la pipeta, y que estos permanezcan abiertos el menor tiempo posible para evitar contaminaciones.

Los frascos de cultivo utilizados para la descongelación tienen una superficie de 25 cm². Para que el crecimiento celular sea adecuado, es necesario que la cantidad de medio de cultivo sea 5 mL por frasco. En las siguientes fases del mantenimiento de la línea celular se emplean frascos de 75 cm², siendo la cantidad de medio requerida en este caso de 12 mL. Estos frascos poseen un filtro en el tapón, lo que permite a las células estar en contacto con el aire enriquecido en CO₂ de la estufa incubadora sin riesgo de contaminación.

3.4.4. Cambio a un nuevo frasco de cultivo

Las células crecen formando monocapas que se adhieren a la base de los frascos. La velocidad de crecimiento de este tipo de cultivos es muy rápida. Cuando la monocapa ha alcanzado la confluencia, es decir, las células ocupan toda la superficie disponible, se deben despegar y sembrar en un nuevo frasco. La obtención de la confluencia se confirma mediante inspección visual de la monocapa en el microscopio. En el caso de que no se realizara el cambio de frasco, las células comenzarían a degenerar, a formar vacuolas de reserva y a producir alteraciones importantes en las características típicas de la línea celular.

En primer lugar, se aspira el medio de cultivo y se lava la monocapa con PBS-EDTA, con el fin de eliminar restos de suero que podrían disminuir la eficacia de la tripsina. Después de unos 10 minutos, se retira el PBS-EDTA y se añade tripsina-EDTA diluida para separar las

células de la pared del frasco. Cuando se observa de manera visual la separación se añade medio de cultivo para inactivar la tripsina, gracias tanto a la dilución, como a la presencia de los diferentes factores de crecimiento y el suero bovino fetal del medio. Tras esto se homogeniza la suspensión celular. Se toma una alícuota y se introduce en un nuevo frasco, en el que previamente se había añadido medio de cultivo, de forma que se consiga la dilución adecuada para un correcto mantenimiento de la línea celular. Esta alícuota depende del tamaño del frasco de cultivo, y de la velocidad de crecimiento celular de la línea utilizada.

Transcurridas 24 horas del cambio de frasco, se realiza el cambio del medio de cultivo con el fin de eliminar las células que hayan muerto en el procedimiento.

3.4.5. Sembrado celular

Los experimentos de permeabilidad se llevan a cabo en monocapas de células Caco-2 formadas sobre una membrana de policarbonato. Estas membranas están formando la base de un receptáculo denominado inserto, que se sitúa en el interior de las hendiduras (pocillos) de una placa de plástico. Este montaje da lugar a dos cámaras separadas de diferente volumen, llamadas cámara apical (dentro del inserto) y basolateral (entre el inserto y el pocillo).

La figura 4.4 muestra el esquema del montaje donde se siembran las células y posteriormente se realiza el experimento.

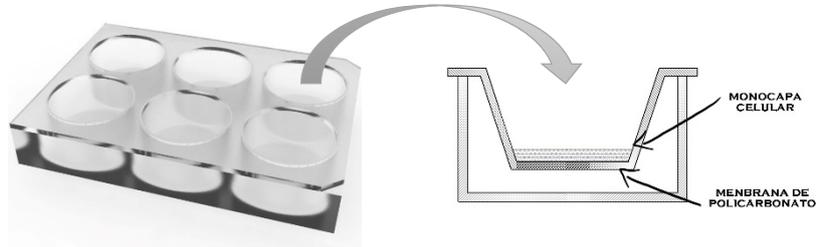


Figura 4.4. Esquema del montaje en las placas.

El primer paso para la siembra celular consiste en despegar las células Caco-2 del frasco de cultivo, mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior. A continuación, la suspensión celular se coloca en un tubo de centrifuga estéril, se centrifuga 5 minutos a 1500 rpm y se elimina el sobrenadante, que incluye la tripsina. Esta operación se repite, para asegurar que no quedan trazas de la enzima.

Tras esto se realiza un recuento celular, con un microscopio y un hemocitómetro (figura 4.5), de la suspensión celular homogeneizada. El hemocitómetro está dividido en cuadrantes. Para tener la medida del número de células por triplicado se cuentan aquellas que hay en tres de los cuadrantes. Solo se contarán las células que estén totalmente dentro del cuadrado y las que estén en contacto con dos de los cuatro márgenes del cuadrante. El número de células presentes en 0,1 μ L, se obtiene como media de los tres recuentos.

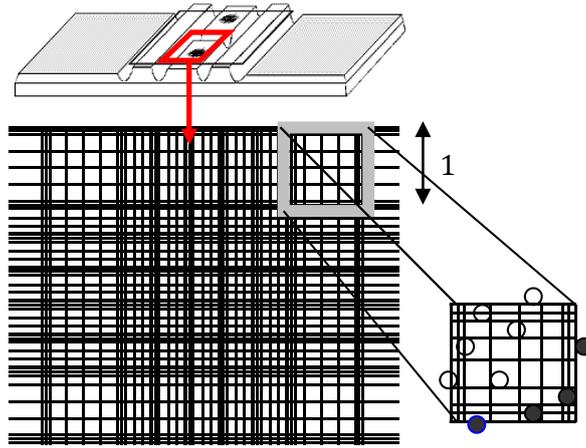


Figura 4.5. Imagen de un hemocitómetro o cámara de Neubauer y su vista al microscopio para proceder al recuento de células.

Una vez conocida la densidad celular, se calcula el volumen de la alícuota que hay que tomar para preparar la dilución para la siembra. Esta concentración se calcula para obtener la confluencia entre los 19-21 días post-sembrado, y garantizar el desarrollo de todas las proteínas transportadoras características de este cultivo^{393,394}.

En las placas preparadas con los insertos, se añaden 2 mL de suspensión celular en la cámara apical y 3 mL de medio de cultivo en la cámara basolateral. La suspensión celular se debe depositar en el interior del inserto, dejando caer las gotas de una en una en el centro, sin tocar las paredes del inserto. Una vez sembradas las placas, se dejan 10 minutos en la cámara de flujo laminar para que las células se asienten y, posteriormente, se introducen en la estufa incubadora.

Los experimentos se realizan a los 21 días de la siembra, momento en el que se considera que se ha alcanzado la confluencia y se han expresado los transportadores de membrana, sin llegar a manifestarse fenómenos de envejecimiento celular.

3.4.6. Mantenimiento de las placas sembradas

A las 24 horas de la siembra, se debe cambiar el medio de cultivo para eliminar con él las células que no hayan sobrevivido. A partir de este momento el medio de cultivo se renueva en días alternos. El día previo al ensayo se realiza cambio de medio, pero por medio de cultivo que no contiene antibióticos.

3.4.7. Ensayo de permeabilidad

El ensayo se puede dividir en 5 fases (lavado de la membrana, comprobación de la integridad de la monocapa, incubación con *G. intestinalis*, administración de la solución de estudio y toma de muestras), las cuales se detallan a continuación. El ensayo se realiza en un incubador con agitación controlada (Rotamax®) a 37°C.

Lavado de la membrana

Antes de realizar el experimento, se debe lavar la monocapa tres veces con una solución atemperada de HBSS-HEPES.

Comprobación de la integridad de la monocapa

Tras lavar la membrana, se comprueba la integridad de la monocapa mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) con un micro-polímetro *Millicell-ERS®*.

La medida de la resistencia eléctrica del inserto comparada con un inserto sin ningún tipo de crecimiento (control), es un índice contrastado de la seguridad de la monocapa³⁹⁵. Para medir el TEER

control, se utiliza un inserto sin crecimiento celular en contacto con solución tamponada. Se coloca el electrodo largo en la cámara basolateral y el electrodo corto en la cámara apical. Se calibra el micro-polímetro, ajustando el voltaje a cero, y se procede a la medida de la resistencia en tres direcciones para asegurar que la monocapa esté íntegra en toda la superficie del inserto. Se repite este procedimiento en los insertos con crecimiento celular en los que se va a realizar el experimento.

Para considerar adecuada la integridad de la monocapa, las medidas de la resistencia en los insertos con crecimiento celular deben ser superiores en 100 unidades o más a las medidas del blanco. En caso de que la medida no cumpla con el requerimiento establecido, se desecha el inserto.

Tras comprobar la integridad de la monocapa, las placas se introducen en el incubador durante una hora con la solución de HBSS con HEPES con la que se midió la resistencia, con objeto de que las células expulsen cualquier residuo de suero e iones que pudieran interferir en el ensayo.

Después de la toma de muestras y antes del estudio de recuperación del compuesto, se repite el proceso de medición de la resistencia eléctrica, con el fin de asegurar que la integridad de la monocapa no se ha visto afectada durante el experimento.

Incubación con *G. intestinalis*

Se adiciona una solución de *Giardia intestinalis* sobre la monocapa celular, y se mantiene en co-cultivo con las células Caco-2 durante distintos tiempos de incubación según el experimento.

Administración de la solución de estudio

Los platos utilizados para el estudio constan de 6 pocillos. Cada ensayo se realizó por triplicado. El estudio se llevó a cabo en dirección apical-basolateral y basolateral-apical para cada solución ensayada. Los ensayos se realizan, de modo que, en tres de los pocillos el compartimento dador de fármaco sea la zona apical, y en los otros tres pocillos lo sea la zona basolateral. Si se adiciona la solución de fármaco en el interior del inserto, es decir la cámara apical, se estudiará el transporte en dirección apical-basolateral. Si por el contrario, el fármaco se administra en el exterior del inserto (cámara basolateral) se estudiará el transporte basolateral-apical.

Se adicionan 2 mL de solución de fármaco en la cámara apical y 3 mL en la cámara basolateral en los pocillos adecuados. Cuando administremos el fármaco, se dispondrán 0,2 mL extra que serán retirados a tiempo 0 para conocer la concentración inicial exacta de la solución al inicio del experimento.

Toma de muestras

Los estudios se realizaron en un período total de 90 minutos, con toma de muestra en los siguientes tiempos: 15, 30, 60 y 90 minutos. Las muestras se toman en la cámara receptora, excepto la última (90 minutos) que se toma en ambas cámaras. Después de tomar cada muestra se repone el volumen con solución tamponada. Al finalizar la toma de muestras, como se indicó anteriormente, se comprueba el TEER de las membranas para descartar daño durante el experimento.

3.5. Estudio de recuperación del compuesto

Durante el estudio de absorción, el compuesto atraviesa la membrana celular pudiendo quedar en parte retenido en ella, bien en el interior de las células o bien adherido a estructuras subcelulares. Para determinar la cantidad de compuesto que queda en la monocapa se realiza el ensayo de recuperación.

En primer lugar, las membranas de policarbonato con las monocapas celulares adheridas, se extraen de los insertos y se introducen en tubos de centrifuga que contienen 1 mL de solución tamponada. Estos tubos se someten a un proceso de congelación-descongelación consistente en su inmersión, en primer lugar, en nitrógeno líquido y, posteriormente, en un baño a 37°C. Este proceso se realiza tres veces consecutivas. Se centrifugan los tubos durante 5 minutos a 1500 rpm, y se toma una muestra de 500 µL del sobrenadante que corresponde a la cantidad de compuesto retenido por la célula en solución.

El volumen extraído se repone con 500 µL de Metanol y se procede a agitar los tubos enérgicamente, con el objetivo de romper las estructuras subcelulares para que liberen el compuesto. Después se centrifuga durante 8 minutos a 8000 rpm y se toma otra muestra.

La suma de la cantidad de compuesto obtenida tras esta recuperación, y la cantidad de compuesto en ambas cámaras en las muestras del último tiempo, debe corresponder con la cantidad de compuesto de la muestra obtenida a tiempo 0.

3.6. Tratamiento de las muestras

3.6.1. Cálculo de la permeabilidad

Tras el ensayo, se procede a la valoración de las muestras recogidas. De cada muestra se obtiene la concentración de fármaco, en el compartimento en el que se haya tomado, a un determinado tiempo.

La difusión de fármaco, desde el compartimento dador al receptor, puede describirse como una difusión pasiva mediante la siguiente ecuación (4.7):

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = P_{eff} \cdot S \cdot (C_{dador} - C_{receptor}) \quad (4.7)$$

en la que $\partial Q/\partial t$ representa la velocidad de difusión del fármaco, P_{eff} es el coeficiente de permeabilidad efectiva, S es el área de difusión, C_{dador} es la concentración de fármaco el compartimento dador y $C_{receptor}$ es la concentración de fármaco en el compartimento receptor.

Sin embargo, existe un cambio continuo en las concentraciones de fármaco en los compartimentos dador y receptor a lo largo del experimento. Para resolver esta ecuación, teniendo en cuenta esta variación, se debe expresar en una única variable. Para ello, se iguala la concentración en el compartimento dador a la diferencia entre la cantidad de fármaco total y la cantidad en el compartimento receptor, obteniéndose la siguiente ecuación (4.8):

$$C_{dador} = \frac{C_{dadorINICIAL} \cdot V_{dador} - C_{receptor} \cdot V_{receptor}}{V_{dador}} \quad (4.8)$$

donde $C_{dadorINICIAL}$ es la concentración inicial de fármaco en el compartimento dador, V_{dador} es el volumen del compartimento dador y $V_{receptor}$ es el volumen del compartimento receptor.

Combinando las ecuaciones 4.7 y 4.8, se obtiene una solución para el cálculo de las concentraciones teóricas en el compartimento receptor (ecuación 4.9):

$$C_{receptor} = \frac{Q_{total}}{V_{receptor} + V_{dador}} + \left(C_{receptor0} - \frac{Q_{total}}{V_{receptor} + V_{dador}} \right) \cdot e^{-Peff_{0,1} \cdot S \cdot \left(\frac{1}{V_{receptor}} + \frac{1}{V_{dador}} \right) \cdot t} \quad (4.9)$$

donde Q_{total} es la cantidad total de fármaco en el sistema, $C_{receptor0}$ es la concentración de fármaco en el compartimento receptor al inicio del intervalo de tiempo considerado, $Peff_{0,1}$ es la permeabilidad y S el área del inserto en cm^2 ³⁹⁶.

Para cada dato de concentración experimental en el compartimento receptor y a cada tiempo, se calcula la concentración teórica. Se realiza un ajustado no lineal de los datos experimentales minimizando la suma de cuadrados residual. Para ello se calcula la suma de los cuadrados de las diferencias entre las concentraciones experimentales y teóricas a cada tiempo, y se estima la permeabilidad que conduce al menor valor de suma de cuadrados residual. Para la estimación de la permeabilidad mediante la ecuación no lineal se utilizó la herramienta Solver de una hoja MS Excel® 2013.

Si en algún caso, la concentración de fármaco en el compartimento receptor es muy pequeña frente a la concentración en el compartimento dador (<10%), se considera que el sistema trabaja en condiciones sumidero. Bajo estas condiciones, la ecuación 4.9 se puede

simplificar y, reorganizando los términos, se obtiene una expresión explícita para el cálculo de la permeabilidad:

$$P_{eff} = \frac{m}{S \cdot C} \quad (4.10)$$

en la que, m es la pendiente de la recta de cantidades acumuladas frente al tiempo, S el área de la membrana y C es la concentración inicial de fármaco en el compartimento dador. Los cálculos para la obtención de los valores de permeabilidad efectiva han sido realizados mediante una hoja de cálculo MS Excel® 2013.

Los análisis estadísticos para determinar si las diferencias entre las permeabilidades en ambas direcciones son significativas se han realizado mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 21.

4. Evaluación del daño celular producido por *G. intestinalis*

Con el objetivo de comprobar el daño que causa la infección por *G. intestinalis* al hospedador, se estudiaron las enzimas de oxidación y reparación del ADN en ausencia (control) y presencia de *G. intestinalis* a distintos tiempos: 2 horas y 24 horas. También se evaluó el efecto terapéutico del fármaco más común en el tratamiento de la giardiasis, el Metronidazol.

4.1 Técnica experimental

Los ensayos se llevan a cabo sembrando las células Caco-2 directamente en los pocillos de las placas sin insertos. Se mantienen en incubación dos semanas, hasta que se considera que se ha alcanzado la confluencia celular y se han expresado las proteínas de membrana sin llegar a manifestarse fenómenos de envejecimiento celular. El día del ensayo, se incorporaron 400000 giardias/pocillo y se mantuvieron en co-cultivo con las células Caco-2 en el incubador a 37°C durante 2 o 24 horas. Los ensayos con *Giardia intestinalis* se realizaron sin fármaco y en presencia de Metronidazol (2,6 µg /pocillo).

A los tiempos prefijados, se despegan las células de los pocillos, mediante el sistema descrito previamente con tripsina. Se resuspenden en su medio habitual y se realiza el recuento de las mismas en el hemocitómetro. Se recogen alícuotas de 10⁶ células, se centrifugan (4 minutos a 1500 rpm), se retira el sobrenadante y se congelan los pellets para su posterior análisis. Este proceso se realiza por triplicado para cada condición.

4.2 Tratamiento de muestras

4.2.1. PCR en tiempo real

El ARN total de las células, se extrajo mediante el kit de NucleoSpin® RNA/Protein (740933,50, Macherey-Nagel, Düren, Alemania), siguiendo las mismas instrucciones del fabricante. Para la transcripción reversa (TR), se utilizó 200 ng del ARN purificado y mediante el kit High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, P/N: 4322171; Foster City, CA) se transcribió el ARN a cDNA, mediante

hexameros aleatorios. Se siguieron las instrucciones del fabricante. Se realizaron tres pasos para la TR. Un paso inicial de 25°C durante 10 minutos, para permitir el anillamiento de los hexameros aleatorios, se siguió con un paso de síntesis de cDNA a 37°C durante 120 minutos, y un paso final de 5 minutos a 95°C.

Los niveles de ARNm se determinaron por PCR en tiempo real usando el equipo ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las sondas específicas de los genes usados fueron: SOD1 (SOD Cu/Zn Hs00533490_m1, Taqman® Assays, Applied Biosystems), SOD2 (SOD Mn Hs00167309_m1, Taqman® Assays, Applied Biosystems), GPX1 (Glutation peroxidasa 1 Hs00829989_gH, Taqman® Assays, Applied Biosystems), CAT (Catalasa Hs00989766_g1, Taqman® Assays, Applied Biosystems), RAD51 (RAD51 recombinasa Hs00153418_m1, Taqman® Assays, Applied Biosystems), OGG1 (8-oxo-guanina glicosilasa-1 Hs01114116_g1, Taqman® Assays, Applied Biosystems), PARP1 (Poli ADP ribosa polimerasa 1 Hs00242302_m1, Taqman® Assays, Applied Biosystems). Se usaron para cada muestra y gen específico, 0,5 µL de sondas junto con 5 µL del master mix 1x TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, P/N 4304437, Foster City, CA), y se añadió 1 µL de muestra retrotranscrita, en un volumen total de reacción de 10 µL.

Las condiciones de la qPCR fueron, un primer paso de activación de las enzimas, 10 minutos a 95°C, seguido de un segundo paso compuesto por 40 ciclos (15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C). Los niveles de expresión de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH Hs00375015_m1, Taqman® Assays, Applied Biosystems) se cuantificaron en todas las muestras para normalizar las diferencias en el

ARN de interés, la calidad del ARN y la eficiencia de transcripción. Cada muestra se analizó por triplicado, y la expresión génica se calculó por el método del *2- $\Delta\Delta C_t$ method*³⁹⁷.

4.2.2 Western blot

La detección específica de proteínas presentes en los extractos se realizó mediante la técnica de Western-blot. Esta técnica, permite la identificación de proteínas específicas, gracias a la reacción antígeno/anticuerpo de muestras complejas de proteínas extraídas, procedentes de células, tejidos o fluidos biológicos. Para la detección de las proteínas de interés, se requiere la separación de estas según su peso molecular, mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), a partir 30 μ g de cada una de las muestras preparadas con el tampón de carga (Tris 40 mM, EDTA, azul de bromofenol 0,01%, sacarosa 40%, SDS 4%, β -mercaptoetanol 10%) y calentándolas durante 5 minutos a 95°C. Se procedió a la carga de las muestras de proteínas en un gel de poliacrilamida al 12% (agua MiliQ 4,3 mL, mix de acrilamida 3 mL, Tris 1,5 M pH=8 2,5 mL, SDS 10% 0,1 mL, APS 10% 0,1 mL y TEMED (tetrametiletildiamina) 0,004 mL dentro una cubeta horizontal (BIORAD MiniPROTEAN Tetra cell) con el tampón tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 200 mM, 0,1% SDS, pH 8,3), dejándose correr a un voltaje constante de 100V durante 2 horas.

Trascurrida la electroforesis, se procedió a realizar la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Transfer Membrane, Whatman GmbH, Dassel, Alemania) para llevar a cabo la detección específica con los

anticuerpos. Para ello, se empleó tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, Metanol 20%) y un voltaje de 120 V durante 1 hora a 4°C.

Tras esto, se separó el gel cuidadosamente de la membrana, y se dejó teñir con solución azul Coomassie (Coomassie R-250 1,25 g, etanol 250 mL, ácido acético 50 mL y agua 1200 mL), para luego desteñirla con solución desteñidora (etanol 500 mL, ácido acético 200 mL y agua 1200 mL). Por otro lado, la membrana se sumergió en tampón de bloqueo formado por 0,05 g/mL de leche desgrasada o 0,05 g/mL de seroalbúmina bovina, según el anticuerpo, en TBS-Tween (Tris 20 mM, NaCl 137 mm, pH 7,6, Tween 0,1%) durante 1 hora. El bloqueo evita la unión de proteínas a las impurezas de la membrana, reduciendo así las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana.

Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo, se procedió a la detección de las proteínas mediante el uso de anticuerpos primarios contra catalasa (1:1000, Sigma, St. Louis, EE.UU.), MnSOD (1:1000, Stressgen, Ann Arbor, MI, EE.UU.), CuZnSOD (1:1000, Stressgen, Ann Arbor, MI, EE.UU.) y β -actina (1:1000, Santa Cruz BioTech. EE.UU.), estos dos últimos como control de carga. Los anticuerpos se diluyeron en TBS-Tween con 0,01 g/mL de leche en polvo desgrasada o 0,01 g/mL BSA, según el anticuerpo y se dejaron toda la noche a una temperatura de 4°C en agitación suave.

Al día siguiente, se lavaron las membranas tres veces en TBS-Tween con 0,01 g/mL de leche en polvo desgrasada o 0,01 g/mL BSA, según el anticuerpo, para eliminar el exceso de anticuerpo no unido que hubiera en la membrana. Tras esto, se incubó durante 1 hora en

agitación suave, con anticuerpo de cabra anti-ratón (1:7500, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, 2012), de cabra anti-conejo (1:2500, Cell Signaling) y de caballo anti-cabra (1:1750, Santa Cruz BioTech. EE.UU.). Todos ellos conjugados con la enzima peroxidasa de rábano. Tras esto, se realizaron tres lavados con TBS-Tween, y se procedió a la detección quimioluminiscente. Para ello, las membranas se incubaron con 1 mL de la mezcla 1:1 de los reactivos del kit de revelado (ECLTM Western Blotting Detection Reagents, Amersham GE HealthcareBio-Science AB, Uppsala, Suecia) y tras esto, se detectó la señal quimioluminiscente utilizando el escáner densitométrico (LAS-4000, General Electrics). Por último, los resultados fueron analizados con el programa de análisis de imágenes *Image software 4.0 Gauge*.

5. Ensayos de liberación

5.1. Ensayo de liberación *in vitro* del hidrogel de Glicol Chitosan cargado con Metronidazol.

Se llevaron a cabo estudios para el desarrollo de nuevas formulaciones orales en el tratamiento de la giardiasis. Se diseñó un hidrogel inteligente que liberara de forma específica el Metronidazol, sólo cuando se encontrara en presencia de *Giardia*.

El ensayo de liberación para comprobar la funcionalidad del gel, se realizó en cuatro condiciones:

- Gel 1 cargado con Metronidazol (blanco).
- Gel 1 cargado con Metronidazol en presencia de *G. intestinalis*.
- Gel 2 cargado con Metronidazol (blanco).

- Gel 2 cargado con Metronidazol en presencia de *G. intestinalis*.

Para la realización del ensayo se resuspendieron 100 µL de hidrogel con Metronidazol encapsulado en 30 mL de la solución de HBSS adicionada de 2% de D-glucosa . Estos vasos actúan como control a los distintos tiempos de toma de muestra. A la otra parte de los vasos se les adiciona $2 \cdot 10^6$ giardias, a partir de una suspensión concentrada. Para simular las condiciones fisiológicas, se mantiene a 37°C y en agitación constante en un agitador orbital .

Los ensayos de liberación se realizaron en un periodo total de 4 horas, con toma de muestra en los siguientes tiempos: 30 minutos, 1, 2, 3 y 4 horas. Las muestras obtenidas se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm y se congelaron hasta su posterior análisis. Los ensayos de liberación se realizaron por triplicado.

5.2. Ensayo de liberación *in vitro* de micropartículas mesoporosas de sílice con puerta molecular pH dependiente para control biológico de *Giardia intestinalis*

A continuación se comprobó el funcionamiento de la puerta molecular. La absorción de un fármaco administrado en una forma farmacéutica por vía oral depende de su liberación desde la formulación, disolución bajo condiciones fisiológicas y permeabilidad a través del tracto gastrointestinal; y está condicionada por los cambios de pH característicos de este sistema que oscilan desde pH= 1,2 del estómago hasta pH= 6,8-7 del colon. El diseño de esta puerta molecular aprovecha

estos cambios de pH para producir la liberación del Metronidazol en el tramo del intestino en el que se concentra *G. intestinalis*.

Para abarcar todo el rango de pH, los ensayos de liberación *in vitro* se realizaron resuspendiendo el sólido en disoluciones a distintos pHs (tampones a pH= 1,2; pH= 4,5; pH= 6,8 recogidos en la farmacopea y disolución a pH=2) para la evaluación de las formulaciones orales. Las soluciones descritas en la Farmacopea Europea (EP) con pH entre 1,2 y 1,5 contienen cloruro de sodio y ácido clorhídrico con concentración de la sal de 50 mM. Las soluciones de pH 4,5 se preparan con acetato de sodio y ácido acético, siendo la concentración de la sal de 36,5 mM; y las que tienen un pH entre 5,8 y 6,8 contienen fosfato monobásico de potasio e hidróxido de sodio con concentración de 50 mM para la sal³⁹⁸. En la tabla 4.9 se detalla la composición de cada solución tampón.

Tampón	pH	Composición	Cantidad
Tampón clorhídrico	1,2	NaCl solución HCL 0,1N	2,52 g csp 1000 mL
Tampón acetato	4,5	Acetato de sodio Ácido acético 2N NaCl Agua miliQ	1,80 g 14 mL 7,7 mg csp 1000 mL
Tampón fosfato	6,8	Fosfato sódico monobásico monohidratado NaCl Agua miliQ	6,8 g 4,04 g csp 1000 mL

Tabla 4.9. Composición de los distintos medios estándar utilizados (pH 1,2; 4,5 y 6,8) para los ensayos de liberación *in vitro*.

No obstante, el pH de los diferentes tramos depende de muchas variables como la condición prandial, tiempo después de administración de alimentos, volumen y contenido de los alimentos, así como del volumen de las secreciones. Por esa razón, además de las disoluciones que imitan las condiciones estándar, se ensayaron otras

disoluciones tampón descritas en la bibliografía como medios biorrelevantes.

-Fluidos gástricos que simulan la presencia de alimentos (FeSSGF, por sus siglas en inglés)

Para reproducir las condiciones fisiológicas que se dan tras la ingesta de alimentos en estudios *in vitro*, lo ideal sería utilizar un homogeneizado de la comida ingerida, ya que la composición gástrica en el estado postprandial depende del tipo de alimento que se haya tomado. Sin embargo, sería difícil realizar el análisis del fármaco en estas condiciones. Por esto, surgen medios alternativos a base de leche homogeneizada de vaca con un contenido de grasa de 3,5% y Ensure® Plus, los cuales tienen propiedades fisicoquímicas similares a las establecidas por la FDA para evaluar el efecto de los alimentos en los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia³⁹⁹.

Otra dificultad que aparece al intentar simular el medio gástrico es que la composición de este en presencia de alimentos va cambiando a medida que se realiza la digestión y el vaciado gástrico. Para superar este problema, se desarrollan los medios “instantáneos” que simulan las distintas etapas tras la ingesta de alimentos. En concreto, Jantratid y colaboradores han propuesto tres medios “instantáneos” a base de leche, que simulan los cambios que ocurren a nivel gástrico durante los primeros 200 minutos después de la ingesta de alimentos. Dentro de este periodo de tiempo se diferencian tres etapas según el autor: fase temprana, fase media y fase tardía. La composición de la fase media pareció ser la que mejor reproduce los cambios tras la ingesta de alimentos, por lo que se ha designado como fluido gástrico simulado en

estado postprandial^{399,400}. La composición de los tres medios propuestos se muestra en la tabla 4.10.

FeSSGF	Fase		
	Temprana	Media (FeSSGF)	Tardía
Composición			
Cloruro de sodio (mM)	148	237,02	122,6
Ácido acético (mM)	-	17,12	-
Acetato de sodio (mM)	-	29,75	-
Ácido ortofosfórico (mM)	-	-	5,5
Dihidrógeno fosfato de sodio (mM)	-	-	32
Leche/solución tampón	1:0	1:1	1:3
Ácido clorhídrico/hidróxido de sodio c.s.	pH 6,4	pH 5	pH 3
Propiedades			
pH	6,4	5	3
Osmolaridad (mOsm/kg)	559	400	300
Capacidad tampón (mmol/L/pH)	21,33	25	25
Tensión superficial (mN/m)	49,7 ± 0,3	52,3 ± 0,3	58,1 ± 0,2

Tabla 4.10. Composición de los medios que simulan la presencia de alimentos en el estómago. Fluido gástrico simulado en estado postprandial (FeSSGF)³⁹⁹.

-Fluido intestinal simulado en estado postprandial (FeSSIF, por sus siglas en inglés)

Este medio simula las características principales de los fluidos intestinales tras la ingesta de alimentos. Se formuló recopilando toda la información recogida en la literatura hasta la fecha sobre la concentración de cada componente, el pH en humanos y la capacidad tampón medida en modelo animal de perro⁴⁰¹.

La primera versión de este medio fue propuesta en 1998. La composición de este, se muestra en la tabla 4.11.

FeSSIF	
Composición	
Taurocolato sódico (mM)	15
Lecitina (mM)	3,75
Ácido acético (g)	8,65
Cloruro de sodio (g)	11,874
Hidróxido de sodio (lentejas) (g)	4,04
Agua desionizada c.s.	1L
Propiedades	
pH	5,0
Osmolaridad (mOsm/kg)	~670
Capacidad tampón (mEq/L/pH)	~72
Tensión superficial (mN/m)	48

Tabla 4.11. Composición del fluido intestinal simulado en estado postprandial (FeSSIF)⁴⁰⁰.

Posteriormente se vio, en estudios en humanos, que las condiciones reales de los fluidos intestinales tras la ingesta de alimentos eran diferentes en algunos aspectos al medio FeSSIF inicialmente propuesto. El medio FeSSIF tiene una mayor concentración de sales biliares y carece de productos que provoquen lipólisis. Estos productos sí que están presentes *in vivo*, y junto a la bilis pueden aumentar la solubilidad de los fármacos poco solubles, lo que no ocurriría con este medio alternativo. Por esta razón se propuso una nueva versión del medio al que se designó como FeSSIF-V2³⁹⁹.

Se determinó el perfil de liberación recogiendo alícuotas de las suspensiones a los tiempos prefijados, filtrándolas con filtros de teflón y determinando la cantidad de fármaco mediante espectroscopia de fluorescencia en el caso de la liberación de Safranina, y mediante HPLC en el caso de Metronidazol.

C. Valoración de muestras

1. Elementos cromatográficos

El método analítico empleado para la valoración de las muestras es la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC). La funcionalidad del método analítico se comprobó diariamente a través de una curva de calibración con patrones de concentración conocida.

El sistema cromatográfico utilizado ha sido un Sistema *Alliance® HPLC*, que consta de los siguientes módulos:

- Bomba cuaternaria e inyector automático integrado: Módulo de Separaciones *Waters TM 2695*.
- Detector de absorbancia *Waters TM 2487* doble λ .
- Detector programable de fluorescencia *Waters 2475*.
- Registrador-integrador *Empower™*.

2. Condiciones cromatográficas

En cuanto a las condiciones cromatográficas, se utilizó una fase estacionaria inversa, compuesta por una precolumna Phenomenex® KJ0-4282, con dos filtros de 2 μm y relleno con micropartículas C-18 de 40 μm de tamaño y, una columna de acero inoxidable Waters TM modelo Nova Pak® C-18 de 150 mm de longitud; 3,9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 μm . El resto de condiciones cromatográficas se describen en la tabla 4.12 según el fármaco analizado:

Material y Métodos

Compuesto	Fase móvil	Vol. iny. (µL)	Detector	λ (nm)	Flujo (mL/min)	Tª (°C)	T.R. (min)
Amoxicilina	90:10 Agua: ACN	70	UV	201	1	30	1,80
Carbamazepina	65:35 Agua : ACN	20	UV	280	1	30	1,82
Cefadroxilo	15:85 Metanol : Agua	60	UV	254	1	30	2,18
Diazepam	60:40 Metanol : Agua	80	UV	252	1	30	1,45
Fenobarbital	35:50:15 Metanol : Agua : ACN	100	UV	219	1	30	2,15
Ibuprofeno	95:5 Agua: ACN	70	UV	220	1	30	1,60
Isoniazida	2,5:97,5 Metanol : Agua	50	UV	264	1	25	1,55
L-Y	70 : 30 Agua : ACN	2	FLUO	430 530	1	30	1,02
Metoprolol	20:60:20 Metanol : Agua: ACN	60	FLUO	231 307	1	30	2,30
Metronidazol	50:50 Agua: ACN	50	UV	248	1	30	1,30
Paracetamol	25:75 Metanol: Agua	50	UV	235	1	30	1,50
Quinidina	70:30 Agua : ACN	50	FLUO	300 500	1	30	2,80
Rifampicina	15:45:40 Metanol : ACN: Agua	100	UV	254	1	30	6,80
Rodamina	60:44 Agua : ACN	15	FLUO	485 546	1	30	3

Tabla 4.12. Condiciones cromatográficas de los compuestos ensayados. El agua de la fase móvil contenía 0,5% TFA en todos los casos. (TFA: trifluoroacético, ACN: acetonitrilo, T.R: tiempo de retención, FLUO: fluorescencia, UV: ultravioleta, λ: longitud de onda, vol.iny.: volumen de inyección, Tª: temperatura).

Todos los componentes de la fase móvil fueron filtrados mediante un filtro *Millipore GVWP* de 230 nm de diámetro de poro antes de añadirse al sistema cromatográfico, para eliminar posibles partículas en suspensión.

D. Validación de los métodos analíticos

Para validar los métodos analíticos se evaluaron los parámetros de linealidad y exactitud y precisión; así mismo se establecieron los límites de detección y cuantificación.

Se preparó una recta de calibrado a partir de las diluciones de fármaco, que fue inyectada en el HPLC en las mismas condiciones y el mismo día que las muestras a estudiar.

1. Ensayo de linealidad

Las rectas de calibrado deben abarcar un rango de concentraciones adecuado, para interpolar las áreas que se obtienen de cada compuesto tras realizar la cromatografía.

Se realizó una regresión lineal entre las áreas de los cromatogramas obtenidos y las concentraciones teóricas:

$$y = m \cdot x + b \tag{4.11}$$

donde y es el área del cromatograma (eje de de ordenadas) y x la concentración teórica (eje de abcisas). Las constantes m y b son la pendiente y ordenada en el origen de la recta, respectivamente. Para

comprobar la dependencia lineal de las rectas se utilizó el coeficiente de correlación r^2 . Cuanto más próximo está r a la unidad, mejor es el modelo.

2. Ensayo de exactitud y precisión

Con el objetivo de comprobar la precisión y exactitud del método analítico, se valoraron muestras patrón de concentración conocida dentro de la recta de calibrado. Se calculó la exactitud del modelo para cada concentración patrón mediante el cálculo de los errores absolutos y relativos:

$$\varepsilon_{\text{absoluto}} = C_{\text{teórica}} - C_{\text{experimental}} \quad (4.12)$$

$$\varepsilon_{\text{relativo}} = \frac{C_{\text{teórica}} - C_{\text{experimental}}}{C_{\text{teórica}}} \times 100 \quad (4.13)$$

donde $C_{\text{teórica}}$ corresponde a la concentración teórica de la muestra patrón y $C_{\text{experimental}}$ corresponde a la concentración calculada mediante la interpolación en la recta de calibración.

La precisión se calculó mediante el coeficiente de variación de la media de los valores de las permeabilidades estimadas:

$$cv(\%) = \frac{DE}{P_{\text{eff}}} \cdot 100 \quad (4.14)$$

donde P_{eff} es la permeabilidad media estimada y DE la desviación estándar de ellas.

3. Límite de detección y cuantificación

Se estableció el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{m} \quad (4.15)$$

$$LC = \frac{10 \cdot \sigma}{m} \quad (4.16)$$

en las que σ es la desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de regresión y m es la pendiente de la misma.

E. Métodos matemáticos y estadísticos

1. Análisis de regresión

Para determinar la constante de velocidad de reabsorción de agua, así como las rectas de calibración para la valoración del fármaco se empleó, como se indica anteriormente, un análisis lineal simple por mínimos cuadrados. Se utilizó una hoja de cálculo *Excel 2013* para realizar las regresiones.

Para el cálculo de las constantes de velocidad de absorción aparentes (k_{ap}) en cada condición experimental y para los coeficientes de

permeabilidad (P_{AB}) y (P_{BA}) se realizó una regresión no lineal, utilizando la herramienta Solver en una hoja de cálculo en *Excel 2013*.

2. Pruebas de comparación de medias

Se han utilizado pruebas paramétricas y no paramétricas, según se cumplieran o no las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas entre los grupos. Además, las observaciones son independientes, es decir, el valor de una observación en un grupo no proporciona información sobre el valor de la observación en otro grupo.

Las pruebas de comparación entre medias que se han realizado en este trabajo se exponen en los epígrafes siguientes.

2.1. Análisis de varianza global: ANOVA de un factor y prueba de comparación de dos medias: ensayo *t de Student*

Este análisis se realiza para detectar diferencias estadísticamente significativas entre las constantes de absorción aparentes (k_{ap}) obtenidas en las diferentes condiciones. Se seleccionó un nivel de significación α de 0,05

Asimismo, se aplica para discriminar si los coeficientes de permeabilidad varían en función de la concentración.

Los análisis ANOVA y *t de Student* se realizan para detectar diferencias estadísticamente significativas, entre las permeabilidades aparentes (P_{app}) o las constantes de absorción aparentes (k_{ap}) obtenidas en las diferentes condiciones. Se seleccionó un nivel de confianza del 95%, de modo que se determinó la existencia de diferencias

estadísticamente significativas cuando el valor de probabilidad (p) era menor del 5%, para discriminar si los coeficientes de permeabilidad o absorción presentan o no diferencias significativas. ANOVA Se calculó para el fármaco patrón, y con *Giardia* 2 y 24 horas, en ambas direcciones. Para las comparaciones entre dos factores se realizó la prueba *t de Student*.

2.2. Prueba de comparación múltiple: *Prueba de Scheffé*

Esta prueba se basa en comparar todos los grupos de valores, uno por uno, con todos los demás de forma independiente, para poder así establecer las diferencias significativas entre dos grupos de datos. Se seleccionó un nivel de significación (α) de 0,05.

V Resultados y Discusión

A. Validación del método analítico de los compuestos ensayados

1. Ensayo de linealidad

El ensayo de linealidad se ha utilizado para validar el método analítico empleado para calcular las concentraciones obtenidas después de la valoración de las muestras. En las tablas 5.1, 5.2 y 5.3 se muestran los resultados de los ensayos de linealidad así como los errores estándar (ES) de la ordenada en el origen y de la pendiente de la recta.

Ensayo de linealidad. Fármacos modelo				
Metoprolol 100 μM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r^2
-6469,86	27723,87	33770	594	0,996
Rodamina 5,5 μM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r^2
-1,87E+07	6251615	155377129	2201238	0,998
Lucifer Yellow 2000 μM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r^2
-13134306,34	4767146,81	449621,14	4841,21	0,999

Tabla 5.1. Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleadas para valoración de las muestras obtenidas en los ensayos de los fármacos modelo: Metoprolol 100 μM , Rodamina 5,5 μM y Lucifer Yellow 2000 μM .

Ensayo de linealidad. Fármacos validación método <i>in vitro</i>				
Amoxicilina 100 µM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r²
24308,07	33004,28	77285,37	670,34	0,999
Paracetamol 100 µM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r²
80232,34	14113,08	25569,26	286,65	0,999

Tabla 5.2. Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleadas para valoración de las muestras obtenidas en los ensayos de los fármacos utilizados para la validación: Amoxicilina 100 µM y Paracetamol 100 µM.

Ensayo de linealidad. Fármacos a estudio				
Carbamazepina 100 µM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r²
-1466,81	2488,09	12143,02	50,53	0,999
Cefadroxilo 100 µM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r²
7048,04	2456,53	20522,20	49,89	0,999
Diazepam 100 µM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r²
-31710,19	19309,21	22862,44	392,18	0,997
Fenobarbital 100 µM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r²
115967,56	13829,09	58535,11	280,88	0,999
Ibuprofeno 100 µM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r²
220466,16	88034,07	120782,23	1788,04	0,998
Isoniazida 100 µM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r²
8586,06	1461,50	8048,62	29,68	0,999
Quinidina 100 µM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r²
-1785037	870163,8	670842	17674	0,992
Rifampicina 100 µM				
ordenada	ES	pendiente	ES	r²
-226689,64	63808,37	73893,98	1295,99	0,997

Tabla 5.3. Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleadas para valoración de las muestras obtenidas en los ensayos de los fármacos a estudio.

Los ensayos de linealidad muestran unos coeficientes de correlación siempre superiores a 0,990 lo que indica que existe una linealidad en los rangos de concentraciones estudiadas

2. Ensayo de exactitud y precisión

En las tablas 5.4, 5.5 y 5.6 se detallan los resultados de los ensayos de exactitud y precisión realizados sobre tres patrones de concentración conocida ($P_{5\%}$, $P_{30\%}$, $P_{90\%}$) determinando el error absoluto (ϵ_a) y error relativo (ϵ_r %).

Ensayo de exactitud y precisión. Fármacos modelo								
Metoprolol 100 μM								
$P_{5\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)	$P_{30\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)	$P_{90\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)
5,03	0,03	0,55	30,07	0,07	0,22	85,93	4,07	4,52
Rodamina 5,5 μM								
$P_{5\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)	$P_{30\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)	$P_{90\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)
0,40	0,02	4,47	2,68	0,07	2,64	4,88	0,07	1,43
Lucifer Yellow 2000 μM								
$P_{5\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)	$P_{30\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)	$P_{90\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)
111,07	11,07	11,07	559,10	40,90	6,82	1816,99	16,99	0,94

Tabla 5.4. Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas en la valoración de las muestras obtenidas en los ensayos de los fármacos modelo.

Ensayo de exactitud y precisión. Fármacos validación método <i>in vitro</i>								
Amoxicilina 100 μM								
$P_{5\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)	$P_{30\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)	$P_{90\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)
5,53	0,53	10,52	31,59	1,59	5,31	89,64	0,36	0,40
Paracetamol 100 μM								
$P_{5\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)	$P_{30\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)	$P_{90\%}$	ϵ_a	ϵ_r (%)
4,31	0,69	13,88	29,41	0,59	1,98	89,16	0,84	0,93

Tabla 5.5. Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas en la valoración de las muestras obtenidas en los ensayos de los fármacos utilizados para la validación del nuevo método *in vitro*.

Ensayo de exactitud y precisión. Fármacos a estudio								
Carbamazepina 100 µM								
P_{5%}	ε_a	ε_r (%)	P_{30%}	ε_a	ε_r (%)	P_{90%}	ε_a	ε_r (%)
4,83	0,17	3,34	29,42	0,58	1,94	89,32	0,68	0,76
Cefadroxilo 100 µM								
P_{5%}	ε_a	ε_r (%)	P_{30%}	ε_a	ε_r (%)	P_{90%}	ε_a	ε_r (%)
4,88	0,12	2,42	30,63	0,63	2,10	89,87	0,13	0,15
Diazepam 100 µM								
P_{5%}	ε_a	ε_r (%)	P_{30%}	ε_a	ε_r (%)	P_{90%}	ε_a	ε_r (%)
5,01	0,01	0,26	31,18	1,18	3,94	85,91	4,09	4,54
Fenobarbital 100 µM								
P_{5%}	ε_a	ε_r (%)	P_{30%}	ε_a	ε_r (%)	P_{90%}	ε_a	ε_r (%)
4,96	0,04	0,85	30,76	0,76	2,53	89,78	0,22	0,25
Ibuprofeno 100 µM								
P_{5%}	ε_a	ε_r (%)	P_{30%}	ε_a	ε_r (%)	P_{90%}	ε_a	ε_r (%)
4,53	0,47	9,42	33,11	3,11	10,38	89,60	0,40	0,45
Isoniazida 100 µM								
P_{5%}	ε_a	ε_r (%)	P_{30%}	ε_a	ε_r (%)	P_{90%}	ε_a	ε_r (%)
4,75	0,25	4,98	30,28	0,28	0,92	89,68	0,32	0,35
Quinidina 100 µM								
P_{5%}	ε_a	ε_r (%)	P_{30%}	ε_a	ε_r (%)	P_{90%}	ε_a	ε_r (%)
5,20	0,20	4,07	30,41	0,41	1,35	86,29	3,71	4,12
Rifampicina 100 µM								
P_{5%}	ε_a	ε_r (%)	P_{30%}	ε_a	ε_r (%)	P_{90%}	ε_a	ε_r (%)
5,49	0,49	9,89	28,75	1,25	4,17	87,05	2,95	3,28

Tabla 5.6. Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas para valoración de las muestras obtenidas en los ensayos de los fármacos a estudio.

Como puede observarse los errores absolutos y relativos presentan valores bajos por lo que los métodos seleccionados son adecuados para la valoración de muestras.

3. Límite de detección y cuantificación

Las tablas 5.7, 5.8 y 5.9 muestran los valores de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los fármacos ensayados.

Límites de detección y cuantificación. Fármacos modelo					
Metoprolol		Rodamina		Lucifer Yellow	
LD	LC	LD	LC	LD	LC
1,89	4,10	0,09	0,20	34,99	106,03

Tabla 5.7. Límites de detección y cuantificación (μM) de la técnica empleada para la determinación del coeficiente de permeabilidad efectiva de los fármacos modelo.

Límites de detección y cuantificación. Fármacos validación método <i>in vitro</i>			
Amoxicilina		Paracetamol	
LD	LC	LD	LC
1,41	4,27	1,82	5,52

Tabla 5.8. Límites de detección y cuantificación (μM) de la técnica empleada para la determinación del coeficiente de permeabilidad efectiva *in vitro* de los fármacos utilizados para la validación del método *in vitro*.

Límites de detección y cuantificación. Fármacos a estudio		
Compuesto	LD	LC
Carbamazepina	0,68	2,05
Cefadroxilo	0,40	1,20
Diazepam	2,79	8,45
Fenobarbital	0,78	2,36
Ibuprofeno	2,41	7,29
Isoniazida	0,60	1,82
Quinidina	2,98	6,49
Rifampicina	2,85	8,64

Tabla 5.9. Límites de detección y cuantificación (μM) de la técnica empleada para la determinación del coeficiente de permeabilidad efectiva *in vitro* de los fármacos a estudio.

Los métodos analíticos empleados en este trabajo han demostrado ser suficientemente selectivos y sensibles para la cuantificación adecuada de todos los compuestos a las concentraciones seleccionadas.

B. Efecto de *G. intestinalis* sobre la permeabilidad intestinal

En los distintos subapartados que se presentan a continuación se muestran los resultados de velocidad de absorción de cada fármaco a través de la barrera intestinal utilizando dos modelos: *in situ* e *in vitro* así como las modificaciones que sufre este parámetro cuando el intestino está colonizado por *Giardia intestinalis*. Los fármacos atraviesan la barrera intestinal a favor de gradiente de concentración y algunos de ellos utilizan, además, un mecanismo especializado de transporte.

Para facilitar la interpretación de los resultados se presenta la tabla 5.10 en la que se indican los transportadores implicados en la absorción de los fármacos estudiados.

Compuesto	Transporte absorción					Transporte secreción	
	OATP	OAT1	PEPT1	OCT1	MRP1	MRP2	gp-P
Amoxicilina		x	x		x		x
Carbamazepina					x	x	x
Cefadroxilo		x	x				x
Diazepam					x		x
Fenobarbital					x	x	x
Ibuprofeno	x	x			x		
Isoniazida							
Lucifer-Yellow							
Metoprolol							
Metronidazol							
Paracetamol		x		x	x		x
Quinidina	x			x	x	x	x
Rifampicina	x				x	x	x
Rodamina							x

Tabla 5.10. Principales transportadores presentes en el epitelio intestinal, tanto de absorción como de secreción^{178,180,385}.

1. Ensayo *in situ*

A continuación se muestran los resultados de las concentraciones experimentales en lumen intestinal (duodeno) a los distintos tiempos de toma de muestra para cada uno de los fármacos ensayados.

1.1. Amoxicilina

La figura 5.1 representa la constante aparente de velocidad de absorción de Amoxicilina a través del intestino de rata Wistar, tanto en ausencia como en presencia de *G. intestinalis*.

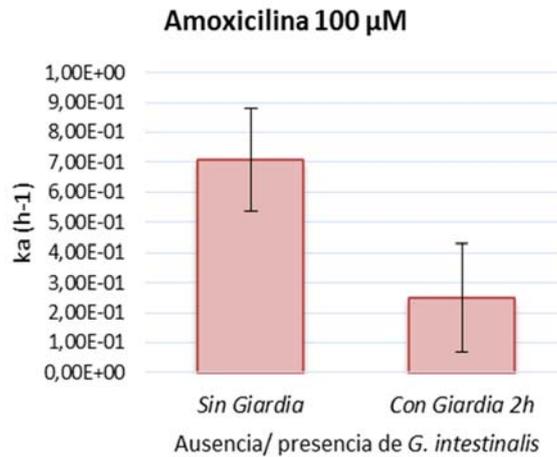


Figura 5.1. Representación gráfica de la constante de velocidad de absorción de Amoxicilina obtenida en las distintas condiciones del ensayo.

La tabla 5.11, muestra el resumen de las concentraciones experimentales de Amoxicilina en el lumen intestinal (duodeno) de rata Wistar a distintos tiempos de toma de muestra.

Amoxicilina 100 μM		
Tiempo (min)	Concentraciones promedio remanentes en lumen duodenal ($\mu\text{g/ml}$)	
	Rata Wistar macho	
	Sin <i>Giardia</i>	Con <i>Giardia</i>
5	342,98	156,55
10	320,58	206,15
15	298,25	163,12
20	287,65	117,46
25	270,49	175,65
30	254,87	158,72
$K_{ap} \pm \text{DE}$	$0,71 \pm 0,17 \text{ h}^{-1}$ (23,94%)	$0,25 \pm 0,18 \text{ h}^{-1}$ (72%)
$P_{eff} \pm \text{DE}$	$1,66 \cdot 10^{-05} \pm 6,05 \cdot 10^{-06} \text{ cm/s}$	$8,78 \cdot 10^{-06} \pm 6,33 \cdot 10^{-06} \text{ cm/s}$

Tabla 5.11. Concentración promedio de Amoxicilina remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal (duodeno) de seis ratas a distintos tiempos de toma de muestra. Se obtiene tras la perfusión de una solución de Amoxicilina a una concentración de 100 μM en ratas macho de raza Wistar.

En la tabla 5.12, se muestra el análisis de varianza de un factor correspondiente a las constantes de absorción de Amoxicilina en las diferentes condiciones del estudio.

Amoxicilina 100 μM	
Prueba de Levene	Varianzas homogéneas
Prueba paramétrica NG-G	S

Tabla 5.12. Prueba t-Student correspondiente a las permeabilidades de Amoxicilina en ausencia (NG) y presencia de *Giardia* 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

La prueba estadística de Levene determina si existe homogeneidad de varianzas entre los individuos dentro del mismo grupo. Si existe homogeneidad se aplicará una prueba de comparación de medias paramétrica. En caso contrario se realizará la comparación mediante una prueba estadística no paramétrica. En cada caso se indicará en la tabla la comparación realizada.

Como podemos ver en la gráfica, la constante aparente de velocidad de absorción de la Amoxicilina disminuye en presencia de *Giardia intestinalis*. Los resultados de la prueba t de Student demuestran que estas diferencias son estadísticamente significativas. Esto puede ser debido al impedimento estérico que produce el parásito en la unión entre Amoxicilina y los transportadores implicados o a un posible cambio de conformación de los mismos que dificulte su paso a través de la membrana, tal como sugieren los hallazgos disponibles en la bibliografía²⁸⁹.

1.2. Paracetamol

La figura 5.2 representa la constante aparente de velocidad de absorción de Paracetamol a través del intestino de rata Wistar, tanto en ausencia como en presencia de *G. intestinalis*.

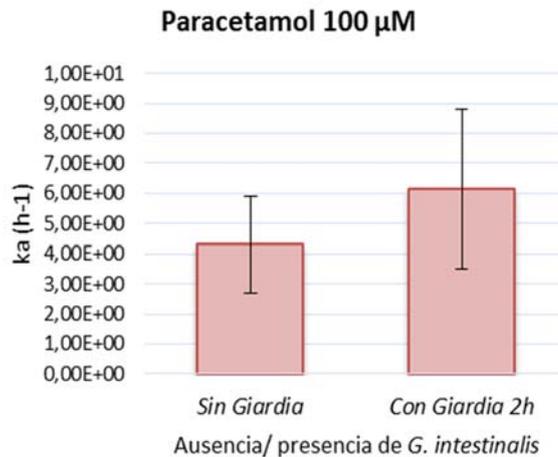


Figura 5.2. Representación gráfica de la constante de velocidad de absorción de Paracetamol obtenida en las distintas condiciones del ensayo.

La tabla 5.13, muestra el resumen de las concentraciones experimentales de Paracetamol en el lumen intestinal (duodeno) de rata Wistar a distintos tiempos de toma de muestra.

Paracetamol 100 μM		
Tiempo (min)	Concentraciones promedio remanentes en lumen duodenal ($\mu\text{g/ml}$)	
	Rata Wistar macho	
	Sin <i>Giardia</i>	Con <i>Giardia</i>
5	28,10	17,02
10	22,67	10,23
15	17,82	5,84
20	13,71	4,07
25	10,12	3,43
30	6,34	2,62
$K_{ap} \pm \text{DE}$	$4,31 \pm 1,61 \text{ h}^{-1}$ (37,35%)	$6,15 \pm 2,65 \text{ h}^{-1}$ (43,08%)
$P_{eff} \pm \text{DE}$	$1,51 \cdot 10^{-04} \pm 5,64 \cdot 10^{-05} \text{ cm/s}$	$2,16 \cdot 10^{-04} \pm 9,30 \cdot 10^{-05} \text{ cm/s}$

Tabla 5.13. Concentración promedio de Paracetamol remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal (duodeno) de seis ratas a distintos tiempos de toma de muestra. Se obtiene tras la perfusión de una solución de Paracetamol a una concentración de 100 μM en ratas macho de raza Wistar.

En la tabla 5.14, se muestra el análisis de varianza de un factor correspondiente a las permeabilidades de Paracetamol en las diferentes condiciones del estudio.

Paracetamol 100 μM	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica NG-G	NS

Tabla 5.14. Prueba t-student correspondiente a las permeabilidades de Paracetamol en ausencia (NG) y presencia de *Giardia* 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

La gráfica y la tabla presentadas muestran que en presencia de *Giardia Intestinalis* aumenta la constante aparente de velocidad de

absorción (k_a) del Paracetamol. No obstante, los resultados de la prueba t de Student demuestran que no existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los valores de permeabilidad obtenidos. Esto puede ser debido a la alta variabilidad en los resultados de los ensayos en presencia del parásito.

A la vista de los resultados, se puede indicar que el método *in situ* ha sido capaz de reproducir los resultados publicados por Craft y col.²⁸⁹ en los que se observaba una disminución en los niveles plasmáticos de antibióticos en pacientes y animales infectados por *G. intestinalis* así como datos clínicos del Servicio de Pediatría de diversos hospitales.

2. Ensayos *in vitro*

Aunque los resultados obtenidos con el método *in situ* son muy satisfactorios para evaluar el efecto de *G. intestinalis* en la absorción de fármacos, supone el uso de un gran número de animales de experimentación. Nuestro grupo de investigación está plenamente comprometido con la política de las 3Rs y por ello se decidió poner en marcha un método *in vitro* que permitiera predecir de manera sencilla el efecto de la colonización del parásito en la absorción de fármacos.

2.1. Puesta a punto del método *in vitro*

2.1.1 Estudios con fármacos modelo

Para poner a punto el nuevo método *in vitro*, hay que diseñar ensayos que nos permitan seleccionar las condiciones óptimas con las

que llevar a cabo los experimentos. Estas condiciones deben permitir reproducir los resultados *in situ* obtenidos previamente. Para ello se utilizaron compuestos patrón, ampliamente estudiados por nuestro grupo de trabajo.

Para optimizar el método *in vitro* hubo que seleccionar dos parámetros: la concentración de *G. intestinalis* y el tiempo de incubación de la misma sobre la monocapa de células Caco-2.

Respecto a la cantidad de parásito se comprobó, tras realizar ensayos a varias concentraciones, que la concentración de 400.000 giardias/pocillo era adecuada para tapizar la monocapa celular tras 2 horas de incubación, sin embargo concentraciones menores (100.000 giardias/pocillo y 250.000 giardias/pocillo) resultaron insuficientes para recubrir toda la monocapa y concentraciones superiores dañaban las células

Para determinar el tiempo de incubación del parásito con la monocapa se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), de la monocapa de células Caco-2, al inicio y final del experimento. Los pocillos con valores inferiores a $350\text{-}380\Omega\text{-cm}^2$ fueron descartados por ser indicativo de que la monocapa no está perfectamente formada en toda su superficie, es decir, que las células no han confluido de manera homogénea, o también puede ser debido al deterioro de la membrana tras el experimento. De este modo, los resultados no serían representativos de la realidad fisiológica, ya que la membrana no simularía la barrera intestinal y se obtendrían valores de permeabilidad superiores a los valores reales. Además de ello, se realizaron ensayos típicos de permeabilidad con fármacos modelo

-Metoprolol

En la figura 5.3 se representan las permeabilidades de Metoprolol obtenidas en las distintas condiciones del ensayo, tanto en ausencia como en presencia de *G. intestinalis* durante 2 y 24 horas antes del experimento.

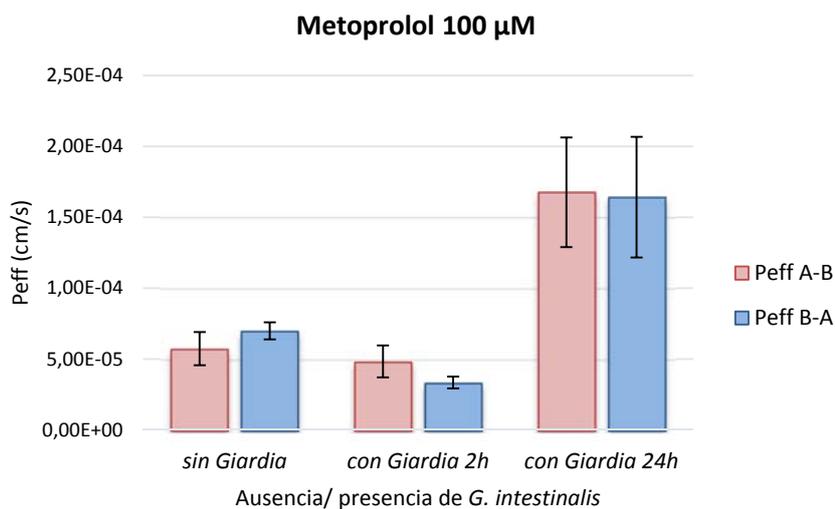


Figura 5.3. Representación gráfica de las permeabilidades de Metoprolol obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En las tablas 5.15, 5.16 y 5.17 se detallan los valores de las cantidades en el compartimento receptor a los tiempos de toma de muestra y en ambos sentidos de transporte (Apical-Basal y Basal-Apical), obtenidos en los ensayos *in vitro* realizados con Metoprolol.

Metoprolol 100 μM sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	2,28	2,30	2,68	2,77	3,70	4,49
30	2,49	3,56	5,00	6,00	5,36	6,18
60	4,80	4,88	5,07	7,84	7,41	7,91
90	4,95	5,61	5,88	8,70	8,81	9,05
P (cm/s)	$4,54 \cdot 10^{-05}$	$5,77 \cdot 10^{-05}$	$6,88 \cdot 10^{-05}$	$7,62 \cdot 10^{-05}$	$6,42 \cdot 10^{-05}$	$6,91 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$5,73 \cdot 10^{-05} \pm 1,17 \cdot 10^{-05}$ (20,47%)			$6,98 \cdot 10^{-05} \pm 6,04 \cdot 10^{-06}$ (8,65%)		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,22$						

Tabla 5.15. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Metoprolol 100 μM en monocapas Caco-2.

Metoprolol 100 μM con <i>G. intestinalis</i> 2 horas						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	0,81	0,53	0,87	0,85	0,69	0,91
30	2,37	1,80	1,96	2,01	1,54	2,01
60	3,87	3,15	4,03	4,44	4,42	4,35
90	5,25	4,55	5,12	5,54	5,61	5,39
P (cm/s)	$5,09 \cdot 10^{-05}$	$4,31 \cdot 10^{-05}$	$5,07 \cdot 10^{-05}$	$3,32 \cdot 10^{-05}$	$3,50 \cdot 10^{-05}$	$3,19 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$4,83 \cdot 10^{-05} \pm 4,47 \cdot 10^{-06}$ (9,26%)			$3,34 \cdot 10^{-05} \pm 1,54 \cdot 10^{-06}$ (4,60%)		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,69$						

Tabla 5.16. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Metoprolol 100 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis* durante 2 horas.

Metoprolol 100 μM con <i>G. intestinalis</i> 24 horas						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	3,21	2,68	2,56	2,98	3,03	2,93
30	5,87	5,39	6,18	5,08	5,30	4,75
60	6,40	6,82	7,40	5,78	5,87	5,98
90	8,12	7,06	7,96	6,11	6,56	6,49
P (cm/s)	$1,54 \cdot 10^{-04}$	$1,38 \cdot 10^{-04}$	$2,11 \cdot 10^{-04}$	$3,54 \cdot 10^{-05}$	$3,93 \cdot 10^{-05}$	$3,92 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$1,68 \cdot 10^{-04} \pm 3,87 \cdot 10^{-05}$ (23,08%)			$1,64 \cdot 10^{-04} \pm 4,26 \cdot 10^{-06}$ (25,94%)		
P_{BA}/P_{AB} = 0,23						

Tabla 5.17. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar Metoprolol 100 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis* durante 24 horas.

En las tablas 5.18, 5.19 y 5.20 se muestran los valores de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial de la monocapa de células Caco-2 al inicio del ensayo (TEER inicial), y tras finalizar el ensayo (TEER final).

Metoprolol 100 μM						
TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Pocillos					
	1	2	3	4	5	6
TEER inicial	1761,9	1883,7	1881,6	1795,5	1780,8	1799,7
TEER final	1474,2	1461,6	1566,6	1604,4	1373,4	1604,4

Tabla 5.18. Medidas de resistencia eléctrica transepitelial de la monocapa de células Caco-2 para Metoprolol 100 μM en ausencia de *Giardia intestinalis*.

Metoprolol 100 μ M con <i>G. intestinalis</i> 2 horas						
TEER (Ω ·cm ²)	Pocillos					
	1	2	3	4	5	6
TEER inicial	1528,8	1711,5	1512	1772,4	1669,5	1692,6
TEER final	1197	1302	1178,1	1356,6	1295,7	1392,3

Tabla 5.19. Medidas de resistencia eléctrica transepitelial de la monocapa de células Caco-2 para Metoprolol 100 μ M en presencia de *Giardia intestinalis* sembrada 2 horas antes del ensayo.

Metoprolol 100 μ M con <i>G. intestinalis</i> 24 horas						
TEER (Ω ·cm ²)	Pocillos					
	1	2	3	4	5	6
TEER inicial	40,9*	92,4*	107,5*	93,0*	95,6*	79,4*
TEER final	28,3*	92,6*	109,8*	86,9*	80,8*	77,4*

Tabla 5.20. Medidas de resistencia eléctrica transepitelial de la monocapa de células Caco-2 para Metoprolol 100 μ M en presencia de *Giardia intestinalis* sembrada 24 horas antes del ensayo. El asterisco indica valores de TEER <350-380 Ω ·cm², por tanto deterioro de la membrana.

En la tabla 5.21, se muestra el análisis de varianza de un factor correspondiente a las permeabilidades de Metoprolol en las diferentes condiciones del estudio.

Metoprolol 100 μ M	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-Pba	NS
Prueba no paramétrica PabG(2h)-PbaG (2h)	NS
Prueba no paramétrica PabG (24h)-PbaG (24h)	NS
Prueba no paramétrica Pab-PabG (2h)	NS
Prueba no paramétrica Pab-PabG (24h)	S
Prueba no paramétrica Pba-Pba (2h)	S
Prueba no paramétrica Pba-Pba (24h)	S

Tabla 5.21. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad apical-basal (Pab) y permeabilidad basal-apical (Pba) de Metoprolol en ausencia y presencia de *Giardia* (G) 2 horas (2h) y 24 horas (24h). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados recogidos en la gráfica y en la tabla muestran que, como cabía esperar, la permeabilidad Pab y Pba de Metoprolol son similares como corresponde a un fármaco que se absorbe por difusión pasiva. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA), demuestran que no existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los valores de permeabilidad obtenidos en ambas direcciones tanto en ausencia como en presencia de *Giardia*.

En presencia de *Giardia intestinalis* incubada durante 2 horas, se observa una pequeña disminución de la permeabilidad en ambos sentidos aunque esta diferencia solo es estadísticamente significativa en sentido Pba. Esta disminución puede atribuirse, al impedimento estérico que bloquea de manera inespecífica el paso del fármaco a través de la barrera intestinal.

La permeabilidad en ambos sentidos, cuando se ha co-incubado la monocapa con el parásito durante 24 horas, aumenta de manera drástica. Este dato junto con los bajos valores de resistencia eléctrica transepitelial (TEER), indican que a este tiempo de ensayo la monocapa está dañada y el fármaco atraviesa con mayor facilidad la barrera intestinal y lo hace de manera similar en ambas direcciones. Este daño ya se preveía, debido a que los valores de TEER que se miden antes de comenzar el ensayo indicaban que la monocapa no estaba en buenas condiciones para simular la barrera intestinal y obtener resultados reproducibles y extrapolables a lo que pudiera ocurrir en un experimento *in situ* o en humanos en presencia del parásito.

Las monocapas Caco-2 son un sistema *in vitro* fácilmente alterable con cambios de excesiva concentración del compuesto, temperatura o composición del vehículo en el que se disuelve el fármaco,

entre otros. La medida de resistencia transepitelial nos aporta información, antes y después del experimento, para decidir si los datos obtenidos son fiables o no.

-Rodamina

En la figura 5.4 se representan las permeabilidades de Rodamina obtenidas en las distintas condiciones del ensayo, tanto en ausencia como en presencia de *G. intestinalis* durante 2 horas y 24 horas antes del experimento.

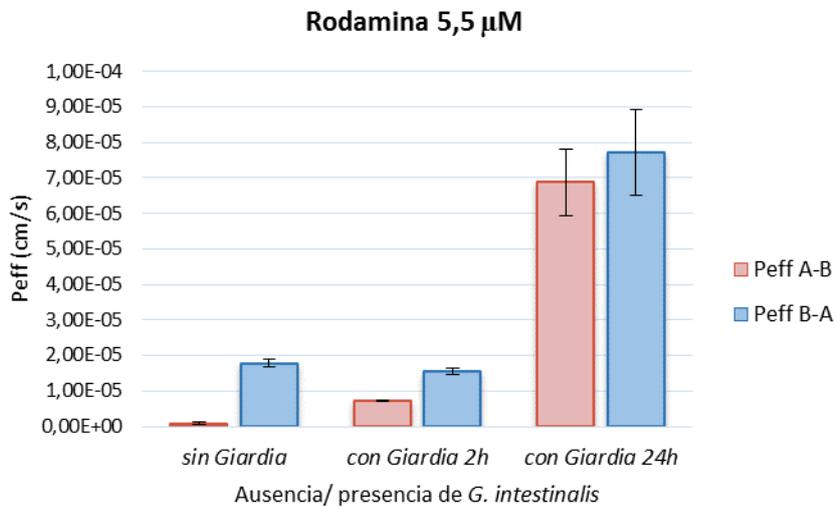


Figura 5.4. Representación gráfica de las permeabilidades de Rodamina obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En las tablas 5.22, 5.23 y 5.24 se detallan los valores de las cantidades en el compartimento receptor a los tiempos de toma de muestra y en ambos sentidos de transporte (Apical-Basal y Basal-Apical) obtenidos en los ensayos *in vitro* realizados en Rodamina.

Rodamina 5,5 μM sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	$2,37 \cdot 10^{-02}$	$4,31 \cdot 10^{-02}$	$2,41 \cdot 10^{-02}$	$3,51 \cdot 10^{-02}$	$3,49 \cdot 10^{-02}$	$4,49 \cdot 10^{-02}$
30	$2,41 \cdot 10^{-02}$	$4,00 \cdot 10^{-02}$	$2,44 \cdot 10^{-02}$	$1,06 \cdot 10^{-01}$	$9,98 \cdot 10^{-02}$	$1,07 \cdot 10^{-01}$
60	$2,47 \cdot 10^{-02}$	$3,84 \cdot 10^{-02}$	$2,48 \cdot 10^{-02}$	$1,42 \cdot 10^{-01}$	$1,62 \cdot 10^{-01}$	$1,55 \cdot 10^{-01}$
90	$2,52 \cdot 10^{-02}$	$3,69 \cdot 10^{-02}$	$2,51 \cdot 10^{-02}$	$1,80 \cdot 10^{-01}$	$1,93 \cdot 10^{-01}$	$1,95 \cdot 10^{-01}$
P (cm/s)	$8,05 \cdot 10^{-07}$	$1,04 \cdot 10^{-06}$	$7,49 \cdot 10^{-07}$	$1,67 \cdot 10^{-05}$	$1,89 \cdot 10^{-05}$	$1,79 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$8,65 \cdot 10^{-07} \pm 1,55 \cdot 10^{-07}$ (17,94%)			$1,79 \cdot 10^{-05} \pm 1,09 \cdot 10^{-06}$ (6,11%)		
P_{BA}/P_{AB} = 20,64						

Tabla 5.22. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar Rodamina 5,5 μM en monocapas Caco-2.

Rodamina 5,5 μM con <i>G. intestinalis</i> 2 horas						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	$2,68 \cdot 10^{-02}$	$2,46 \cdot 10^{-02}$	$2,75 \cdot 10^{-02}$	$3,52 \cdot 10^{-02}$	$3,43 \cdot 10^{-02}$	$3,02 \cdot 10^{-02}$
30	$4,40 \cdot 10^{-02}$	$4,32 \cdot 10^{-02}$	$4,47 \cdot 10^{-02}$	$7,19 \cdot 10^{-02}$	$8,82 \cdot 10^{-02}$	$9,09 \cdot 10^{-02}$
60	$5,76 \cdot 10^{-02}$	$5,38 \cdot 10^{-02}$	$6,40 \cdot 10^{-02}$	$1,30 \cdot 10^{-01}$	$1,48 \cdot 10^{-01}$	$1,28 \cdot 10^{-01}$
90	$6,76 \cdot 10^{-02}$	$7,61 \cdot 10^{-02}$	$6,67 \cdot 10^{-02}$	$1,59 \cdot 10^{-01}$	$1,70 \cdot 10^{-01}$	$1,74 \cdot 10^{-01}$
P (cm/s)	$6,72 \cdot 10^{-06}$	$7,83 \cdot 10^{-06}$	$6,88 \cdot 10^{-06}$	$1,44 \cdot 10^{-05}$	$1,62 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$7,14 \cdot 10^{-06} \pm 1,16 \cdot 10^{-07}$ (1,62%)			$1,55 \cdot 10^{-05} \pm 9,83 \cdot 10^{-07}$ (6,33%)		
P_{BA}/P_{AB} = 2,17						

Tabla 5.23. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar Rodamina 5,5 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis* durante 2 horas.

Rodamina 5,5 μM con <i>G. intestinalis</i> 24 horas						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	$1,23 \cdot 10^{-01}$	$5,47 \cdot 10^{-02}$	$9,89 \cdot 10^{-02}$	$1,06 \cdot 10^{-01}$	$9,46 \cdot 10^{-02}$	$1,36 \cdot 10^{-01}$
30	$1,55 \cdot 10^{-01}$	$1,51 \cdot 10^{-01}$	$1,55 \cdot 10^{-01}$	$2,31 \cdot 10^{-01}$	$2,01 \cdot 10^{-01}$	$2,30 \cdot 10^{-01}$
60	$2,36 \cdot 10^{-01}$	$2,38 \cdot 10^{-01}$	$2,62 \cdot 10^{-01}$	$3,51 \cdot 10^{-01}$	$3,37 \cdot 10^{-01}$	$4,00 \cdot 10^{-01}$
90	$2,87 \cdot 10^{-01}$	$2,97 \cdot 10^{-01}$	$3,01 \cdot 10^{-01}$	$4,22 \cdot 10^{-01}$	$4,29 \cdot 10^{-01}$	$4,96 \cdot 10^{-01}$
P (cm/s)	$5,79 \cdot 10^{-05}$	$7,48 \cdot 10^{-05}$	$7,36 \cdot 10^{-05}$	$6,93 \cdot 10^{-05}$	$6,91 \cdot 10^{-05}$	$9,03 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$6,88 \cdot 10^{-05} \pm 9,41 \cdot 10^{-06}$ (13,69%)			$7,62 \cdot 10^{-05} \pm 1,22 \cdot 10^{-05}$ (16,01%)		
P_{BA}/P_{AB} = 1,12						

Tabla 5.24. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar Rodamina 5,5 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis* durante 24 horas.

En las tablas 5.25, 5.26 y 5.27 se muestran los valores de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial de la monocapa de células Caco-2 al inicio del ensayo (TEER inicial), y tras finalizar el ensayo (TEER final).

Rodamina 5,5 μM						
TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Pocillos					
	1	2	3	4	5	6
TEER inicial	1688,4	1856,4	1831,2	1644,3	1703,1	1667,4
TEER final	1299,9	1218	1302	1341,9	12915	1283,1

Tabla 5.25. Medidas de resistencia de la monocapa para Rodamina 5,5 μM en ausencia de *Giardia intestinalis*.

Rodamina 5,5 μM con <i>G. intestinalis</i> 2 horas						
TEER ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	Pocillos					
	1	2	3	4	5	6
TEER inicial	1814,4	1885,8	1858,5	1866,9	1845,9	1789,2
TEER final	1400,7	1188,6	1207,5	1236,9	1003,8	1180,2

Tabla 5.26. Medidas de resistencia de la monocapa para Rodamina 5,5 μM en presencia de *Giardia intestinalis* sembrada 2 horas antes del ensayo.

Rodamina 5,5 μM con <i>G. intestinalis</i> 24 horas						
TEER ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	Pocillos					
	1	2	3	4	5	6
TEER inicial	86,1*	62,4*	74,6*	56,3*	59,4*	55,6*
TEER final	81,9*	64,6*	68,0*	54,1*	63,6*	52,0*

Tabla 5.27. Medidas de resistencia de la monocapa para Rodamina 5,5 μM en presencia de *Giardia intestinalis* sembrada 24 horas antes del ensayo. El asterisco indica valores de TEER $<350\text{-}380 \Omega\cdot\text{cm}^2$, por tanto deterioro de la membrana.

En la tabla 5.28, se muestra el análisis de varianza de un factor correspondiente a las permeabilidades de Rodamina en las diferentes condiciones del estudio.

Rodamina 5,5 μM	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-Pba	S
Prueba no paramétrica PabG(2h)-PbaG (2h)	S
Prueba no paramétrica PabG (24h)-PbaG (24h)	NS
Prueba no paramétrica Pab-PabG (2h)	S
Prueba no paramétrica Pab-PabG (24h)	S
Prueba no paramétrica Pba-Pba (2h)	S
Prueba no paramétrica Pba-Pba (24h)	S

Tabla 5.28. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad apical-basal (Pab) y permeabilidad basal-apical (Pba) de Rodamina en ausencia y presencia de *Giardia* (G) 2 horas (2h) y 24 horas (24h). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los valores de permeabilidad obtenidos en ambas direcciones tanto en ausencia como en presencia de *Giardia* incubada 2 horas antes del ensayo. Esto es debido a los transportadores de secreción (en concreto, glicoproteína P) presentes en las monocapas Caco-2, los cuales están implicados en el paso de Rodamina a través de la barrera intestinal. Se obtiene un perfil típico de este tipo de fármacos, donde la Pab es menor que la Pba.

Cuando se compara Pab en ausencia y presencia del parásito durante 2 horas, también se observan diferencias estadísticamente significativas. Esto puede ser debido a que *G. intestinalis* ejerza un bloqueo en los transportadores de secreción, por lo que se obtiene que PabG(2h) es mayor que la Pab y la PbaG(2h) es menor que la Pba o que el daño que ejerce el parásito en la membrana provoque un cambio conformacional de la proteína transportadora que dificulte el acceso del fármaco a los puntos de unión.

Al comparar las permeabilidades en cualquier dirección en ausencia y presencia del parásito durante 24 horas, existen diferencias estadísticamente significativas, esto es debido al incremento drástico de la permeabilidad al estar dañada la monocapa. Cuando se comparan los valores de Pab y Pba en presencia del parásito durante 24 horas, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas, ya que la monocapa está dañada y el fármaco atraviesa con mayor facilidad la barrera intestinal. Este hecho se corroboró con los datos de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial obtenidos para cada pocillo en los que se había incubado el parásito durante 24 horas.

-Lucifer Yellow

En la figura 5.5 se representan las permeabilidades de Lucifer-Yellow obtenidas en las distintas condiciones del ensayo, tanto en ausencia como en presencia de *G. intestinalis* durante 2 y 24 horas antes del experimento.

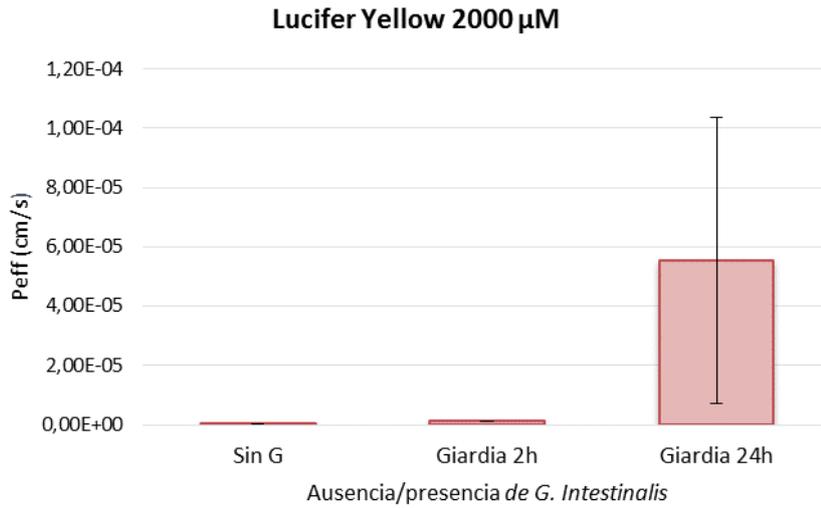


Figura 5.5. Representación gráfica de las permeabilidades de Lucifer Yellow obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En las tablas 5.29, 5.30 y 5.31 se detallan los valores de las cantidades en el compartimento receptor a los tiempos de toma de muestras, en sentido Apical-Basal.

Lucifer Yellow 2000 μM sin <i>G. intestinalis</i>			
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)		
	Transporte apical-basal		
	A	B	C
15	0,55	0,46	0,57
30	0,87	0,52	0,98
60	1,12	1,07	1,88
90	1,88	1,18	1,94
P (cm/s)	$1,86 \cdot 10^{-07}$	$1,26 \cdot 10^{-07}$	$1,45 \cdot 10^{-07}$
P \pm DE (cm/s)	$1,52 \cdot 10^{-07} \pm 3,08 \cdot 10^{-08}$ (20,23%)		

Tabla 5.29. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) obtenidas tras administrar Lucifer-Yellow 2000 μM en monocapas Caco-2.

Lucifer Yellow 2000 μM con <i>G. intestinalis</i> 2 horas			
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)		
	Transporte apical-basal		
	A	B	C
15	8,06	7,96	7,43
30	8,62	9,14	8,01
60	9,13	9,27	8,62
90	9,59	9,80	8,96
P (cm/s)	$1,07 \cdot 10^{-06}$	$1,14 \cdot 10^{-06}$	$1,05 \cdot 10^{-06}$
P \pm DE (cm/s)	$1,09 \cdot 10^{-06} \pm 4,87 \cdot 10^{-08}$ (4,47%)		

Tabla 5.30. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) obtenidas tras administrar Lucifer-Yellow 2000 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis* durante 2 horas.

Lucifer Yellow 2000 μM con <i>G. intestinalis</i> 24 horas			
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)		
	Transporte apical-basal		
	A	B	C
15	7,43	111,49	59,46
30	14,81	118,08	66,44
60	21,83	120,08	70,96
90	376,21	5337,60	2856,91
P (cm/s)	$7,36 \cdot 10^{-06}$	$1,04 \cdot 10^{-04}$	$5,55 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$5,55 \cdot 10^{-05} \pm 4,82 \cdot 10^{-05}$ (86,85%)		

Tabla 5.31. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) obtenidas tras administrar Lucifer-Yellow 2000 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis* durante 24 horas.

En las tablas 5.32, 5.33 y 5.34 se muestran los valores de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial de la monocapa de células Caco-2 al inicio del ensayo (TEER inicial), y tras finalizar el ensayo (TEER final).

Lucifer Yellow 2000 μM			
TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Pocillos		
	1	2	3
TEER inicial	1755,6	1806	1927,8
TEER final	1659	1625,4	1701

Tabla 5.32. Medidas de resistencia de la monocapa para Lucifer Yellow 2000 μM en ausencia de *Giardia intestinalis*.

Lucifer Yellow 2000 μM con <i>G. intestinalis</i> 2 horas			
TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Pocillos		
	1	2	3
TEER inicial	1478,4	1822,8	1768,2
TEER final	1352,4	1575	1495,2

Tabla 5.33. Medidas de resistencias de la monocapa para Lucifer Yellow 2000 μM en presencia de *Giardia intestinalis* sembrada 2 horas antes del ensayo.

Lucifer Yellow 2000 μM con <i>G. intestinalis</i> 24 horas			
TEER ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	Pocillos		
	1	2	3
TEER inicial	130,2*	87,2*	101,1*
TEER final	125,5*	92,4*	99,4*

Tabla 5.34. Medidas de resistencias de la monocapa para Lucifer Yellow 2000 μM en presencia de *Giardia intestinalis* sembrada 24 horas antes del ensayo. El asterisco indica valores de TEER $<350\text{-}380 \Omega\cdot\text{cm}^2$, por tanto deterioro de la membrana.

En la tabla 5.35 se muestra el análisis de varianza de un factor correspondiente a las permeabilidades de Lucifer Yellow en las diferentes condiciones del estudio.

Lucifer Yellow 2000 μM	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-PabG (2h)	S
Prueba no paramétrica Pab-PabG (24h)	S

Tabla 5.35. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad apical-basal (Pab) de Lucifer Yellow en ausencia y presencia de *Giardia* (G) 2 horas (2h) y 24 horas (24h). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los valores de permeabilidad obtenidos en ausencia y en presencia de *Giardia* a cualquier tiempo de incubación. Esto puede ser debido al daño que provoca el parásito en las uniones intercelulares. Tras 24 horas de incubación con el parásito la permeabilidad, al igual que con los otros compuestos ensayados, aumenta de forma anormal debido a que la monocapa está dañada (dato corroborado con las medidas de resistencia eléctrica transepitelial obtenidas).

2.1.2. Estudios de daño celular

- Resultados PCR

Enzimas antioxidantes

En las figuras 5.6 a 5.9 se observa la expresión relativa de enzimas antioxidantes (Superóxido dismutasa 1 y 2, Glutatiión Peroxidasa y Catalasa) en las células Caco-2 tanto en ausencia como en presencia de *Giardia* incubada durante 2 o 24 horas antes de experimento.

Superóxido dismutasa 1 (SOD1)

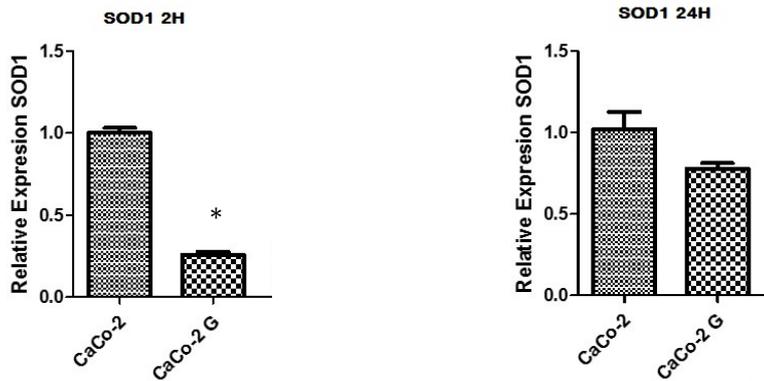


Figura 5.6. Expresión relativa de la enzima Superóxido dismutasa 1 (SOD1) en células Caco-2, en ausencia y presencia de *G. intestinalis* a las 2 y 24 horas de incubación. * $p < 0.05$ Newman-keuls Test.

Superóxido dismutasa 2 (SOD2)

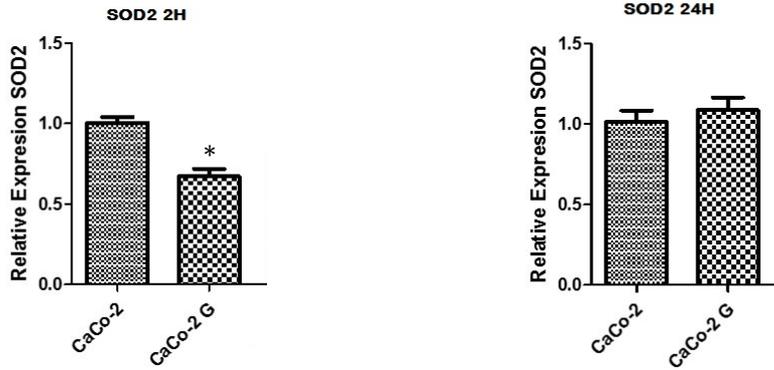


Figura 5.7. Expresión relativa de la enzima Superóxido dismutasa 2 (SOD2) en células Caco-2, en ausencia y presencia de *G. intestinalis* a las 2 y 24 horas de incubación. * $p < 0.05$ Newman-keuls Test.

Glutación peroxidasa (GPX1)

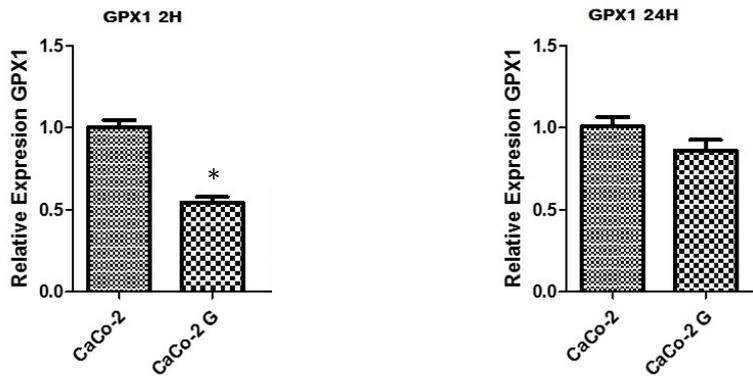


Figura 5.8. Expresión relativa de la enzima Glutación Peroxidasa (GPX1) en células Caco-2, en ausencia y presencia de *G. intestinalis* a las 2 y 24 horas de incubación. * $p < 0.05$ Newman-keuls Test.

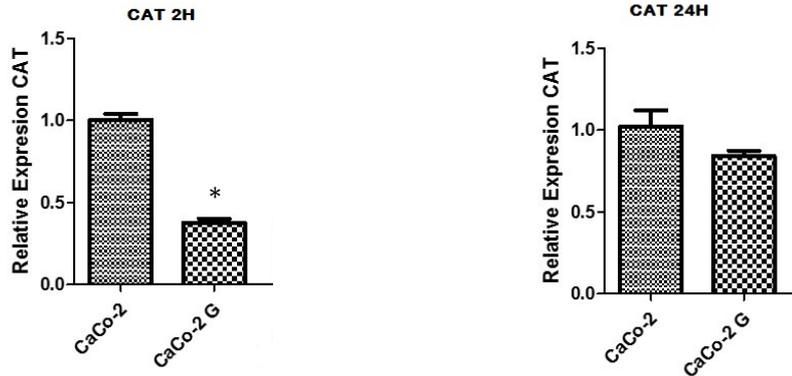
Catalasa (CAT)

Figura 5.9. Expresión relativa de la enzima Catalasa (CAT) en células Caco-2, en ausencia y presencia de *G. intestinalis* a las 2 y 24 horas de incubación. * $p < 0.05$ Newman-keuls Test.

Como se puede observar, con un tiempo de incubación de las células Caco-2 con *Giardia* de 2 horas las células tienen disminuida su capacidad de defensa antioxidante, ya que los niveles de expresión de todas las enzimas estudiadas están disminuidos. A las 24 horas, el número de células Caco-2 supervivientes era menor, pero aquellas que habían sobrevivido a la infección mostraban intactos sus mecanismos de defensa *in vitro*. Probablemente, este es un mecanismo de respuesta al estrés de las células Caco-2 supervivientes frente a la co-incubación con *Giardia*.

-Enzimas de reparación del ADN

En las figuras 5.10 a 5.12 se observa la expresión relativa de enzimas antioxidantes en las células Caco-2 tanto en ausencia como en presencia de *Giardia* incubada durante 2 o 24 horas antes de experimento. Estas enzimas son: Oxoguanina Glicosilasa, Poli-ADP Ribosa Polimerasa y Recombinasa de ADN.

Oxoguanina Glicosilasa (OGG1)

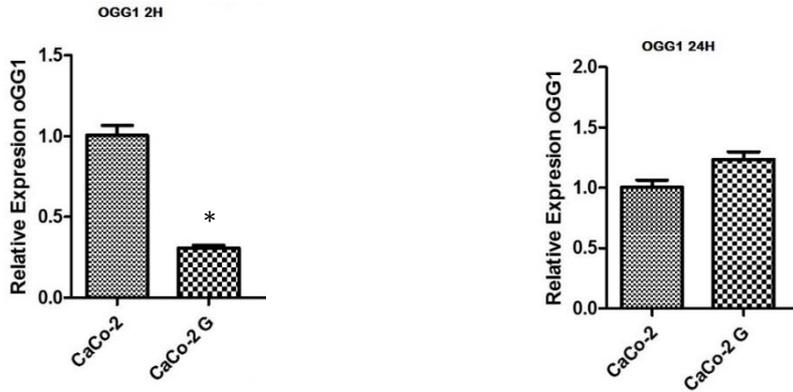


Figura 5.10 Expresión relativa de la enzima Oxoguanina Glicosilasa (OGG1) en células Caco-2, en ausencia y presencia de *G. intestinalis* a las 2 y 24 horas de incubación. * $p < 0.05$ Newman-keuls Test.

Poli-ADP Ribosa Polimerasa (PARP1)

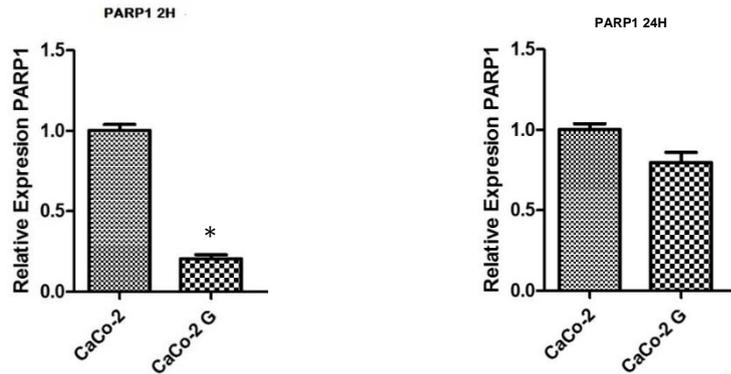
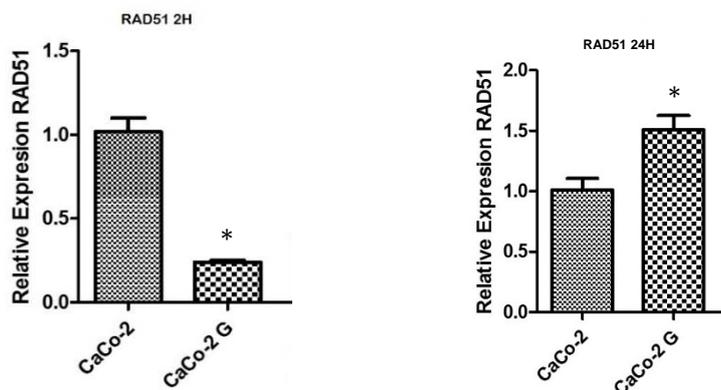


Figura 5.11. Expresión relativa de la enzima Poli-ADP Ribosa Polimerasa (PARP1) en células Caco-2, en ausencia y presencia de *G. intestinalis* a las 2 y 24 horas de incubación. * $p < 0.05$ Newman-keuls Test.

Recombinasa de ADN (RAD51)



Figuras 5.12. Expresión relativa de la enzima Recombinasa de ADN (RAD51) en células Caco-2, en ausencia y presencia de *G. intestinalis* a las 2 y 24 horas de incubación. * $p < 0.05$ Newman-keuls Test.

Los resultados son similares a los observados para los mecanismos de defensa antioxidante celular. A tiempos de 2 horas de incubación con el parásito, las enzimas de reparación de ADN de las células Caco-2 tienen disminuida su expresión, hecho que indica que las células Caco-2 todavía no han activado los mecanismos de reparación frente al daño al ADN a las 2 horas. Sin embargo, la incubación de las células Caco-2 con *Giardia* durante 24 horas sí que produjo que las células supervivientes incrementaran su capacidad de respuesta al daño del ADN.

-Resultados Western blot

En la figura 5.13, se muestran los resultados de la técnica western blot realizada para medir la expresión de las enzimas que protegen del daño oxidativo en giardiasis. Se analizaron dos de las enzimas inducibles en condiciones de estrés oxidativo (MnSOD y Catalasa).

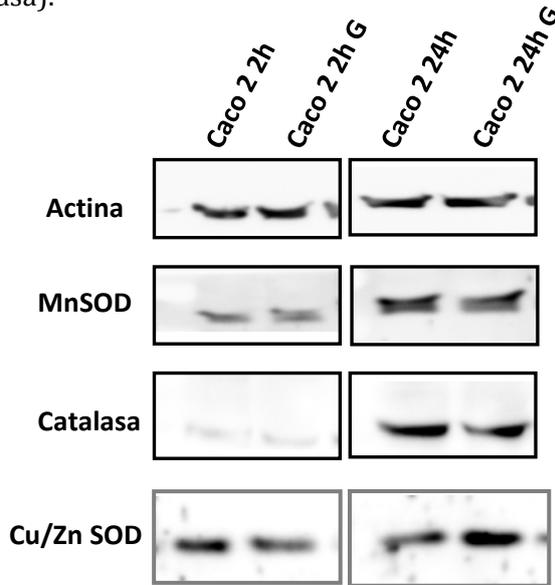


Figura 5.13. Expresión de las enzimas antioxidantes Superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) en células Caco-2, en ausencia y presencia de *G. intestinalis* a las 2 y 24 horas de incubación.

Se observa que la expresión de las enzimas SOD (sobre todo CuZnSOD) y catalasa es mayor a las 24 horas de incubación con *Giardia*. Con un tiempo de incubación de 2 horas las células tienen disminuida su capacidad de defensa, ya que los niveles de expresión de estas enzimas antioxidantes están ligeramente disminuidos por lo cual las células Caco-

2 serían más susceptibles a cualquier daño. A las 24 horas, las células Caco-2 que habían superado la infección mostraban, *in vitro*, una recuperación de su función de defensa.

Estos resultados, unidos a que la medida de TEER indica que la monocapa a 24 horas está deteriorada, nos hace pensar que el ensayo a 2 horas es más representativo de la situación fisiológica real. Por tanto, las condiciones óptimas para realizar los ensayos fueron: 400.000 giardias/pocillo preincubadas con la monocapa de células Caco-2 dos horas antes del experimento. La bibliografía recoge varios modelos de co-cultivo caco-2/*Giardia*. Algunos de ellos con tiempos de co-incubación menor a 24 horas^{96,402,253,403} y otros, como el diseñado por Fisher et al.⁵⁴, que consiste en un tricultivo caco-2/*Giardia*/IC-21 y que permite mayores tiempos de incubación, modificando la composición del medio de cultivo. Estos métodos más complejos son útiles para estudiar los cambios en la expresión de proteínas, la aparición de mediadores apoptóticos, la activación de rutas de señalización, etc. Sin embargo, dado que el problema principal que produce la giardiasis es la modificación de la absorción de nutrientes y lógicamente también de fármacos, en nuestro grupo se ha intentado desarrollar un modelo sencillo que permita valorar de manera efectiva si la absorción de los fármacos se va a ver afectada en presencia parásito.

2.2. Validación del método *in vitro*

Para validar el nuevo método *in vitro*, se realizaron ensayos con los fármacos estudiados previamente *in situ*: Amoxicilina y Paracetamol.

2.2.1. Amoxicilina

La Amoxicilina es uno de los fármacos más utilizados para tratar infecciones del aparato respiratorio, otitis e infección del tracto genitourinario. La sobredosificación produce cristaluria y diarrea. Las dosis subterapéuticas supondrían un fracaso en el tratamiento, pudiendo causar resistencias.

Las tablas 5.36 y 5.37, que se muestran a continuación, corresponden a las cantidades de Amoxicilina en el compartimiento receptor. A partir de ellas, se calcula la permeabilidad en cada una de las condiciones del ensayo *in vitro*: ausencia y presencia de *G. intestinalis*.

Amoxicilina 100 μM sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	0,40	0,46	0,73	0,76	0,53	0,86
30	1,01	0,83	1,35	1,47	1,41	1,44
60	1,74	1,78	2,55	2,48	2,39	3,07
90	2,50	2,32	2,98	3,91	3,49	4,93
P (cm/s)	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$2,07 \cdot 10^{-05}$	$2,85 \cdot 10^{-05}$	$3,95 \cdot 10^{-05}$	$3,59 \cdot 10^{-05}$	$5,57 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$2,38 \cdot 10^{-05} \pm 4,12 \cdot 10^{-06}$ (17,29%)			$4,37 \cdot 10^{-05} \pm 1,05 \cdot 10^{-05}$ (24,07%)		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,83$						

Tabla 5.36. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Amoxicilina 100 μM en monocapas Caco-2.

Amoxicilina 100 μ M con <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-
P (cm/s)	-	-	-	-	-	-
P \pm DE (cm/s)	-			-		
$P_{BA}/P_{AB} = -$						

Tabla 5.37. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Amoxicilina 100 μ M en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis*. Símbolo (-): bajo límite de detección y cuantificación.

La comparación de los perfiles obtenidos en cada condición se representa en la figura 5.14.

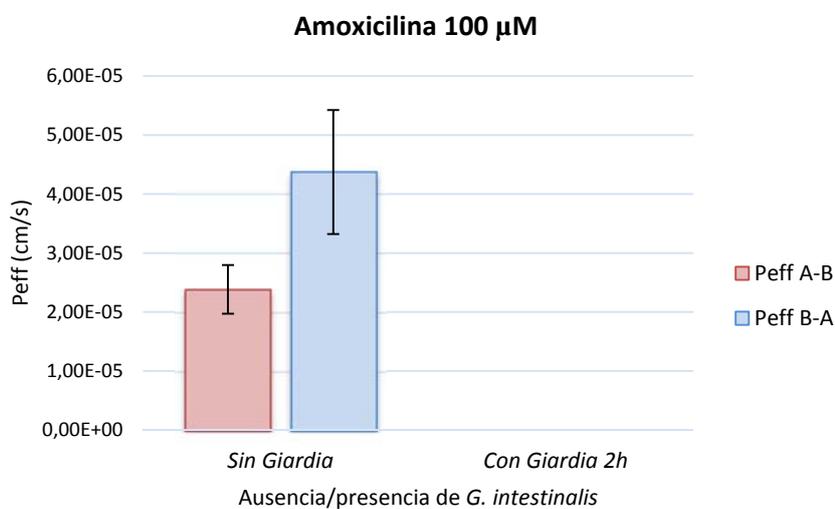


Figura 5.14. Representación gráfica de las permeabilidades de Amoxicilina obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En la tabla 5.38, se muestra el análisis de varianza de un factor, correspondiente a las permeabilidades de Amoxicilina en las diferentes condiciones del estudio.

Amoxicilina 100 μM	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-Pba	S
Prueba no paramétrica PabG-PbaG	S
Prueba no paramétrica Pab-PabG	S
Prueba no paramétrica Pba-PbaG	S

Tabla 5.38. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad Apical-Basal (Pab) y permeabilidad Basal-Apical (Pba) de Amoxicilina en ausencia y presencia de Giardia 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los valores de permeabilidad obtenidos en ambas direcciones, lo cual concuerda con el hecho de que la Amoxicilina presenta un mecanismo combinado de absorción pasiva, activa y transporte de secreción. Cuando comparamos la Pab y Pba en ambas condiciones del ensayo (ausencia y presencia de *Giardia*) se observó una disminución de ambos valores de permeabilidad estadísticamente significativa. La disminución de la permeabilidad, puede ser debida a un bloqueo de los sitios de unión a los transportadores producido por el parásito o a un cambio conformacional de las proteínas transportadoras, unido al impedimento estérico producido por la colonización del parásito. Los resultados obtenidos *in vitro*, que muestran una reducción drástica de absorción de la Amoxicilina, concuerdan con los aportados en la bibliografía²⁸⁹ realizados con ensayos *in vivo*, así como los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con el modelo de infección *in situ*.

Por tanto, si la giardiasis no estuviera diagnosticada en el paciente, existiría un riesgo de que el fármaco no alcanzara niveles terapéuticos y generase resistencias.

2.2.2. Paracetamol

El Paracetamol es el fármaco analgésico y antipirético más utilizado en pediatría, indicado para el tratamiento de la fiebre, la cefalea y el dolor musculoesquelético, entre otros. En el caso del Paracetamol dosis elevadas se relacionan con hepatotoxicidad, mientras que la administración de dosis menores de las necesarias conduciría a no

obtener el efecto terapéutico deseado.

Las tablas 5.39 y 5.40, que se muestran a continuación, corresponden a las cantidades de Paracetamol en el compartimento receptor. A partir de ellas se calcula la permeabilidad en cada una de las condiciones del ensayo *in vitro* (ausencia y presencia de *G. intestinalis*).

Paracetamol 100 μ M sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	1,1	0,9	0,6	1,90	1,92	1,90
30	2,5	2,6	2,3	4,43	4,19	4,31
60	3,8	4,1	3,7	8,11	7,04	7,06
90	5,3	5,9	5,5	10,48	9,86	9,63
P (cm/s)	$1,76 \cdot 10^{-05}$	$2,04 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$3,64 \cdot 10^{-05}$	$3,29 \cdot 10^{-05}$	$3,20 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$1,93 \cdot 10^{-05} \pm 1,52 \cdot 10^{-06}$ (7,88%)			$3,38 \cdot 10^{-05} \pm 2,32 \cdot 10^{-06}$ (6,88%)		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,75$						

Tabla 5.39. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Paracetamol 100 μ M en monocapas Caco-2.

Paracetamol 100 μM con <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	1,64	1,59	1,48	2,18	2,12	3,57
30	2,50	2,45	2,65	2,30	3,78	3,00
60	3,24	3,46	3,34	3,42	5,91	3,90
90	4,07	4,54	4,41	5,05	8,24	5,41
P (cm/s)	$3,67 \cdot 10^{-05}$	$4,56 \cdot 10^{-05}$	$4,34 \cdot 10^{-05}$	$5,01 \cdot 10^{-05}$	$1,64 \cdot 10^{-04}$	$4,75 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$4,19 \cdot 10^{-05} \pm 4,60 \cdot 10^{-06}$ (10,99%)			$8,72 \cdot 10^{-05} \pm 6,65 \cdot 10^{-05}$ (76,33%)		
$P_{BA}/P_{AB} = 2,08$						

Tabla 5.40. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Paracetamol 100 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis*.

La comparación de los perfiles obtenidos para cada condición se representa en la figura 5.15.

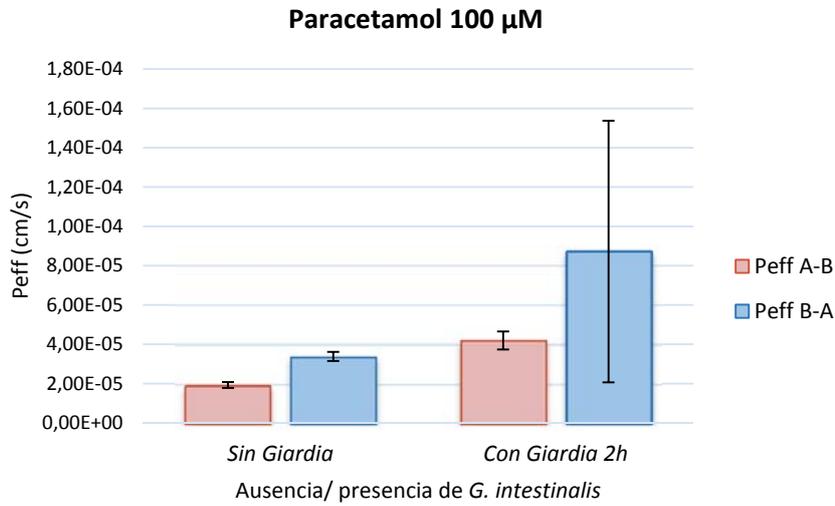


Figura 5.15. Representación gráfica de las permeabilidades de Paracetamol obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En la tabla 5.41, se muestra el análisis de varianza de un factor, correspondiente a las permeabilidades de Paracetamol en las diferentes condiciones del estudio.

Paracetamol 100 μM	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-Pba	S
Prueba no paramétrica PabG-PbaG	NS
Prueba no paramétrica Pab-PabG	S
Prueba no paramétrica Pba-PbaG	NS

Tabla 5.41. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad Apical-Basal (Pab) y permeabilidad Basal-Apical (Pba) de Paracetamol en ausencia y presencia de Giardia 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados *in vitro* indican que el Paracetamol es un fármaco con perfil típico de secreción, como el compuesto patrón Rodamina, en el que la Pba es mayor que la Pab. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA), demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los valores de permeabilidad obtenidos en ambas direcciones en ausencia de *Giardia*, tal y como cabía esperar ya que el Paracetamol es sustrato de transportadores de secreción, entre otros. Cuando comparamos la Pab y Pba en presencia de *Giardia* encontramos que la Pba es mayor. Sin embargo, estas diferencias carecen de significación estadística debido a la alta variabilidad en los valores de Pba obtenidos en presencia del parásito. El efecto que se observa en presencia de *Giardia intestinalis* es un aumento de ambas permeabilidades. Las diferencias de Pab en ausencia y presencia del parásito son significativas y se pueden atribuir al bloqueo estérico o cambio de conformación que *Giardia* ejerce sobre los transportadores por los que tiene afinidad el Paracetamol (transportadores de secreción). En el caso del Paracetamol, debido a su pequeño tamaño de molécula (MM= 151 g/mol), también puede atravesar la barrera a través de las uniones intercelulares como el fármaco modelo Lucifer Yellow y, al igual que éste, ve incrementada su permeabilidad en presencia del parásito debido al daño celular que produce. Por el contrario, la comparación de los valores en la dirección basal-apical, mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas, pero debido a la alta variabilidad en los resultados obtenidos en presencia de *Giardia* este es el resultado esperado.

El aumento de permeabilidad en presencia del parásito puede tener repercusiones en clínica ya que podría suponer un cuadro de hepatotoxicidad, si el Paracetamol se administra al niño de manera frecuente.

2.3. Fármacos a estudio

Para realizar el estudio, se seleccionaron fármacos de uso común en pediatría, ya que los niños conforman el grupo poblacional más susceptible de sufrir giardiasis. Los experimentos se realizaron, al igual que en los casos anteriores, utilizando monocapas Caco-2 de pases comprendidos entre 20 y 30, en ausencia y en presencia del parásito. Para la estimación de la permeabilidad se ha utilizado en todos los casos un modelo de regresión no lineal.

2.3.1. Analgésicos/Antipiréticos

-Ibuprofeno

Una familia ampliamente utilizada en la población pediátrica son los analgésicos y antipiréticos indicados en cuadros febriles, dolor y cefalea. En el caso del Ibuprofeno, la sobredosificación da lugar a efectos adversos a nivel gastrointestinal mientras que la infradosificación llevaría a no controlar el estado febril o reducir el dolor.

Las tablas 5.42 y 5.43, que se muestran a continuación, corresponden, a las cantidades de Ibuprofeno en el compartimiento receptor. A partir de ellas se calcula la permeabilidad en ausencia y presencia de *G. intestinalis*.

Ibuprofeno 100 μ M sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	1,27	1,21	1,08	4,65	5,02	1,36
30	1,69	1,98	1,55	7,46	9,18	3,71
60	2,98	3,24	2,99	11,27	13,87	10,07
90	3,81	3,69	3,84	13,42	16,19	12,07
P (cm/s)	$3,59 \cdot 10^{-05}$	$3,64 \cdot 10^{-05}$	$3,82 \cdot 10^{-05}$	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$2,38 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$3,69 \cdot 10^{-05} \pm 1,19 \cdot 10^{-06}$ (3,24%)			$2,20 \cdot 10^{-05} \pm 2,94 \cdot 10^{-06}$ (13,37%)		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,60$						

Tabla 5.42. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Ibuprofeno 100 μ M en monocapas Caco-2.

Ibuprofeno 100 μ M con <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	0,82	0,62	0,83	0,78	0,74	0,82
30	1,28	1,11	1,46	1,75	1,47	1,62
60	2,51	2,54	2,94	3,67	3,31	3,65
90	3,04	3,61	3,64	4,15	4,56	4,57
P (cm/s)	$2,83 \cdot 10^{-05}$	$3,65 \cdot 10^{-05}$	$3,75 \cdot 10^{-05}$	$5,22 \cdot 10^{-05}$	$5,43 \cdot 10^{-05}$	$5,70 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$3,41 \cdot 10^{-05} \pm 5,02 \cdot 10^{-06}$ (14,71%)			$5,45 \cdot 10^{-05} \pm 2,44 \cdot 10^{-06}$ (4,47%)		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,60$						

Tabla 5.43. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Ibuprofeno 100 μ M en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis*.

La comparación de los perfiles obtenidos se representa en la figura 5.16.

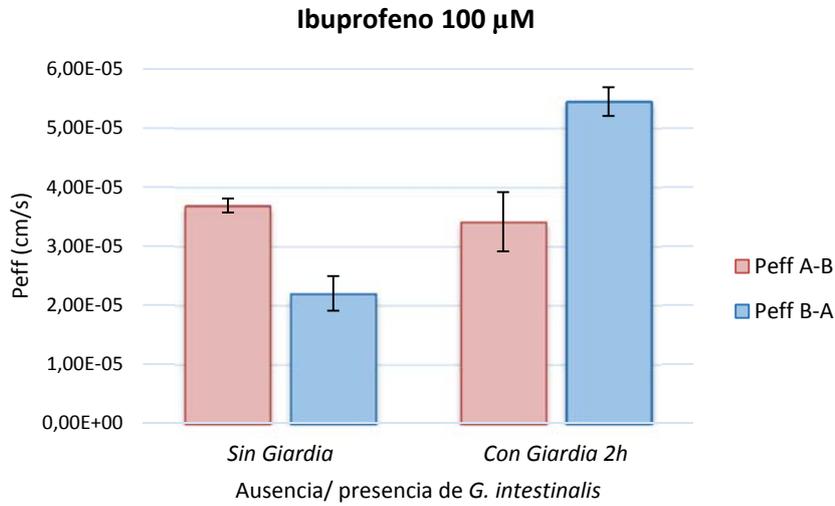


Figura 5.16. Representación gráfica de las permeabilidades de Ibuprofeno obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En la tabla 5.44, se muestra el análisis de varianza de un factor, correspondiente a las permeabilidades de Ibuprofeno en las diferentes condiciones del estudio.

Ibuprofeno 100 μM	
Prueba de Levene	Varianzas homogéneas
Prueba paramétrica Pab-Pba	S
Prueba paramétrica PabG-PbaG	S
Prueba paramétrica Pab-PabG	NS
Prueba paramétrica Pba-PbaG	S

Tabla 5.44. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad Apical-Basal (Pab) y permeabilidad Basal-Apical (Pba) de Ibuprofeno en ausencia y presencia de Giardia 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

En la figura 5.16 se muestra que la permeabilidad Pab es mayor que Pba en ausencia de parásito. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) demuestran que estas diferencias son estadísticamente significativas. Esto es debido al transportador de absorción activa, MRP1, implicado en el paso de Ibuprofeno a través de la barrera intestinal. Se obtiene un perfil típico de este tipo de fármacos, donde la Pab es mayor que la Pba. Sin embargo, en presencia de *Giardia* la permeabilidad Pab es menor que Pba y esa diferencia es estadísticamente significativa, aunque el cociente Pba/Pab es menor de 2 por lo que no puede atribuirse a la participación de transportadores.

Si comparamos los resultados sin y con parásito se observa una leve disminución de la permeabilidad del Ibuprofeno en presencia de *G. intestinalis* en sentido Pab, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. El Ibuprofeno atraviesa la membrana debido a un mecanismo combinado de difusión pasiva y transporte activo de absorción. El patrón observado en presencia de *Giardia* sugiere que el transportador está bloqueado y la permeabilidad pasiva reducida, lo que provocaría valores de permeabilidad menores en el sentido Pab.

En este caso, la infección por *Giardia* no produciría cambios importantes de los niveles plasmáticos a nivel clínico, cuando se administrara este fármaco.

2.3.2 Antiarrítmicos/Antipalúdicos

-Quinidina

Se emplea en pediatría para tratar las arritmias cardíacas y para curar las infecciones por *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria. Si se sobrepasa la dosis terapéutica, pueden aparecer manifestaciones gastrointestinales, del SNC, cardíacas, hipopotasemia o alteraciones auditivas y visuales. Por esto es importante vigilar algunos parámetros durante el tratamiento. Si se produjese la sobredosificación podrían aparecer estos peligrosos efectos, y si no se alcanzase la dosis terapéutica el paciente no lograría la curación.

Las tablas 5.45 y 5.46, que se muestran a continuación, corresponden a las cantidades de Quinidina en el compartimento receptor. A partir de ellas, se calcula la permeabilidad en ausencia y presencia de *G. intestinalis*.

Quinidina 100 μM sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	2,6	2,4	2,3	3,0	2,8	3,2
30	3,4	3,8	2,9	5,8	5,4	6,1
60	5,9	5,9	6,1	11,3	11,0	11,6
90	8,5	8,1	7,6	14,2	14,1	14,0
P (cm/s)	$5,38 \cdot 10^{-06}$	$5,10 \cdot 10^{-06}$	$5,07 \cdot 10^{-06}$	$1,19 \cdot 10^{-05}$	$1,12 \cdot 10^{-05}$	$1,16 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$5,19 \cdot 10^{-06} \pm 1,72 \cdot 10^{-07}$ (3,31%)			$9,16 \cdot 10^{-05} \pm 3,52 \cdot 10^{-07}$ (0,38%)		
$P_{BA}/P_{AB} = 17,64$						

Tabla 5.45. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Quinidina 100 μM en monocapas Caco-2.

Quinidina 100 μM con <i>G. intestinalis</i> 2 horas						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	2,24	2,04	2,27	2,82	2,75	3,86
30	2,75	4,23	4,36	4,14	5,06	5,74
60	4,02	5,36	5,37	5,08	6,33	6,77
90	4,57	5,75	5,79	5,89	6,87	7,55
P (cm/s)	$3,58 \cdot 10^{-05}$	$9,40 \cdot 10^{-05}$	$7,19 \cdot 10^{-05}$	$3,06 \cdot 10^{-05}$	$4,57 \cdot 10^{-05}$	$4,87 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$6,72 \cdot 10^{-05} \pm 2,93 \cdot 10^{-05}$ (43,65%)			$4,17 \cdot 10^{-05} \pm 9,71 \cdot 10^{-06}$ (23,30%)		
P_{BA}/P_{AB} = 0,62						

Tabla 5.46. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Quinidina 100 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis* durante 2 horas.

La comparación de los perfiles obtenidos se representa en la figura 5.17.

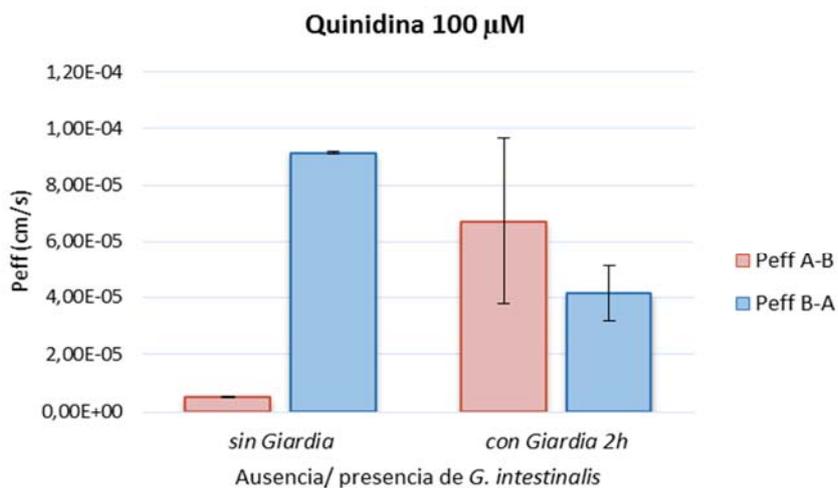


Figura 5.17. Representación gráfica de las permeabilidades de Quinidina obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En la tabla 5.47, se muestra el análisis de varianza de un factor, correspondiente a las permeabilidades de Quinidina en las diferentes condiciones del estudio.

Quinidina 100 μ M	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-Pba	S
Prueba no paramétrica PabG-PbaG	NS
Prueba no paramétrica Pab-PabG	S
Prueba no paramétrica Pba-PbaG	S

Tabla 5.47. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad Apical-Basal (Pab) y permeabilidad Basal-Apical (Pba) de Quinidina en ausencia y presencia de *Giardia* 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados mostrados en la figura 5.17 señalan que, en ausencia de parásito, la permeabilidad Pba es mucho mayor que Pab y, el análisis de varianza indica que estas diferencias son estadísticamente significativas. Esto es debido, a los transportadores de secreción (en concreto, glicoproteína P) presentes en las monocapas Caco-2, los cuales están implicados en el paso de Quinidina a través de la barrera intestinal. Se obtiene un perfil típico de este tipo de fármacos, donde la Pab es menor que la Pba.

Los resultados muestran un aumento de la permeabilidad de la Quinidina en presencia de *G. intestinalis* en sentido Pab, y una disminución en sentido Pba. El análisis estadístico reveló que ambas diferencias son significativas. La Quinidina atraviesa la membrana debido a un mecanismo combinado de difusión pasiva, absorción activa y transporte de secreción. El patrón observado en presencia de *Giardia* sugiere que, en este caso, el transportador que estaría más afectado por el parásito sería el de secreción, que estaría bloqueado. Al no expulsar

fármaco, más cantidad atravesaría la membrana, aumentando la permeabilidad en sentido Pab, lo que podría dar lugar a los efectos no deseados descritos previamente.

2.3.3. Antibióticos b-lactámicos

-Cefadroxilo

El Cefadroxilo, pertenece a uno de los grupos de fármacos más empleados en pediatría para tratar procesos infecciosos. Un aumento de la absorción de este, llevaría a efectos nocivos sobre el sistema digestivo y problemas tipo alérgicos como erupciones y fiebre. Se deben evitar también las dosis subterapéuticas, pues podrían aparecer resistencias además de no conseguir la cura del paciente.

La tabla 5.48 muestra el dato de permeabilidad Pab tomado de la bibliografía⁴⁰⁴. La tabla 5.49 corresponde a las cantidades de Cefadroxilo en el compartimiento receptor en presencia de *Giardia*.

Cefadroxilo 100 μ M sin <i>G. intestinalis</i>	
P_{ab}±DE (cm/s)	8,88·10 ⁻⁰⁵ ± 5,20·10 ⁻⁰⁶ (5,9%)

Tabla 5.48. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) obtenida tras administrar Cefadroxilo 100 μ M en monocapas Caco-2. Dato bibliográfico, tomado de Posada et al.⁴⁰⁴.

Cefadroxilo 100 μM con <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-
P (cm/s)	-	-	-	-	-	-
P \pm DE (cm/s)		-			-	

$P_{BA}/P_{AB} = -$

Tabla 5.49. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Cefadroxilo 100 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis*.

La comparación de los perfiles obtenidos se representa en la figura 5.18.

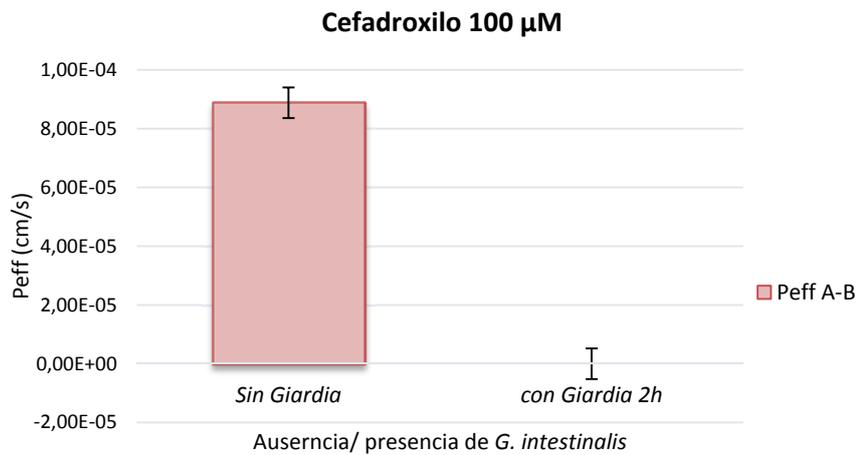


Figura 5.18. Representación gráfica de las permeabilidades de Cefadroxilo obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En la tabla 5.50, se muestra el análisis de varianza de un factor correspondiente a las permeabilidades de Cefadroxilo en las diferentes condiciones del estudio.

Cefadroxilo 100 μM	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-PabG (2h)	S

Tabla 5.50. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad Apical-Basal (Pab) de Cefadroxilo en ausencia y presencia de *Giardia* 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: Existen diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados obtenidos muestran una marcada disminución de la permeabilidad del Cefadroxilo, ya que los valores de concentración de Cefadroxilo en el compartimento receptor estaban por debajo del límite de cuantificación. Los resultados de la prueba *t de Student* demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas. Estos datos concuerdan con los datos clínicos aportados en la bibliografía sobre otros antibióticos β -lactámicos²⁸⁹, en los que se muestra claramente la marcada disminución en la absorción de este grupo de fármacos en casos de giardiasis.

El Cefadroxilo presenta un mecanismo combinado de absorción pasiva, activa y transporte de secreción. La disminución de la permeabilidad puede deberse a un bloqueo de los sitios de unión, o a cambios conformacionales de la proteína transportadora producidos por el parásito. Por tanto, si la giardiasis no estuviera diagnosticada, existiría un riesgo de que el fármaco no alcanzara niveles terapéuticos y generase resistencias.

2.3.4. Antiepilépticos

-Carbamazepina

La Carbamazepina es uno de los fármacos antiepilépticos de elección en pediatría. Es un fármaco de estrecho margen terapéutico, por lo que es especialmente importante ajustar la dosis correctamente, pues pequeñas variaciones en la absorción se traducirían en un riesgo para el paciente. La clínica de la intoxicación es, fundamentalmente, neurológica, siendo el síntoma más frecuente y característico el nistagmo, acompañado de otras manifestaciones clínicas propias de la depresión del SNC. En el otro extremo, dosis inferiores a las recomendadas conducirían a un déficit en el control de las crisis epilépticas con el riesgo que ello conlleva.

Las tablas 5.51 y 5.52, que se muestran a continuación, corresponden a las cantidades de Carbamazepina en el compartimiento receptor. A partir de ellas se calcula la permeabilidad en ausencia y en presencia de *G. intestinalis*.

Carbamazepina 100 μM sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	3,20	4,32	2,76	1,93	1,72	2,46
30	4,04	5,36	3,22	4,20	3,66	4,18
60	6,45	6,85	5,97	6,38	6,12	7,27
90	7,81	8,41	6,58	7,67	7,80	9,02
P (cm/s)	$2,53 \cdot 10^{-05}$	$2,12 \cdot 10^{-05}$	$2,21 \cdot 10^{-05}$	$6,93 \cdot 10^{-05}$	$6,91 \cdot 10^{-05}$	$9,03 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$2,29 \cdot 10^{-05} \pm 2,11 \cdot 10^{-06}$ (9,20%)			$7,62 \cdot 10^{-05} \pm 1,22 \cdot 10^{-05}$ (16,01%)		
$P_{BA}/P_{AB}=3,32$						

Tabla 5.51. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Carbamazepina 100 μM en monocapas Caco-2.

Carbamazepina 100 μM con <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	2,23	0,99	1,80	1,39	2,22	1,90
30	2,82	2,74	2,83	3,32	3,09	3,26
60	4,29	4,33	4,76	4,75	4,23	4,55
90	5,21	5,40	5,47	5,77	5,33	5,68
P (cm/s)	$5,79 \cdot 10^{-05}$	$7,48 \cdot 10^{-05}$	$7,36 \cdot 10^{-05}$	$3,19 \cdot 10^{-05}$	$3,14 \cdot 10^{-05}$	$3,16 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$6,88 \cdot 10^{-05} \pm 9,41 \cdot 10^{-06}$ (13,69%)			$3,17 \cdot 10^{-05} \pm 2,78 \cdot 10^{-07}$ (0,88%)		
$P_{BA}/P_{AB}= 0,46$						

Tabla 5.52. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Carbamazepina 100 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis*.

La comparación de los perfiles obtenidos se representa en la figura 5.19.

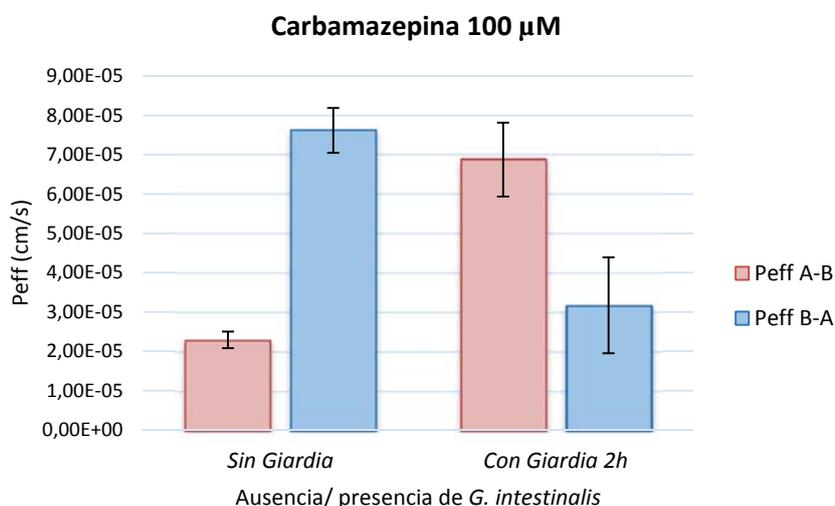


Figura 5.19. Representación gráfica de las permeabilidades de Carbamazepina obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En la tabla 5.53, se muestra el análisis de varianza de un factor, correspondiente, a las permeabilidades de Carbamazepina en las diferentes condiciones del estudio.

Carbamazepina 100 μ M	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-Pba	S
Prueba no paramétrica PabG-PbaG	S
Prueba no paramétrica Pab-PabG	S
Prueba no paramétrica Pba-PbaG	S

Tabla 5.53. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad Apical-Basal (Pab) y permeabilidad Basal-Apical (Pba) de Carbamazepina en ausencia y presencia de Giardia 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

El estudio de permeabilidad (figura 5.19) nos indica que la Carbamazepina es un fármaco con un perfil típico de los sustratos de transportadores de secreción, en el que la Pba es considerablemente mayor que la Pab en ausencia de *Giardia*. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas, cuando se comparan los valores de permeabilidad obtenidos en ambas direcciones. En presencia del parásito, se ve incrementada marcadamente su absorción. El incremento de la permeabilidad es estadísticamente significativo. Esto es debido, probablemente, a que *G. intestinalis* produce un bloqueo de los transportadores de secreción o un cambio de conformación de los mismos. Por lo tanto la presencia de giardiasis no diagnosticada, podría llevar a dosis tóxicas, que supondrían la aparición de la sintomatología descrita para la sobredosificación.

-Diazepam

El Diazepam es otro fármaco utilizado para el tratamiento de las crisis epilépticas infantiles, además de como ansiolítico y sedante. Los síntomas más prevalentes tras una intoxicación por Diazepam son neurológicos, siendo el más frecuente la ataxia. También puede producir alucinaciones, confusión, agitación, coma, depresión del centro respiratorio, bradicardia e hipotensión.

Las tablas 5.54 y 5.55, que se muestran a continuación, corresponden a las cantidades de Diazepam en el compartimiento receptor. A partir de ellas se calcula la permeabilidad en ausencia y presencia de *G. intestinalis*.

Diazepam 100 μ M sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	1,21	1,24	1,25	2,18	2,67	2,45
30	1,89	2,09	2,17	4,02	4,29	4,45
60	2,90	3,31	3,26	6,28	6,67	6,58
90	3,91	4,25	4,07	7,64	8,45	8,62
P (cm/s)	$2,99 \cdot 10^{-05}$	$3,07 \cdot 10^{-05}$	$3 \cdot 10^{-05}$	$1,16 \cdot 10^{-04}$	$9,29 \cdot 10^{-05}$	$1,40 \cdot 10^{-04}$
P \pm DE (cm/s)	$3,02 \cdot 10^{-05} \pm 4,17 \cdot 10^{-07}$ (1,38%)			$1,16 \cdot 10^{-04} \pm 2,38 \cdot 10^{-05}$ (20,44%)		
$P_{BA}/P_{AB} = 3,85$						

Tabla 5.54. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Diazepam 100 μ M en monocapas Caco-2.

Diazepam 100 μ M con <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	4,23	4,57	4,71	4,17	5,09	4,52
30	5,12	5,21	5,48	3,80	5,30	4,17
60	5,22	5,03	5,28	4,71	6,51	6,03
90	5,50	5,83	6,01	5,79	7,22	6,90
P (cm/s)	$5,03 \cdot 10^{-05}$	$4,98 \cdot 10^{-05}$	$5,70 \cdot 10^{-05}$	$5,80 \cdot 10^{-05}$	$1,45 \cdot 10^{-04}$	$1,08 \cdot 10^{-04}$
P \pm DE (cm/s)	$5,24 \cdot 10^{-05} \pm 4,01 \cdot 10^{-06}$ (7,66%)			$1,04 \cdot 10^{-04} \pm 4,35 \cdot 10^{-05}$ (41,99%)		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,98$						

Tabla 5.55. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar Diazepam 100 μ M en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis*.

La comparación de los perfiles obtenidos se representa en la figura 5.20.

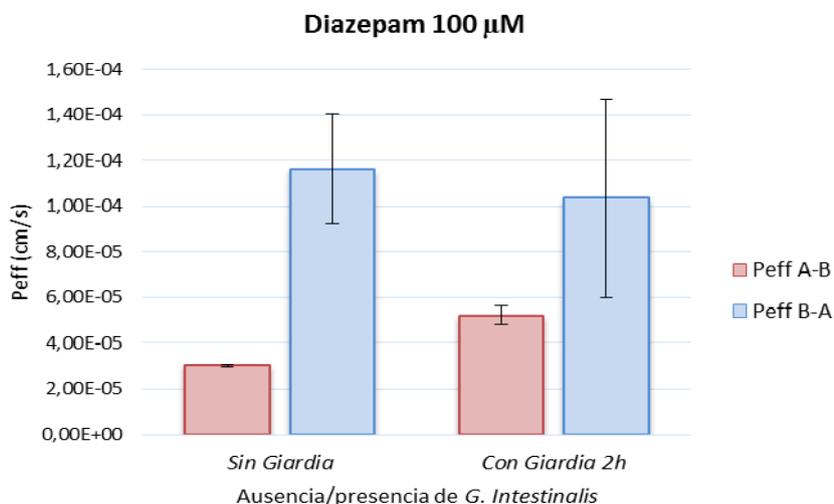


Figura 5.20. Representación gráfica de las permeabilidades de Diazepam obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En la tabla 5.56, se muestra el análisis de varianza de un factor, correspondiente, a las permeabilidades de Diazepam en las diferentes condiciones del estudio.

Diazepam 100 µM	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-Pba	S
Prueba no paramétrica PabG-PbaG	NS
Prueba no paramétrica Pab-PabG	S
Prueba no paramétrica Pba-PbaG	NS

Tabla 5.56. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad Apical-Basal (Pab) y permeabilidad Basal-Apical (Pba) de Diazepam en ausencia y presencia de Giardia 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas

El Diazepam, al igual que la Carbamazepina, presenta un perfil típico de fármaco con transporte de secreción en el que la que Pba es mucho mayor que la Pab. El análisis de varianza (ANOVA) demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas, cuando se comparan los valores de permeabilidad obtenidos en ambas direcciones en ausencia de *Giardia*. Cuando se compara Pab en ausencia y presencia del parásito, se observan diferencias estadísticamente significativas debido al bloqueo estérico que *Giardia* ejerce sobre los transportadores por los que tiene afinidad el Diazepam (transportadores de secreción). La infección parasitaria produce, a la vista de los datos, un incremento de la permeabilidad con la consiguiente sobredosificación. Si bien pueden aparecer síntomas de depresión del SNC, esta benzodiazepina es segura ya que el margen terapéutico es mayor que el del resto de antiepilépticos.

-Fenobarbital

El Fenobarbital también se cuenta entre los fármacos de estrecho margen terapéutico por lo que es importante, para el éxito terapéutico, asegurar la dosificación exacta.

Las tablas 5.57 y 5.58, que se muestran a continuación, corresponden a las cantidades de Fenobarbital en el compartimiento receptor. A partir de ellas se calcula la permeabilidad en ausencia y presencia de *G. intestinalis*.

Fenobarbital 100 μ M sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	1,35	0,96	0,81	0,81	0,87	0,90
30	1,59	1,56	1,77	2,27	2,26	2,42
60	3,17	3,31	3,43	4,53	5,05	4,75
90	4,85	4,57	4,71	6,24	6,27	6,57
P (cm/s)	$4,98 \cdot 10^{-05}$	$5,08 \cdot 10^{-05}$	$5,48 \cdot 10^{-05}$	$9,48 \cdot 10^{-05}$	$1,03 \cdot 10^{-04}$	$1,04 \cdot 10^{-04}$
P \pm DE (cm/s)	$5,18 \cdot 10^{-05} \pm 2,66 \cdot 10^{-06}$ (5,14%)			$1,01 \cdot 10^{-04} \pm 5,02 \cdot 10^{-06}$ (4,99%)		
P_{BA}/P_{AB} = 1,94						

Tabla 5.57. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar Fenobarbital 100 μ M en monocapas Caco-2.

Fenobarbital 100 μ M con <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	0,91	0,83	0,81	1,02	1,46	1,18
30	1,60	1,72	1,70	2,13	1,94	2,23
60	3,28	2,95	3,15	2,93	3,58	4,83
90	4,05	4,39	4,07	5,35	5,68	7,61
P (cm/s)	$4,44 \cdot 10^{-05}$	$4,64 \cdot 10^{-05}$	$4,43 \cdot 10^{-05}$	$5,89 \cdot 10^{-05}$	$6,65 \cdot 10^{-05}$	$1,18 \cdot 10^{-04}$
P \pm DE (cm/s)	$4,50 \cdot 10^{-05} \pm 1,20 \cdot 10^{-06}$ (2,67%)			$8,10 \cdot 10^{-05} \pm 3,19 \cdot 10^{-05}$ (39,38%)		
P_{BA}/P_{AB} = 1,80						

Tabla 5.58. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar Fenobarbital 100 μ M en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis*.

La comparación de los perfiles obtenidos se representa en la figura 5.21.

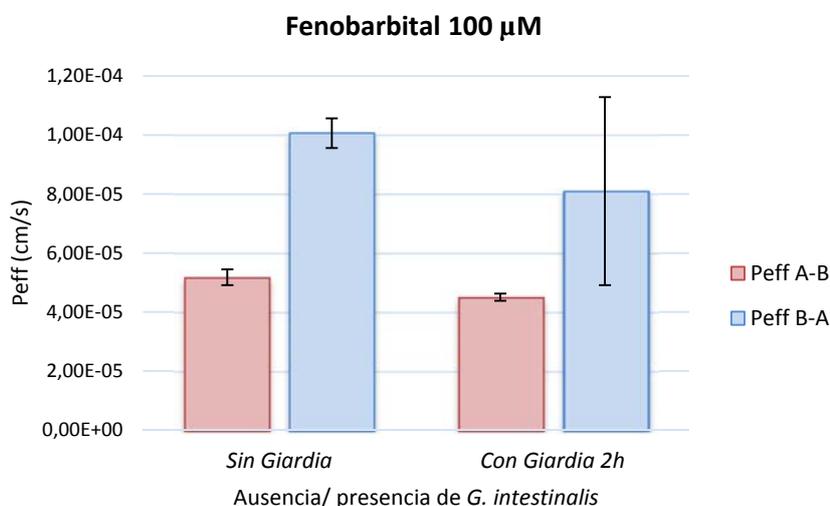


Figura 5.21. Representación gráfica de las permeabilidades de Fenobarbital obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En la tabla 5.59, se muestra el análisis de varianza de un factor, correspondiente, a las permeabilidades de Fenobarbital en las diferentes condiciones del estudio.

Fenobarbital 100 μM	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-Pba	S
Prueba no paramétrica PabG-PbaG	NS
Prueba no paramétrica Pab-PabG	NS
Prueba no paramétrica Pba-PbaG	NS

Tabla 5.59. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad Apical-Basal (Pab) y permeabilidad Basal-Apical (Pba) de Fenobarbital en ausencia y presencia de Giardia 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

Como se observa en la figura 5.21, la permeabilidad Pab es menor que Pba y esta diferencia es estadísticamente significativa, como se muestra en el análisis de varianza. El mecanismo de absorción de este fármaco combina difusión pasiva y transporte activo de absorción y secreción, pero el patrón que predomina es el de secreción como en algunos ejemplos anteriores. La infección por el parásito produce, como se puede ver en la figura, una pequeña disminución de la permeabilidad no estadísticamente significativa, debido seguramente a que la inhibición de los transportadores en ambos sentidos tiene un efecto compensatorio.

Cuando comparamos la Pab y Pba en presencia de *Giardia* no existen diferencias estadísticamente significativas, debido a la alta variabilidad en la Pba cuando se realizan los ensayos en presencia del parásito. Tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el resto de comparaciones debido al mismo motivo.

A la vista de los resultados *in vitro* podemos concluir que la administración de Fenobarbital en población infantil afectada por epilepsia es segura, incluso aunque el niño esté infectado por *Giardia*. No obstante, teniendo en cuenta que es un fármaco de estrecho margen terapéutico deberíamos monitorizar al paciente ya que en el intestino humano, en el tramo duodenal (tramo de elección para la absorción de fármacos) el transportador que más se expresa es MRP2 (secreción), por lo tanto los niveles plasmáticos de Fenobarbital en el niño podrían estar aumentados.

2.3.5. Antituberculosos

-Isoniazida

La Isoniazida es un antibiótico antituberculoso que se utiliza generalmente en combinación con otros antibióticos. La intoxicación por este fármaco produce un síndrome caracterizado por convulsiones, acidosis metabólica y, en casos severos, depresión respiratoria y coma. Dosis subterapéuticas suponen que no se controle la infección y favorecen la aparición de resistencias.

Las tablas 5.60 y 5.61, que se muestran a continuación, corresponden a las cantidades de Isoniazida en el compartimiento receptor. A partir de ellas se calcula la permeabilidad en ausencia y presencia de *G. intestinalis*.

Isoniazida 100 μ M sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	0,13	0,29	0,001	0,19	0,37	0,26
30	0,38	0,56	0,55	0,71	0,58	0,71
60	0,96	1,60	1,41	1,64	1,65	1,43
90	1,74	2,24	2,81	2,98	2,45	2,37
P (cm/s)	$1,51 \cdot 10^{-05}$	$2,09 \cdot 10^{-05}$	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,92 \cdot 10^{-05}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$2,07 \cdot 10^{-05} \pm 5,55 \cdot 10^{-06}$ (26,80%)			$2,48 \cdot 10^{-05} \pm 3,94 \cdot 10^{-06}$ (15,89%)		
P_{BA}/P_{AB} = 1,19						

Tabla 5.60. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar Isoniazida 100 μ M en monocapas Caco-2.

Isoniazida 100 μM con <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	0,35	0,43	0,39	1,25	0,89	1,01
30	0,74	0,40	0,44	0,84	0,99	1,07
60	1,39	0,53	1,14	2,65	2,47	2,48
90	1,98	1,48	1,77	3,50	3,31	3,44
P (cm/s)	$1,67 \cdot 10^{-05}$	$9,48 \cdot 10^{-06}$	$1,44 \cdot 10^{-05}$	$3,33 \cdot 10^{-05}$	$3,24 \cdot 10^{-05}$	$3,30 \cdot 10^{-05}$
P \pm DE (cm/s)	$1,35 \cdot 10^{-05} \pm 3,70 \cdot 10^{-06}$ (27,35%)			$3,29 \cdot 10^{-05} \pm 4,54 \cdot 10^{-07}$ (1,38%)		
P_{BA}/P_{AB} = 2,43						

Tabla 5.61. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar Isoniazida 100 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis*.

La comparación de los perfiles obtenidos se representa en la figura 5.22.

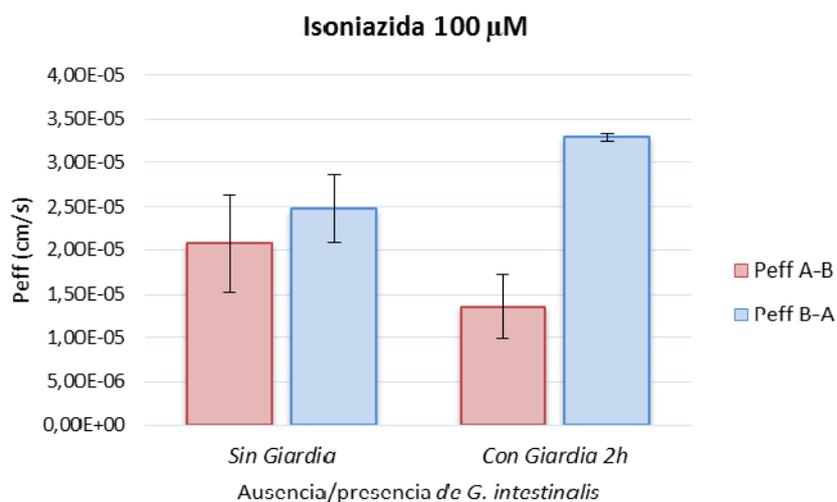


Figura 5.22. Representación gráfica de las permeabilidades de Isoniazida obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En la tabla 5.62, se muestra el análisis de varianza de un factor, correspondiente, a las permeabilidades de Isoniazida en las diferentes condiciones del estudio.

Isoniazida 100 μ M	
Prueba de Levene	Varianzas homogéneas
Prueba paramétrica Pab-Pba	NS
Prueba paramétrica PabG-PbaG	S
Prueba paramétrica Pab-PabG	NS
Prueba paramétrica Pba-PbaG	S

Tabla 5.62. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad Apical-Basal (Pab) y permeabilidad Basal-Apical (Pba) de Isoniazida en ausencia y presencia de *Giardia* 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

Como se observa en la figura la permeabilidad de Isoniazida es similar en ambos sentidos. La Isoniazida atraviesa la membrana intestinal mediante difusión pasiva, como el fármaco de referencia Metoprolol (epígrafe 2.1.1), y probablemente también mediante transporte paracelular dado su pequeño tamaño ($M_m = 137,14 \text{ g/mol}$). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) demuestran que, efectivamente, no existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los valores de permeabilidad obtenidos en ambas direcciones en ausencia de *Giardia*.

En presencia del parásito, se ve disminuida la permeabilidad del fármaco en sentido apical-baolateral pero las diferencias entre ambas permeabilidades no son estadísticamente significativas. Los fármacos que se absorben por difusión pasiva como el Metoprolol veían disminuida su permeabilidad en presencia del parásito pero, como en este caso, el

fármaco se absorbe también mediante un mecanismo paracelular (como el Lucifer Yellow), esta disminución se ve compensada por el aumento que se produce en la absorción a través de los espacios intercelulares.

Por el contrario, cuando comparamos los valores de Pba en presencia y ausencia de *Giardia* existen diferencias estadísticamente significativas, ya que el valor de PbaG en presencia del parásito es muy elevado. La combinación de ambos mecanismos de absorción podría explicar estas diferencias.

-Rifampicina

La Rifampicina es otro fármaco de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis, siendo necesario su uso en combinación. Presenta un estrecho margen terapéutico. Durante el tratamiento con Rifampicina es necesario llevar a cabo vigilancia de diferentes parámetros, como: antibiograma, enzimas hepáticas, bilirrubina, creatinina sérica, recuento sanguíneo y plaquetario; pues es posible que se vean afectados.

Las tablas 5.63 y 5.64, que se muestran a continuación, corresponden a las cantidades de Rifampicina en el compartimiento receptor. A partir de ellas se calcula la permeabilidad en ausencia y presencia de *G. intestinalis*.

Rifampicina 100 μM sin <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad(nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	0,74	0,74	0,69	0,67	0,78	0,66
30	0,83	1,08	0,83	2,89	3,17	2,22
60	1,02	1,23	1,18	10,74	6,82	8,43
90	1,33	1,64	1,40	26,16	25,43	22,76
P (cm/s)	$6,85 \cdot 10^{-06}$	$9,55 \cdot 10^{-06}$	$8,34 \cdot 10^{-06}$	$8,44 \cdot 10^{-05}$	$9,51 \cdot 10^{-05}$	$1,49 \cdot 10^{-04}$
P \pm DE (cm/s)	$8,25 \cdot 10^{-06} \pm 1,35 \cdot 10^{-06}$ (16,40%)			$1,10 \cdot 10^{-04} \pm 3,50 \cdot 10^{-05}$ (31, 90%)		
P_{BA}/P_{AB} = 1,78						

Tabla 5.63. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar Rifampicina 100 μM en monocapas Caco-2.

Rifampicina 100 μM con <i>G. intestinalis</i>						
Tiempo (min)	Cantidad(nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	A	B	C	D	E	F
15	1,31	1,35	1,33	0,67	0,78	0,66
30	2,28	1,92	2,05	2,21	1,13	1,56
60	3,80	3,13	3,5	7,86	3,66	6,22
90	5,34	4,23	4,82	15,41	12,20	13,89
P (cm/s)	$6,31 \cdot 10^{-05}$	$4,14 \cdot 10^{-05}$	$5,07 \cdot 10^{-05}$	$2,5 \cdot 10^{-04}$	$9,83 \cdot 10^{-05}$	$1,30 \cdot 10^{-04}$
P \pm DE (cm/s)	$5,18 \cdot 10^{-05} \pm 1,09 \cdot 10^{-05}$ (21,07%)			$1,59 \cdot 10^{-04} \pm 7,99 \cdot 10^{-05}$ (50,19%)		
P_{BA}/P_{AB} = 3,08						

Tabla 5.64. Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar Rifampicina 100 μM en monocapas Caco-2 en presencia de *G. intestinalis*.

La comparación de los perfiles obtenidos se representa en la figura 5.23.

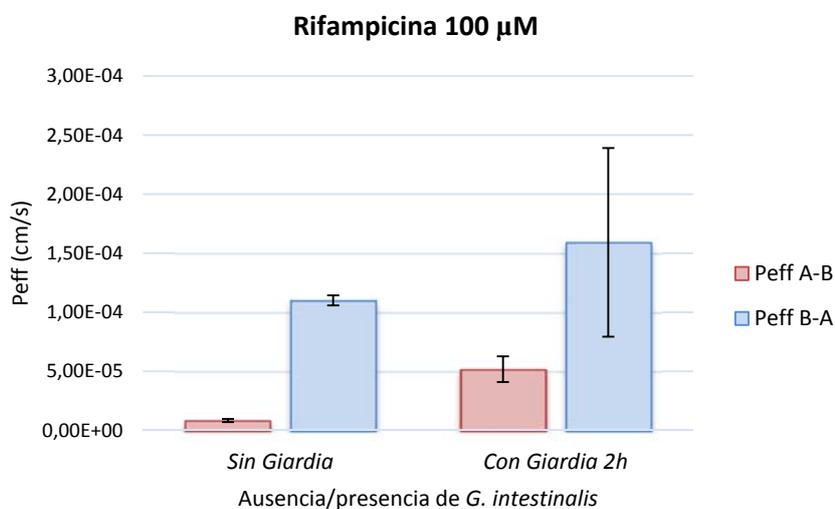


Figura 5.23. Representación gráfica de las permeabilidades de Rifampicina obtenidas en las distintas condiciones del ensayo.

En la tabla 5.65, se muestra el análisis de varianza de un factor, correspondiente, a las permeabilidades de Rifampicina en las diferentes condiciones del estudio.

Rifampicina 100 μM	
Prueba de Levene	Varianzas no homogéneas
Prueba no paramétrica Pab-Pba	S
Prueba no paramétrica PabG-PbaG	S
Prueba no paramétrica Pab-PabG	S
Prueba no paramétrica Pba-PbaG	NS

Tabla 5.65. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor correspondiente a la permeabilidad Apical-Basal (Pab) y permeabilidad Basal-Apical (Pba) de Rifampicina en ausencia y presencia de Giardia 2 horas (G). NS: No existen diferencias estadísticamente significativas, S: existen diferencias estadísticamente significativas.

La Rifampicina es un fármaco que se absorbe por difusión pasiva, transporte activo de absorción y secreción, pero la figura presenta un perfil típico de transporte de secreción (donde la Pab es menor que la Pba), que es el predominante en este caso. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los valores de permeabilidad obtenidos en ambas direcciones tanto en ausencia como en presencia de *Giardia*. La presencia de *Giardia* produce un incremento de la permeabilidad estadísticamente significativo que, como hemos visto, puede tener consecuencias graves para la salud del niño. Esto puede ser debido a que *G. intestinalis* bloquee en parte, los transportadores de secreción o induzca un cambio de conformación de los mismos, por lo tanto se obtiene que la PabG es mayor que la Pab. Los valores de Pba y PbaG no presentan diferencias significativas estadísticamente debido a la alta variabilidad de estos valores.

Resultados y Discusión

En la tabla 5.66 se muestra un resumen de las permeabilidades *in vitro* de todos los fármacos ensayados:

Compuesto	Sin <i>G. intestinalis</i>		Con <i>G. intestinalis</i> 2h	
	P _{ab} (cm/s)	P _{ba} (cm/s)	P _{ab} (cm/s)	P _{ba} (cm/s)
Amoxicilina	2,38·10 ⁻⁰⁵	4,37·10 ⁻⁰⁵	-	-
Carbamazepina	2,29·10 ⁻⁰⁵	7,62·10 ⁻⁰⁵	6,88·10 ⁻⁰⁵	3,17·10 ⁻⁰⁵
Cefadroxilo	8,88·10 ⁻⁰⁵	-	-	-
Diazepam	3,02·10 ⁻⁰⁵	1,16·10 ⁻⁰⁴	5,24·10 ⁻⁰⁵	1,04·10 ⁻⁰⁴
Fenobarbital	5,18·10 ⁻⁰⁵	1,01·10 ⁻⁰⁴	4,50·10 ⁻⁰⁵	8,10·10 ⁻⁰⁵
Ibuprofeno	3,69·10 ⁻⁰⁵	2,20·10 ⁻⁰⁵	3,41·10 ⁻⁰⁵	5,45·10 ⁻⁰⁵
Isoniazida	2,07·10 ⁻⁰⁵	2,48·10 ⁻⁰⁵	1,35·10 ⁻⁰⁵	3,29·10 ⁻⁰⁵
Lucifer Yellow	1,52·10 ⁻⁰⁷	-	1,09·10 ⁻⁰⁶	-
Metoprolol	5,73·10 ⁻⁰⁵	6,98·10 ⁻⁰⁵	4,83·10 ⁻⁰⁵	3,34·10 ⁻⁰⁵
Paracetamol	1,93·10 ⁻⁰⁵	3,38·10 ⁻⁰⁵	4,19·10 ⁻⁰⁵	8,72·10 ⁻⁰⁵
Quinidina	5,19·10 ⁻⁰⁶	9,16·10 ⁻⁰⁵	6,72·10 ⁻⁰⁵	4,17·10 ⁻⁰⁵
Rifampicina	8,25·10 ⁻⁰⁶	1,10·10 ⁻⁰⁴	5,18·10 ⁻⁰⁵	1,59·10 ⁻⁰⁴
Rodamina	8,65·10 ⁻⁰⁵	1,79·10 ⁻⁰⁵	7,14·10 ⁻⁰⁶	1,55·10 ⁻⁰⁵

Tabla 5.66. Resumen de permeabilidades en dirección Apical-Basolateral y Basolateral-Apical de los diferentes fármacos ensayados.

Resultados y Discusión

Como se observa en la tabla 5.67, a modo de resumen se puede indicar que la permeabilidad de los fármacos estudiados aumenta en algunos de ellos y en otros disminuye. En los fármacos que se ve aumentada, podría aparecer toxicidad y en los que se ve disminuida no se alcanzarían los niveles de fármaco necesarios para conseguir el efecto deseado.

p	Pasivo	Absorción Activa	Secreción	Fármaco	Explicación
↑	SI	NO	SI	Rodamina Carbamazepina	Bloqueo lugar de unión o cambio conformacional del transportador
	SI	SI	SI	Paracetamol Diazepam Rifampicina	TOXICIDAD
↓	SI	NO	NO	Metoprolol Isoniazida	Impedimento estérico DOSIS SUBTERAPÉUTICA
	SI	SI	NO	Ibuprofeno	Impedimento estérico Bloqueo o cambio conformacional del transportador
	SI	SI	SI	Amoxicilina Fenobarbital	DOSIS SUBTERAPÉUTICA

Tabla 5.67. Resumen del efecto de *G. intestinalis* sobre la permeabilidad de los fármacos estudiados y posibles consecuencias.

C. Formulaciones

1. Hidrogel inteligente de Glicol Chitosan cargado con Metronidazol

Tras el proceso explicado en el apartado 2.1.1 de Material y Métodos, se obtuvo un hidrogel de Glicol Chitosan conjugado con un péptido sensible a catepsina B y cargado con Metronidazol.

1.1. Preparación y caracterización del polímero: Glicol Chitosan (GC)

Tras la degradación ácida del Glicol Chitosan a diferentes tiempos (3 y 5 horas) se obtienen dos soluciones de las cuales se muestra a continuación su curva potenciométrica y su espectro de resonancia magnética nuclear (RMN). Estas pruebas se realizan para seleccionar cuál de los dos polímeros obtenidos tras la degradación tiene mayor probabilidad de reaccionar con el péptido para la síntesis del hidrogel de Metronidazol. Los polímeros obtenidos se diferencian en el tiempo de degradación ácida al que han sido sometidos. 3HGC corresponde con el polímero cuya degradación ácida ha sido interrumpida a las 3 horas del inicio, y 5HGC a las 5 horas.

En las figuras 5.24 y 5.25 se muestran los valores de pKa de cada solución tras la valoración potenciométrica. El pKa obtenido tras el ensayo de cada una de las muestras fue: pKa 3HGC= 5,9 y pKa 5HGC= 6,29. Esto señala que 5HGC tiene más grupos amino, lo que se traduce en una mayor reactividad, por esto es la mejor opción para realizar la conjugación posterior con el péptido.

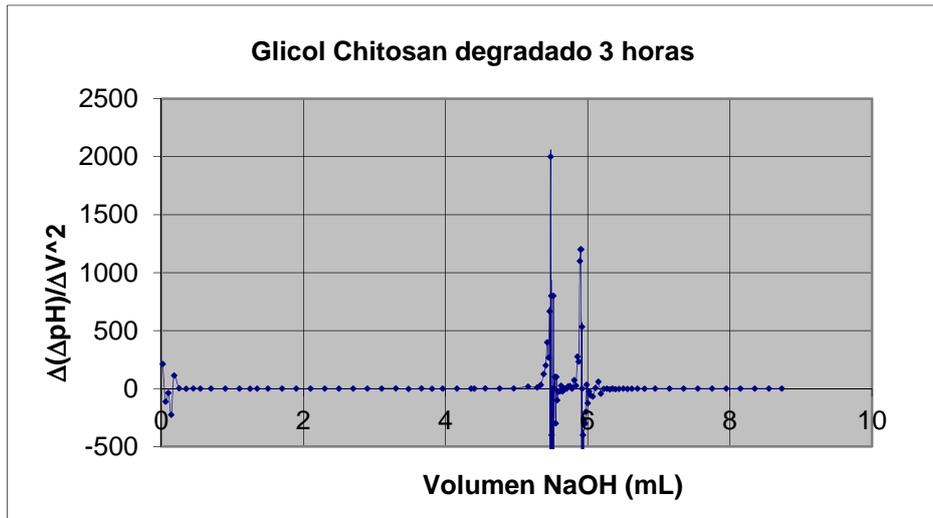


Figura 5.24. Curva potenciométrica para la determinación de pK_a de la solución 3HGC ($pK_a=5,9$).

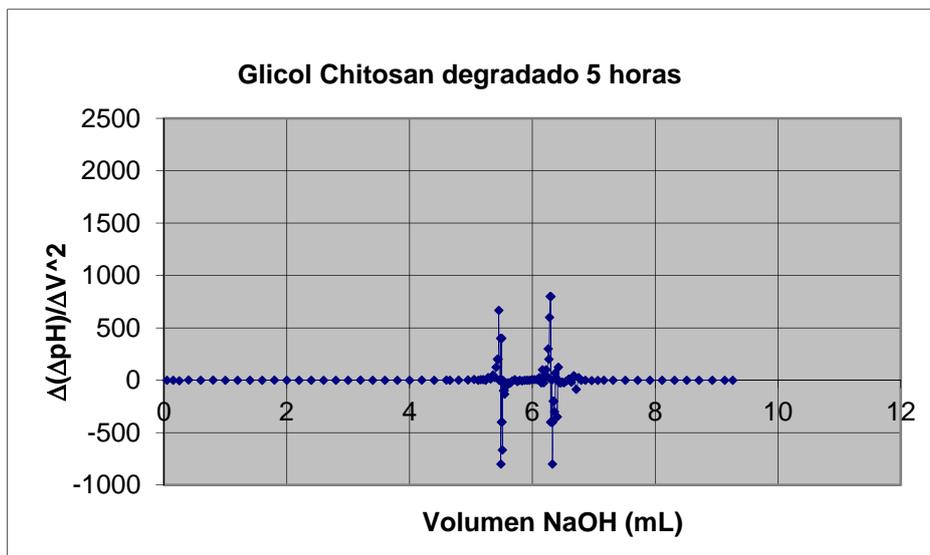


Figura 5.25. Curva potenciométrica para la determinación de pK_a de la solución 5HGC ($pK_a= 6,29$).

En la figura 5.26, se muestra la estructura química del GC y la numeración correspondiente a cada hidrógeno. Esta numeración se utilizará posteriormente para numerar los picos del espectro de RMN que corresponda a cada grupo químico.

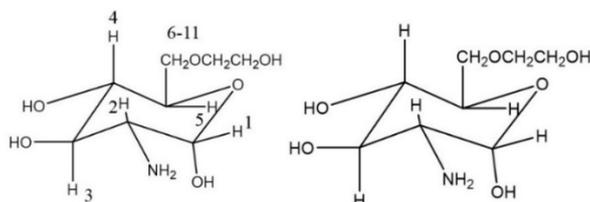


Figura 5.26. Glicol Chitosan. Dibujado con "Chemdraw free 15 days trial". Numeración de cada hidrógeno.

En las figuras 5.27 y 5.28, se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de ambas muestras (3HGC y 5HGC).

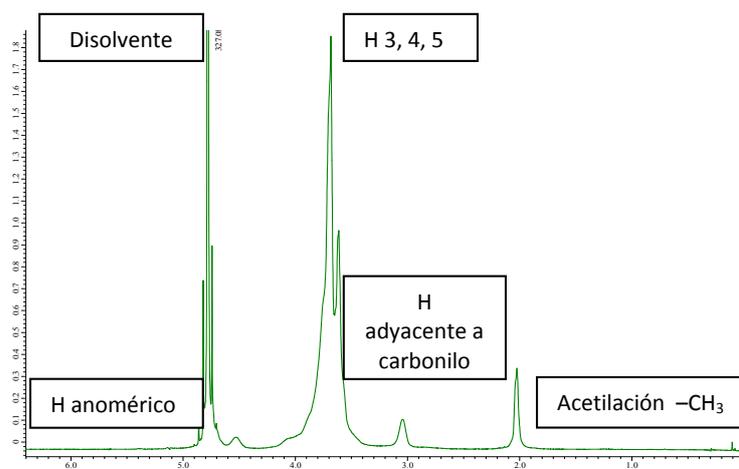


Figura 5.27. Espectro de RMN de la solución de 3HGC ^1H . Identificación de picos.

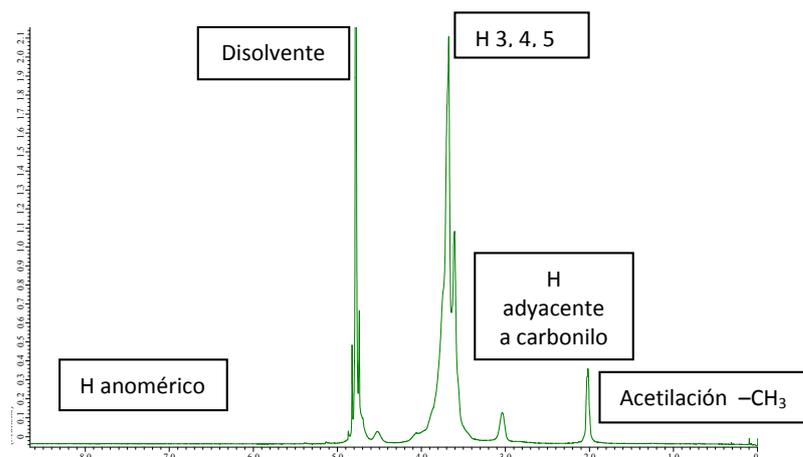


Figura 5.28. Espectro de RMN de la solución de 5HGC ^1H . Identificación de picos.

En estas figuras podemos observar los picos característicos del disolvente (agua) y se pueden identificar los picos característicos de los diferentes hidrógenos presentes en el polímero. Así comprobamos que, efectivamente, es Glicol Chitosan lo que se ha obtenido. El nivel de acetilación se calculó comparando el ratio de protones de los grupos metilo del Glicol Chitosan (3HGC $\delta = 0,98$ ppm; 5HGC $\delta = 0,84$ ppm) con el de los protones del azúcar (3HGC $\delta = 0,64$ ppm; 5HGC $\delta = 0,55$ ppm). Se obtuvo un porcentaje de acetilación de 2,169% y 1,966% para la solución de 3HGC y 5HGC respectivamente. La solución degradada durante 5 horas, efectivamente, muestra un menor porcentaje de acetilación pues al ser sometido a un mayor tiempo de degradación presenta menor peso molecular.

Tras realizar las pruebas anteriores, se selecciona el polímero 5HGC para formar el hidrogel cargado de Metronidazol por ser más reactivo con el péptido y presentar menor peso molecular.

1.2. Caracterización tras la conjugación del polímero Glicol Chitosan (5HGC) con el tetrapéptido (sensible a Catepsina)

La figura 5.29 representa la estructura química del hidrogel obtenido tras la conjugación del tetrapéptido glicina-fenilina-leucina-glicina, con el polímero Glicol Chitosan.

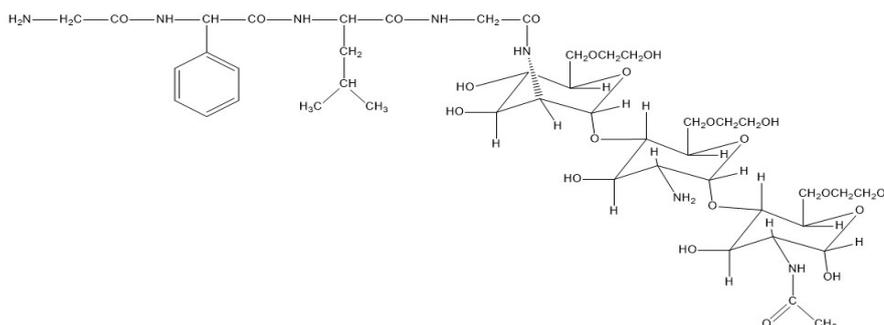


Figura 5.29. Glicol Chitosan conjugado. Dibujado con "Chemdraw free 15 days trial".

La presencia de los aminoácidos que componen el péptido y el polímero se confirma, aunque de manera no concluyente, mediante Resonancia Magnética Nuclear. La figura 5.30 muestra el espectro de RMN obtenido tras la conjugación del tetrapéptido con el Glicol Chitosan.

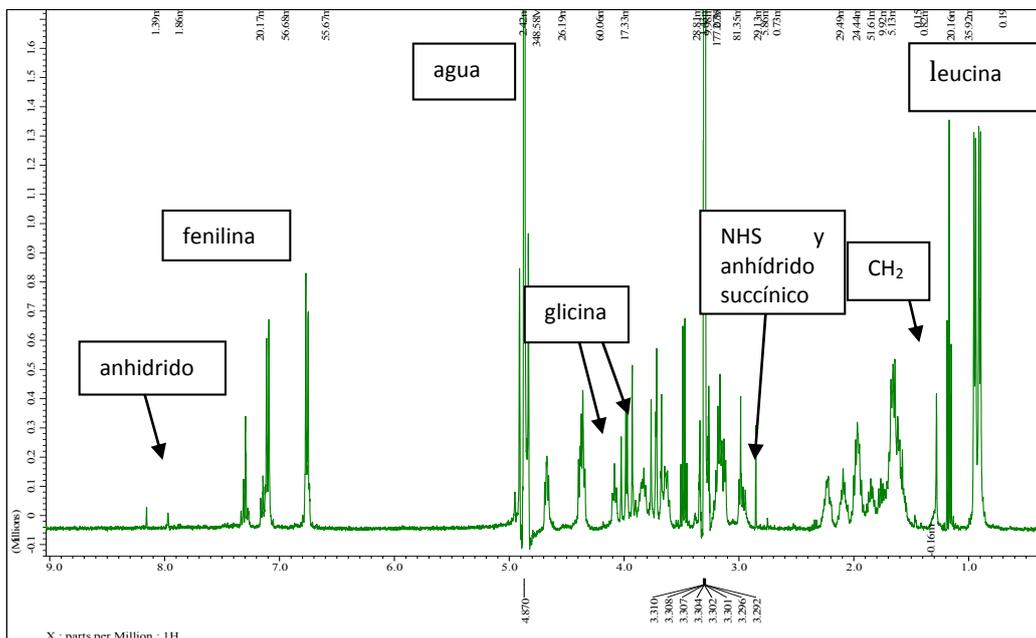


Figura 5.30. Espectro de RMN del 5HG ^1H modificado. Identificación de picos.

1.3. Caracterización del hidrogel tras cargarlo con Metronidazol

Tras realizar la carga del Metronidazol dentro del hidrogel se mide el Potencial Z y el Tamaño de partícula, esto se representa en la tabla 5.68.

	GEL 1	GEL 2
Z-Average	394,17	1397,67
Z-pot. (mV)	-0,0316	-0,0408

Tabla 5.68. Tamaño de partícula y Potencial Z del gel 1 y gel 2.

La figura 5.31. representa la concentración de Metronidazol en el interior de ambos hidrogeles obtenida mediante cromatografía líquida de alta resolución.

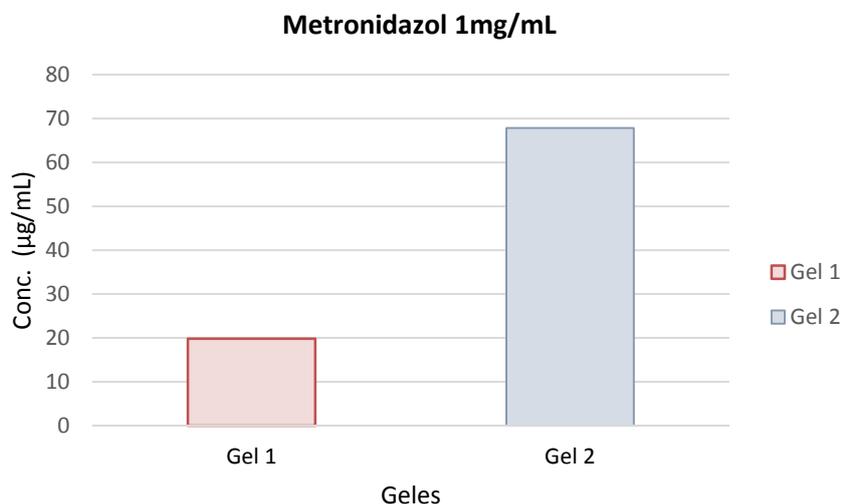


Figura 5.31. Concentración de Metronidazol en las soluciones 1 y 2 obtenido mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Los resultados obtenidos indican que, aunque ambos hidrogeles contienen el fármaco en su interior la eficacia de encapsulación es mayor en el Gel 2 por lo que los ensayos posteriores se realizarán con este gel.

1.4. Ensayo de liberación del hidrogel

El ensayo de liberación se realizó con el hidrogel de Glicol Chitosan cargado con Metronidazol (Gel 2) durante 4 horas en 30 mL de HBSS adicionada de 2% de D-glucosa para permitir la funcionalidad

metabólica de *Giardia intestinalis*. En la figura 5.32, se muestra el perfil de liberación del hidrogel cargado con Metronidazol en ausencia de parásito (control) y en presencia de *G. intestinalis*. Se ha representado la concentración de Metronidazol liberada frente al tiempo.

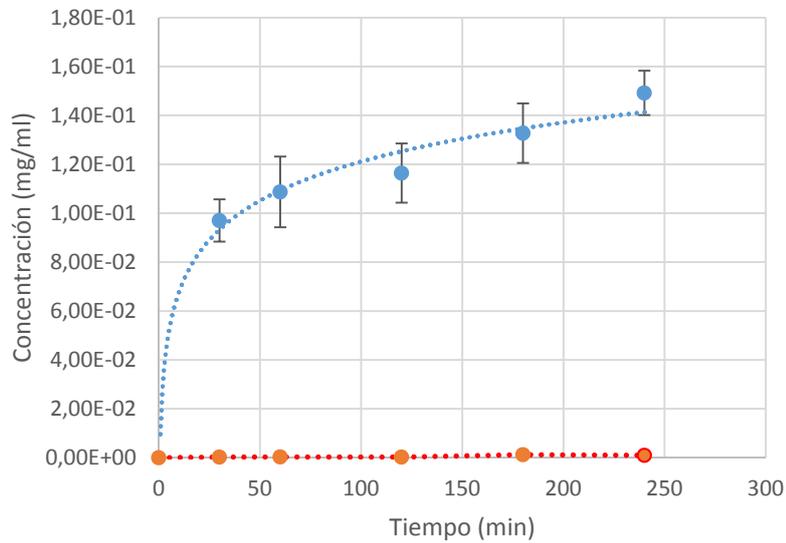


Figura 5.32. Concentración de Metronidazol liberado frente al tiempo, en ausencia del parásito (curva roja) y en presencia de *G. intestinalis* (curva azul).

La figura muestra que en ausencia de *Giardia intestinalis* el Metronidazol no se libera al medio (curva roja) mientras que en presencia del parásito se va liberando el fármaco (curva azul). Esta liberación se produce porque el parásito produce catepsina B, que es la enzima capaz de escindir el tetrapéptido que actúa como agente entrecruzador, por lo que se va liberando el fármaco a medida que se degrada el gel. Se observa que el fármaco se va liberando a lo largo de las 4 horas de tiempo que dura el ensayo, alcanzando un valor máximo de 0,14 mg/mL. El sistema inteligente funciona *in vitro* y permitiría que si el

niño no tiene giardiasis no se liberara la dosis de fármaco y se eliminara el gel con las heces, mientras que si el niño padece la infección el propio parásito indujera la liberación inteligente del Metronidazol. De esta manera la dosis de fármaco se liberaría en el lugar de acción y se minimizarían los efectos secundarios derivados de la acción sistémica del Metronidazol.

2. Micropartículas mesoporosas de sílice con puerta molecular pH dependiente para control biológico de *Giardia intestinalis*

2.1. Descripción del sistema de puerta molecular

Para la presente aplicación, se ha seleccionado como soporte un sólido mesoporoso microparticulado tipo MCM-41, que presenta mesoporos de alrededor de 2 nm, por sus características de porosidad homogénea, biocompatibilidad y facilidad de funcionalización. En relación a la puerta molecular, se ha seleccionado el uso de poliaminas, concretamente del derivado alcoxisilano N'-(3-trimetoxisilil)propil dietilentriamina⁴⁰⁵. Estas moléculas responden a cambios de pH y pueden adicionalmente formar complejos con aniones por vía electrostática. Por todo ello, a pH ácido las poliaminas ancladas a la superficie del material se encuentran protonadas y por tanto se repelen entre ellas produciendo el bloqueo de los poros del material e inhibiendo la liberación del colorante o del fármaco encapsulado. Además, se ha conseguido un mayor bloqueo de los poros por la presencia del anión sulfato de gran tamaño en la disolución de lavado que interacciona con las poliaminas protonadas bloqueando aún más la salida de los poros. A pH neutro o ligeramente básico, las aminas no están protonadas por lo que no se

repelen y no pueden interactuar con el sulfato y como consecuencia se produce la salida masiva del colorante o el fármaco desde los poros a la disolución.

2.2. Caracterización de los materiales preparados

Los sólidos preparados han sido caracterizados siguiendo los procesos estándar de caracterización de materiales funcionalizados con moléculas orgánicas.

La Figura 5.33 muestra el espectro de difracción de rayos-X de los sólidos MCM-41 mesoestructurados, del sólido MCM-41 calcinado, del sólido MCM-Met-N₃ y del sólido MCM-Saf-N₃. El espectro de difracción para la fase MCM-41 mesoestructurada muestra 4 picos típicos de materiales mesoporosos que usan surfactantes como agentes directores de la estructura, dichos picos se pueden indexar como (100), (110), (200) y (210). Debido al proceso de calcinación se produce la contracción de la celda unidad, de ahí que se observe un ligero desplazamiento del pico (100) hacia valores más altos de 2θ . Después del proceso de cargado y anclaje del derivado de poliaminas sobre la superficie del material, en todos los materiales el pico correspondiente al plano (100) no sufre importantes cambios en su posición, lo cual indica que el proceso de funcionalización y cargado no daña sustancialmente la estructura mesoporosa del material.

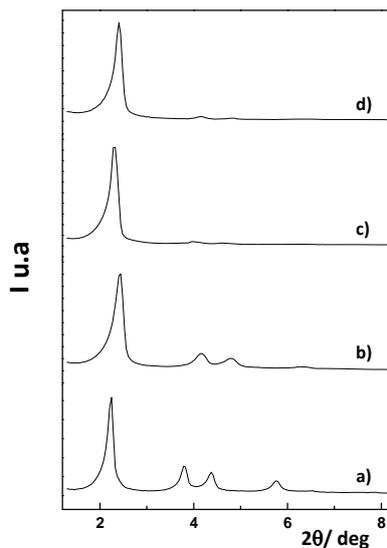


Figura 5.33. Patrón de difracción de RX de polvo para las muestras: a) MCM-41 mesoestructurada, b) MCM-41 calcinada, c) sólido final MCM-Met-N₃ y d) sólido final MCM-Saf-N₃.

La presencia de la estructura mesoporosa en los sólidos funcionalizados, puede además confirmarse mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). La figura 5.34 muestra las imágenes de TEM tomadas para los sólidos MCM 41 calcinada, MCM-Met-N₃ y sólido final MCM-Saf-N₃ donde se observa claramente la estructura porosa típica de los sólidos MCM-41.

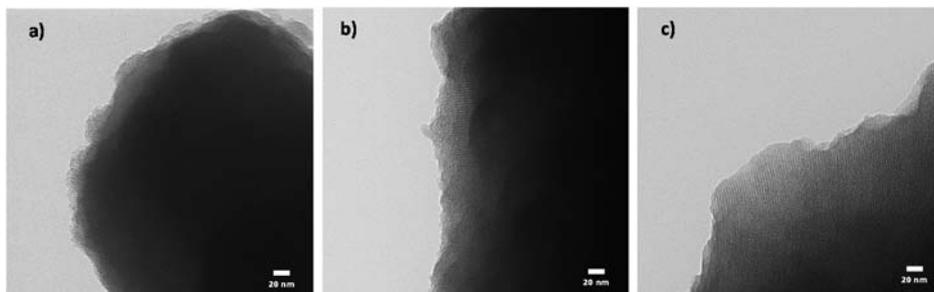


Figura 5.34. Imágenes de TEM de los sólidos a) MCM-41 calcinada, b) sólido MCM-Met-N₃ y c) sólido final MCM-Saf-N₃.

Un aspecto importante relacionado con la caracterización de los materiales obtenidos, es la determinación del grado de funcionalización y de cargado de ellos, en este caso, conocer la cantidad de derivado de poliaminas en la superficie, así como el fármaco o el colorante (según corresponda), atrapado en el interior de los poros del material. Dichas cantidades se calculan mediante estudios termogravimétricos, análisis elemental y resonancia magnética nuclear.

En la figura 5.35, se muestra el termograma obtenido para el material MCM-Met-N₃. En él se pueden diferenciar tres regiones delimitadas por los cambios en la primera derivada, en las que tiene lugar diferentes procesos en función de la temperatura. En la región I (25-180 °C) se observa disminución de masa debida a la pérdida del disolvente adsorbido. En la región II (180-800°C) se produce la combustión de la materia orgánica presente en el material y es por tanto la región que da información sobre los contenidos de los materiales. En el caso de los materiales preparados, la combustión conjunta en esa zona de la poliamina y del fármaco o colorante encapsulado. En la región III (800-1000°C) se observa disminución de peso debido a la pérdida de moléculas de agua como consecuencia de la condensación de grupos silanoles del material.

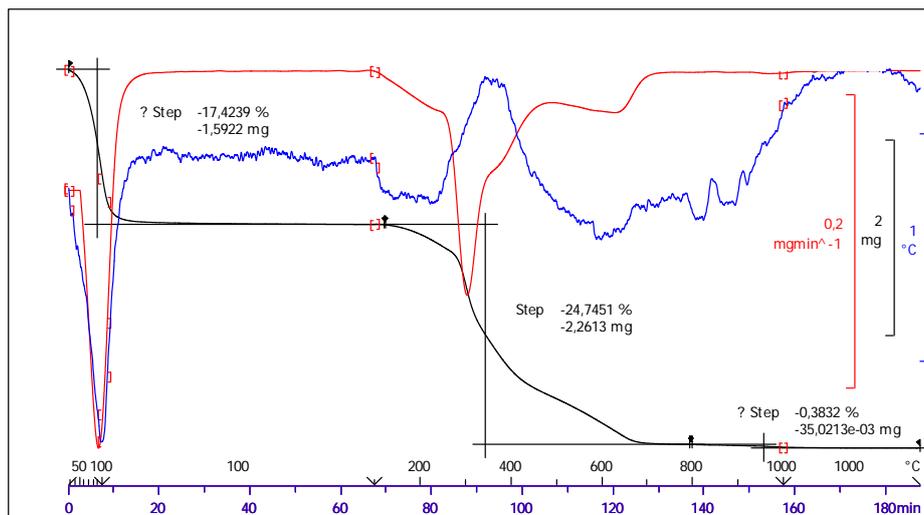


Figura 5.35. Diagrama de ATG con la curva de pérdida de peso (en negro), la primera derivada de la curva (en rojo) y la curva de análisis térmico diferencial (en azul) para el sólido MCM-Met-N₃.

Otra de las técnicas utilizadas es el análisis elemental, esta técnica está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000°C. Los diferentes productos de combustión CO₂, H₂O y N₂, emiten una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla. De los datos de C, H, N y S de los distintos sólidos es posible determinar la cantidad de grupos orgánicos del material, así como la cantidad de aniones sulfatos que interaccionan electrostáticamente con las poliaminas expresadas por milimol por gramo de sólido (mmol/g sólido). Para ello, conociendo el porcentaje en peso de cada elemento y transformándolo en moles, se puede relacionar con la cantidad de cada compuesto teniendo en cuenta el número de átomos de ese tipo en cada compuesto. Por ejemplo, en este caso concreto

los moles de azufre obtenidos en el análisis elemental se corresponde con el número de moles de sulfato presente en el sólido.

Además de las técnicas anteriores, se ha utilizado también la resonancia magnética nuclear para cuantificar los distintos componentes. En este caso se pretenden relacionar las señales del patrón bromuro de tetraetilamonio con las señales de los compuestos cargados y anclados en la superficie. Para ello, una cantidad concreta del sólido en estudio junto a 4 mg de patrón se pesa en un vial y se disuelve en NaOD/D₂O. Este medio básico rompe la estructura del material y deja libres los componentes que se quieren estudiar. En la figura 5.36, se muestra el espectro de resonancia para el sólido MCM-Met-N₃. En ella podemos observar los picos característicos del patrón, cuya integral se relaciona con la cantidad de mmoles añadidos a la mezcla. A su vez, podemos observar los picos característicos de la cadena alifática del derivado de poliamina. Tomando como base para realizar los cálculos el pico c, la integral de este pico se asocia con la relación integral/mmol del patrón para conocer la cantidad en mmoles de derivado de poliamina presente en el sólido. El Metronidazol se ve afectado por el medio tan básico y no es posible determinarlo por esta técnica.

Resultados y Discusión

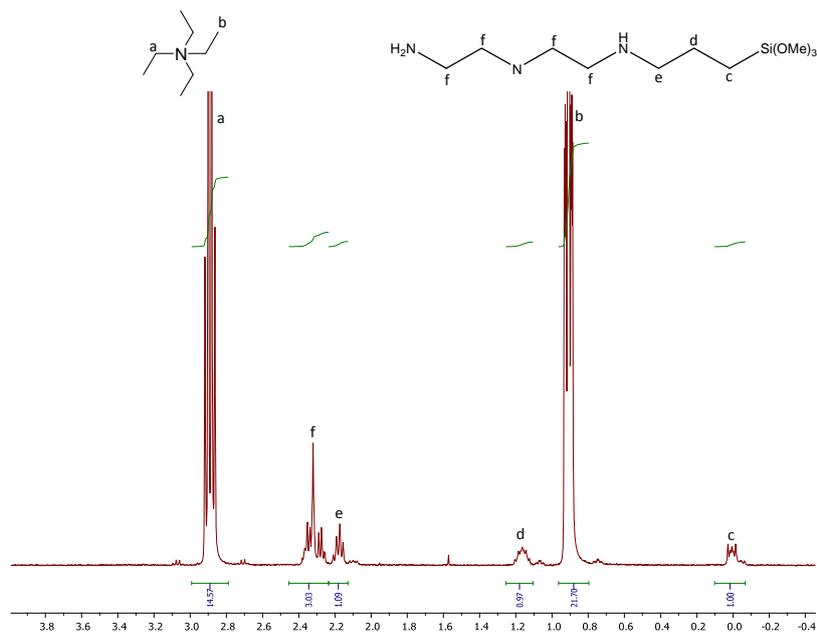


Figura 5.36. Espectro de ^1H -RMN del sólido MCM-Met- N_3 y del patrón.

Por combinación de los resultados extraídos de cada una de las técnicas descritas anteriormente, los contenidos para los materiales en estudio se muestran en la tabla 5.69.

Sólido	mmol poliamina/ g sólido	mmol SO_4 / g sólido	g fármaco/ g sólido	g colorante/ g sólido
MCM-Met- N_3	0,8	0,8	0,05	-
MCM-Saf- N_3	0,9	1,18	-	0,01

Tabla 5.69. Contenidos de grupos poliamina anclados a la superficie y carga en el interior de los poros de los sólidos MCM-Met- N_3 y MCM-Saf- N_3 .

2.3. Ensayos de liberación de las micropartículas

Los ensayos de liberación se realizaron con el sólido cargado con Safranina y con el sólido cargado con Metronidazol. La liberación del sólido con Safranina se realizó para optimizar la síntesis de la puerta molecular ya que se puede determinar fácilmente la cantidad de sólido liberado. La figura 5.37, muestra los resultados obtenidos para el material híbrido cargado con Metronidazol en presencia de los distintos medios descritos. Se ha representado el porcentaje de liberación frente al tiempo. El análisis de la muestras por HPLC, indicó que la máxima liberación obtenida fue de 0,07 g de Metronidazol/g de sólido. Este valor es un poco superior a la carga calculada a partir de las técnicas de caracterización. La diferencia se puede deber a la complejidad de la caracterización química de estas partículas.

Los ensayos se realizaron a partir de 5 mg de sólido en 12,5 mL del medio de liberación correspondiente. Los ensayos de liberación se iniciaron estudiando la liberación del material híbrido cargado con el fármaco a pH= 1,2 (correspondiente al pH del estómago) y a pH= 2. Los resultados obtenidos indicaron que la liberación del compuesto es prácticamente nula incluso después de 24 horas. Ensayos de idénticas características realizados en un medio tamponado a pH= 4,5, revelaron que se producía la liberación continua de Metronidazol durante un período de varias horas. La liberación a pH= 6,8 (correspondiente al pH intestinal) fue relativamente pequeña, ya que el medio tampón recomendado por la farmacopea incluye un anión que bloquea la liberación. No obstante, dado que la liberación se produce a pH poco ácido (pH= 4-5), se ha ensayado la liberación en presencia de medios biorrelevantes FeSSGF y Fessif que simulan la presencia de alimento en

el estómago y en el intestino respectivamente, encontrando que se produce liberación con Fessif. Según este ensayo *in vitro* podríamos conseguir una liberación continua en el intestino si administráramos las micropartículas tanto con alimento como en ausencia del mismo.

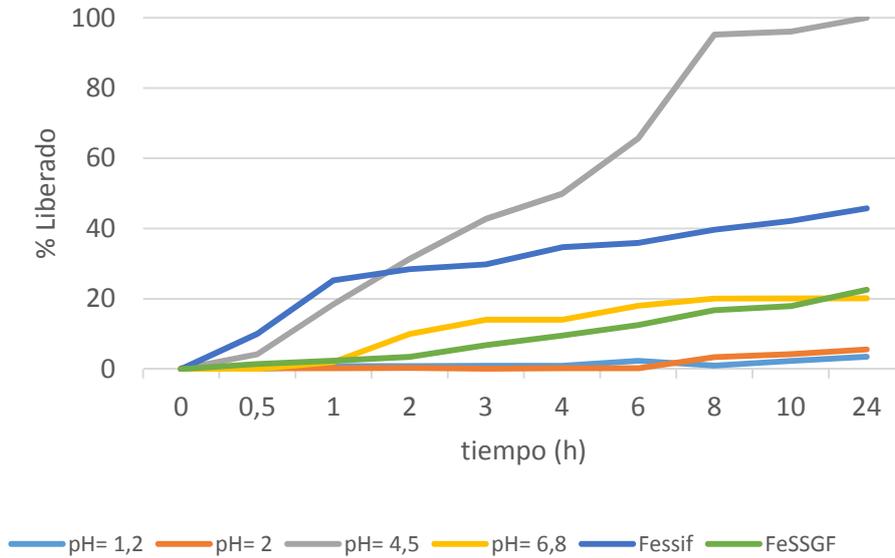


Figura 5.37. Cinética de liberación de Metronidazol desde una suspensión de micropartículas de sílice mesoporosas funcionalizadas con N3 a distintos pHs y en presencia de medios biorrelevantes.

2.4. Ensayos de viabilidad

Los ensayos de viabilidad en placas con *Giardia intestinalis* adicionadas de sólido cargado con Metronidazol (2mg/ml) mostraron, mediante recuento en cámara Neubauer, que la población del parásito se había reducido un 92,4 % en 24 horas. La figura 5.38 muestra la curva de destrucción del parásito en presencia de las micropartículas de Metronidazol en un pH favorable.

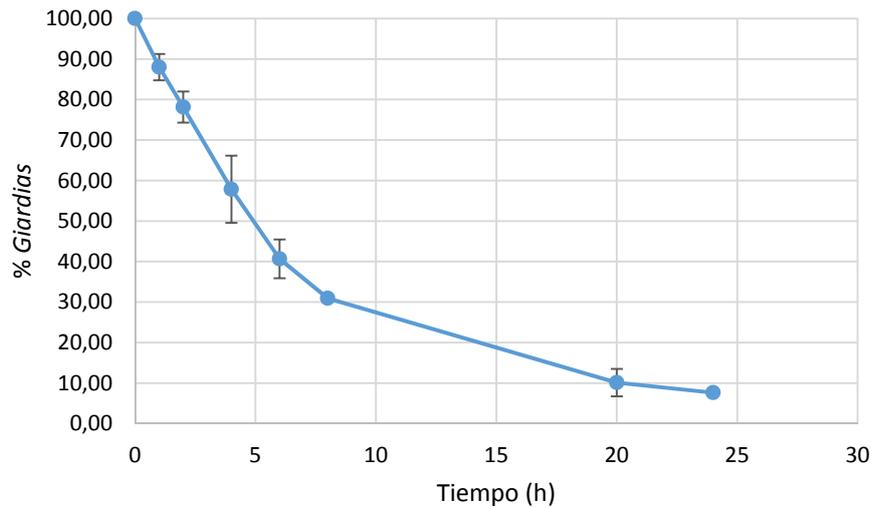


Figura 5.38. Curva de destrucción de *Giardia intestinalis* en presencia de una suspensión de micropartículas de Metronidazol (2mg/mL) a pH= 4,5.

Los ensayos de viabilidad en los sistemas de co-cultivo Caco-2/*Giardia*, se realizaron añadiendo sólido cargado con Metronidazol (2mg/ml) sobre la monocapa de Caco-2 cocultivada durante 2 horas con 400000 giardias/pocillo, tanto sobre la base de la placa como sobre el inserto que se utiliza para realizar los ensayos de permeabilidad tratados en idénticas condiciones.

Pasadas 24 horas, se observaron al microscopio las bases de las placas y se comprobó que no se apreciaba la presencia de giardias y que la monocapa de Caco-2 presentaba confluencia, mientras que en las placas control se observaban grandes huecos.

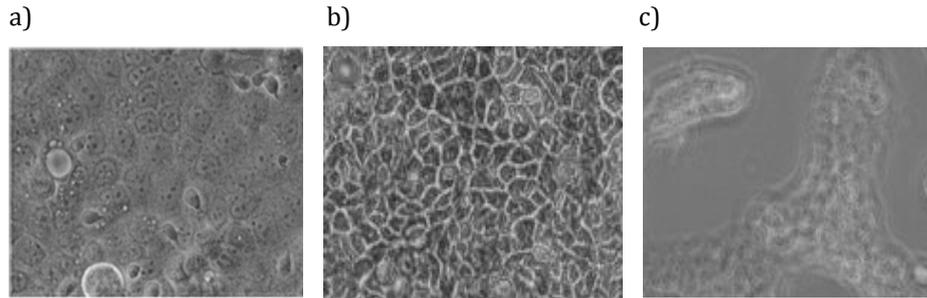


Figura 5.39. a) Monocapa de Caco-2 co-cultivada con *Giardia intestinalis* durante 2h, b) monocapa despues de 24 horas de añadir las micropartículas, c) monocapa despues de 24 horas sin tratamiento.

En el ensayo realizado sobre el inserto se midió el valor de TEER después de 24 horas obteniéndose valores de 262 ± 3 , lo cual indica que las medidas de TEER eran normales y no ocurría lo mismo que cuando *Giardia* actuaba durante todo el tiempo, en los que se obtuvieron valores de 64 ± 6 . Se demuestra así que el fármaco liberado era capaz de ejercer su función antiparasitaria.

Por tanto, los sistemas microparticulares sensibles a pH son adecuados para producir la liberación de su carga, en determinados tramos del tracto gastrointestinal. El sistema utilizado para albergar y liberar Metronidazol se mantiene cerrado a pH ácido y la puerta se abre a pH a partir de 4,5. La liberación se produce siempre que no haya aniones grandes que produzcan impedimento estérico. Por ello, los ensayos *in vitro* determinan que para que la liberación se produzca de manera continua en todo el tracto gastrointestinal, es necesario administrar las micropartículas con alimento. No obstante, es necesario verificar estos resultados con ensayos *in vivo* que se realizarán próximamente.

VI Conclusiones

1. El nuevo modelo experimental *in vitro* de co-cultivo Caco-2/*G. intestinalis* permite que el parásito crezca tapizando la membrana intestinal y produzca el daño que se observa a nivel fisiológico.
2. Este modelo se puede utilizar como herramienta fiable para predecir el efecto de la giardiasis en la absorción de fármacos, reduciendo así los ensayos *in situ* en animales.
3. Los ensayos realizados con fármacos modelo y fármacos de uso pediátrico permitieron determinar que:
 - a. La permeabilidad de los fármacos que se absorben por difusión pasiva, disminuye en presencia de *G. intestinalis* como consecuencia del impedimento estérico que ejerce el parásito.
 - b. Los fármacos que se absorben por la vía paracelular, ven aumentada su permeabilidad en presencia de *G. intestinalis*, ya que las uniones intercelulares se debilitan por acción de las toxinas secretadas por el parásito.
 - c. Los transportadores activos se bloquean en presencia de *G. intestinalis*, provocando una disminución de permeabilidad si el fármaco es sustrato de un transportador de absorción o un aumento de

permeabilidad si se trata de un transportador de secreción.

Por lo tanto, la infección por *Giardia intestinalis* asintomática, además de producir cuadros de malnutrición a largo plazo, puede tener consecuencias muy perjudiciales cuando se tratan patologías asociadas en niños, debido a que produce aumentos y disminuciones importantes en la absorción de fármacos.

4. El tratamiento anti-giardiasis se ha mejorado diseñando formulaciones específicas de Metronidazol:

- a. Un hidrogel inteligente de Metronidazol que permite la liberación del fármaco únicamente en presencia de *Giardia*, evitando efectos secundarios innecesarios así como la aparición de resistencias.
- b. Un sistema microparticulado sensible a pH que permite la liberación de Metronidazol en determinados tramos del tracto gastrointestinal, ya que se mantiene cerrado a pH ácido y la puerta se abre a pH a partir de 4,5 en condiciones concretas.

VI Conclusions

2. The experimental *in vitro* co-cultivation model Caco-2/*G. intestinalis* allows the parasite to grow covering the intestinal membrane and to produce intracellular damage that is observed at physiological level.
3. This model can be used as a reliable tool to predict the effect of giardiasis in drug absorption, thus reducing animal testing *in situ*.
4. The permeability assays carried out with model and paediatric allowed to determine that:
 - a. Drugs that are absorbed by passive diffusion decreases in the presence of *G. intestinalis* as a result of steric hindrance exerted by the parasite.
 - b. The permeability of drugs that are absorbed by paracellular route increases in the presence of *G. intestinalis* because the toxins secreted by the parasite weaken the tight junctions.
 - c. The active carriers are blocked in the presence of *G. intestinalis* causing a decrease in permeability if the drug is transported by influx or an increase in permeability if it is transported by efflux.

Therefore, the asymptomatic giardiasis produces long-term malnutrition, that can be dangerous in children who are receiving medical treatment

Conclusions

for associated diseases because drug absorption could be increased or decreased.

4. The treatment against giardiasis has been improved with the design of more specific Metronidazole formulations:

- a. A smart hydrogel that allow the drug delivery only in the presence of *Giardia* avoiding the loss of drug in the first sections of the gastrointestinal tract as well as the development of resistances.
- b. A silica microparticular system sensitive to pH that produce the Metronidazole delivery in specific gastrointestinal segments due to a molecular gate which is closed at acid pH and opened at pHs values higher than 4,5 at controlled conditions.

VII Bibliografía

1. Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. & Svärd, S. G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 413-22 (2010).
2. Heresi, G. & Cleary, T. G. *Giardia*. *Pediatr. Rev.* **18**, 243-7 (1997).
3. Boreham, P. F., Upcroft, J. A. & Upcroft, P. Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology: 1681-2000. *Int. J. Parasitol.* **20**, 479-87 (1990).
4. Alparo Herrera, I. Giardiasis y desnutrición. *Rev. la Soc. Boliv. Pediatría* **44**, 166-173 (2005).
5. Bernander, R., Palm, J. E. & Svärd, S. G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell. Microbiol.* **3**, 55-62 (2001).
6. Palm, D., Weiland, M., McArthur, A. G., Winiiecka-Krusnell, J., Cipriano, M. J., Birkeland, S. R., Pacocha, S. E., Davids, B., Gillin, F., Linder, E. & Svärd, S. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **141**, 199-207 (2005).
7. Farthing, M. J. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **24**, 79-88 (1997).
8. Adam, R. D. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Rev.* **55**, 706-32 (1991).
9. Oberhuber, G. & Stolte, M. Giardiasis: analysis of histological changes in biopsy specimens of 80 patients. *J. Clin. Pathol.* **43**, 641-3 (1990).
10. Sullivan, P. B., Lunn, P. G., Northrop-Clewes, C. A. & Farthing, M. J. Parasitic infection of the gut and protein-losing enteropathy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **15**, 404-7 (1992).
11. Bartlett, A. V, Englander, S. J., Jarvis, B. A., Ludwig, L., Carlson, J. F. & Topping, J. P. Controlled trial of *Giardia lamblia*: control strategies in day care centers. *Am. J. Public Health* **81**, 1001-6 (1991).
12. Guimarães, S. & Sogayar, M. I. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **37**, 501-6 (1995).

13. Lujan, H. D. Giardia and giardiasis. *Medicina (B. Aires)*. **66**, 70-4 (2006).
14. Müller, N. & von Allmen, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int. J. Parasitol.* **35**, 1339-47 (2005).
15. Wolfe, M. S. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 93-100 (1992).
16. González-Moreno, O., Domingo, L., Teixidor, J. & Gracenea, M. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol. Res.* **108**, 87-93 (2011).
17. Cohen, S. A., Egorov, A. I., Jagai, J. S., Matyas, B. T., DeMaria, A., Chui, K. K. H., Griffiths, J. K. & Naumova, E. N. The SEEDs of two gastrointestinal diseases: socioeconomic, environmental, and demographic factors related to cryptosporidiosis and giardiasis in Massachusetts. *Environ. Res.* **108**, 185-91 (2008).
18. Laupland, K. B. & Church, D. L. Population-based laboratory surveillance for *Giardia sp.* and *Cryptosporidium sp.* infections in a large Canadian health region. *BMC Infect. Dis.* **5**, 72 (2005).
19. Pollock, K. G. J., Smith, H. V., Young, D., Ramsay, C. N. & Reilly, W. J. *Giardia* surveillance in Scotland, 1988-2003. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**, 571-3 (2005).
20. Muñoz Moltó J.M., Bornay Llinares F.J., Navarro i Martínez L., Hernández Ortega R. & Torrús, D. Prevalencia de enteroparasitosis en la población infantil asistente a guarderías públicas de la ciudad de Alcoy (Alicante), España. *J. Bras. Patol.* **37**, 144 (2001).
21. Solaymani-Mohammadi, S. & Singer, S. M. *Giardia duodenalis*: The double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Exp. Parasitol.* **126**, 292-297 (2010).
22. Escobedo, A. A., Almirall, P., Robertson, L. J., Franco, R. M. B., Hanevik, K., Mørch, K. & Cimerman, S. Giardiasis: the ever-present threat of a neglected disease. *Infect. Disord. Drug Targets* **10**, 329-48 (2010).
23. Savioli, L., Smith, H. & Thompson, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the «Neglected Diseases Initiative». *Trends Parasitol.* **22**, 203-8 (2006).
24. Organización Mundial de la Salud. en <OMS <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2924s/2.html>>. Acceso 20 de agosto de 2015.

25. Flanagan, P. A. *Giardia* diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol. Infect.* **109**, 1-22 (1992).
26. Ventura, L. L. A., Oliveira, D. R., Viana, J. C., Santos, J. F. G., Caliari, M. V & Gomes, M. A. Impact of protein malnutrition on histological parameters of experimentally infected animals with *Giardia lamblia*. *Exp. Parasitol.* **133**, 391-5 (2013).
27. Humen, M. A., Pérez, P. F. & Liévin-Le Moal, V. Lipid raft-dependent adhesion of *Giardia intestinalis* trophozoites to a cultured human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell monolayer leads to cytoskeleton-dependent functional injuries. *Cell. Microbiol.* **13**, 1683-702 (2011).
28. Hollm-Delgado, M.-G., Gilman, R. H., Bern, C., Cabrera, L., Sterling, C. R., Black, R. E. & Checkley, W. Lack of an adverse effect of *Giardia intestinalis* infection on the health of Peruvian children. *Am. J. Epidemiol.* **168**, 647-55 (2008).
29. Veenemans, J., Mank, T., Ottenhof, M., Baidjoe, A., Mbugi, E. V, Demir, A. Y., Wielders, J. P. M., Savelkoul, H. F. J. & Verhoef, H. Protection against diarrhea associated with *Giardia intestinalis* is lost with multi-nutrient supplementation: a study in Tanzanian children. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e1158 (2011).
30. Alvarez Guevara, T., Alfonso Fernández, L. A. & Gómez Echevarría, A. H. *Giardia lamblia* extract (giardine): its immunologic mechanism. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. **22**, 155-60 (1994).
31. Nash, T. E., Herrington, D. A., Losonsky, G. A. & Levine, M. M. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* **156**, 974-84 (1987).
32. Faubert, G. M. The immune response to *Giardia*. *Parasitol. Today* **12**, 140-5 (1996).
33. Bouzid, M., Steverding, D. & Tyler, K. M. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, 302-6 (2008).
34. Prucca, C. G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E. V., Rivero, F. D., Saura, A., Carranza, P. G. & Luján, H. D. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature* **456**, 750-754 (2008).
35. Carvalho-Costa, F. A., Gonçalves, A. Q., Lassance, S. L., Silva Neto, L. M. da, Salmazo, C. A. A. & Bóia, M. N. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with

- nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **49**, 147-53 (2007).
36. Ahmed, M. M. & el Hady, H. M. A preliminary survey of parasitic infections and nutritional status among school children in Riyadh, Saudi Arabia. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **19**, 101-5 (1989).
 37. Awasthi, S. & Pande, V. K. Prevalence of malnutrition and intestinal parasites in preschool slum children in Lucknow. *Indian Pediatr.* **34**, 599-605 (1997).
 38. Loewenson, R., Mason, P. R. & Patterson, B. A. Giardiasis and the nutritional status of Zimbabwean schoolchildren. *Ann. Trop. Paediatr.* **6**, 73-8 (1986).
 39. Muniz-Junqueira, M. I. & Queiroz, E. F. O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in living in Brasília. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **35**, 133-41 (2002).
 40. Rodrigues, M. A., de-Carvalho, M. F. & Montenegro, M. R. Effects of protein deficiency and natural intestinal infection with *Giardia lamblia* on jejunal intraepithelial lymphocytes in rats of different ages. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**, 1347-53 (1994).
 41. Sackey, M.-E., Weigel, M. M. & Armijos, R. X. Predictors and nutritional consequences of intestinal parasitic infections in rural Ecuadorian children. *J. Trop. Pediatr.* **49**, 17-23 (2003).
 42. Solomons, N. W. Giardiasis: nutritional implications. *Rev. Infect. Dis.* **4**, 859-69 (1982).
 43. Hjelt, K., Paerregaard, A. & Krasilnikoff, P. A. Giardiasis: haematological status and the absorption of vitamin B12 and folic acid. *Acta Paediatr.* **81**, 29-34 (1992).
 44. Berkman, D. S., Lescano, A. G., Gilman, R. H., Lopez, S. L. & Black, M. M. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet (London, England)* **359**, 564-71 (2002).
 45. Cordingley, F. T. & Crawford, G. P. *Giardia* infection causes vitamin B12 deficiency. *Aust. N. Z. J. Med.* **16**, 78-9 (1986).
 46. Springer, S. C. & Key, J. D. Vitamin B12 deficiency and subclinical infection with *Giardia lamblia* in an adolescent with agammaglobulinemia of Bruton. *J. Adolesc. Health* **20**, 58-61 (1997).
 47. Wilson, W. M., Dufour, D. L., Staten, L. K., Barac-Nieto, M., Reina, J. C. & Spurr, G. B. Gastrointestinal parasitic infection,

- anthropometrics, nutritional status, and physical work capacity in Colombian boys. *Am. J. Hum. Biol.* **11**, 763-771 (1999).
48. Belosevic, M., Faubert, G. M. & MacLean, J. D. Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. *Gut* **30**, 1213-9 (1989).
 49. Al-Mekhlafi, M. S. H., Azlin, M., Nor Aini, U., Shaik, A., Sa'iah, A., Fatmah, M. S., Ismail, M. G., Ahmad Firdaus, M. S., Aisah, M. Y., Rozlida, A. R. & Norhayati, M. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**, 686-91 (2005).
 50. Buret, A., Gall, D. G. & Olson, M. E. Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. *Parasitol. Res.* **77**, 109-14 (1991).
 51. Buret, A., Gall, D. G. & Olson, M. E. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *J. Parasitol.* **76**, 403-9 (1990).
 52. Buret, A., Hardin, J. A., Olson, M. E. & Gall, D. G. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology* **103**, 506-13 (1992).
 53. Daniels, C. W. & Belosevic, M. Disaccharidase activity in the small intestine of susceptible and resistant mice after primary and challenge infections with *Giardia muris*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**, 382-90 (1992).
 54. Fisher, B. S., Estraña, C. E. & Cole, J. a. Modeling long-term host cell-*Giardia lamblia* interactions in an *in vitro* co-culture system. *PLoS One* **8**, (2013).
 55. Chávez, B., Knaippe, F., Gonzalez-Mariscal, L. & Martínez-Palomo, A. *Giardia lamblia*: electrophysiology and ultrastructure of cytopathology in cultured epithelial cells. *Exp. Parasitol.* **61**, 379-89 (1986).
 56. Daniels, C. W. & Belosevic, M. Disaccharidase activity in male and female C57BL/6 mice infected with *Giardia muris*. *Parasitol. Res.* **81**, 143-7 (1995).
 57. Favennec, L., Magne, D. & Gobert, J. G. Cytopathogenic effect of *Giardia intestinalis*, *in vitro*. *Parasitol. Today* **7**, 141 (1991).

58. Sousa, M. C., Gonçalves, C. A., Bairos, V. A. & Poiares-Da-Silva, J. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 258-65 (2001).
59. Teoh, D. A., Kamieniecki, D., Pang, G. & Buret, A. G. *Giardia lamblia* rearranges F-actin and alpha-actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance. *J. Parasitol.* **86**, 800-6 (2000).
60. Oberhuber, G., Kastner, N. & Stolte, M. Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. *Scand. J. Gastroenterol.* **32**, 48-51 (1997).
61. Singh, K. D., Bhasin, D. K., Rana, S. V., Vaiphei, K., Katyal, R., Vinayak, V. K. & Singh, K. Effect of *Giardia lamblia* on duodenal disaccharidase levels in humans. *Trop. Gastroenterol.* **21**, 174-6 (2010).
62. Torres, M. R. F. Influência da microbiota duodenal de crianças com giardíase na infecção experimental por *Giardia duodenalis* em camundongos axênicos, holoxênicos e gnotoxênicos. (1997).
63. Pegado, M. G. & de Souza, W. Role of surface components in the process of interaction of *Giardia duodenalis* with epithelial cells *in vitro*. *Parasitol. Res.* **80**, 320-6 (1994).
64. Katelaris, P. H. & Farthing, M. J. Diarrhoea and malabsorption in giardiasis: a multifactorial process? *Gut* **33**, 295-7 (1992).
65. Rodríguez-Fuentes, G. B., Cedillo-Rivera, R., Fonseca-Liñán, R., Argüello-García, R., Muñoz, O., Ortega-Pierres, G. & Yépez-Mulia, L. *Giardia duodenalis*: analysis of secreted proteases upon trophozoite-epithelial cell interaction *in vitro*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 693-6 (2006).
66. Ringqvist, E., Palm, J. E. D., Skarin, H., Hehl, A. B., Weiland, M., Davids, B. J., Reiner, D. S., Griffiths, W. J., Eckmann, L., Gillin, F. D. & Svärd, S. G. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **159**, 85-91 (2008).
67. Chávez, B., González-Mariscal, L., Cedillo-Rivera, R. & Martínez-Palomo, A. *Giardia lamblia*: *in vitro* cytopathic effect of human isolates. *Exp. Parasitol.* **80**, 133-8 (1995).
68. Chin, A. C., Teoh, D. A., Scott, K. G.-E., Meddings, J. B., Macnaughton, W. K. & Buret, A. G. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect. Immun.* **70**, 3673-80 (2002).

69. Holmes, R. & Lobley, R. W. Intestinal brush border revisited. *Gut* **30**, 1667-78 (1989).
70. Peterson, M. D. & Mooseker, M. S. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *J. Cell Sci.* **102**, 581-600 (1992).
71. Erlandsen, S. L. *Scanning electron microscopy of intestinal Giardiasis: Lesions of the microvillous border of the villus epithelial cells produced by trophozoites of Giardia.* *Scan. Electron Microsc.* (1974).
72. Smith, P. D. Pathophysiology and immunology of giardiasis. *Annu. Rev. Med.* **36**, 295-307 (1985).
73. Feely, D. E., Schollmeyer, J. V & Erlandsen, S. L. *Giardia* spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp. Parasitol.* **53**, 145-54 (1982).
74. Holberton, D. V. Arrangement of subunits in microribbons from *Giardia*. *J. Cell Sci.* **47**, 167-85 (1981).
75. Buret, A. G. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut* **56**, 316-7 (2007).
76. Peattie, D. A., Alonso, R. A., Hein, A. & Caulfield, J. P. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *J. Cell Biol.* **109**, 2323-35 (1989).
77. Inge, P. M., Edson, C. M. & Farthing, M. J. Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. *Gut* **29**, 795-801 (1988).
78. Samra, H. K., Ganguly, N. K. & Mahajan, R. C. Human milk containing specific secretory IgA inhibits binding of *Giardia lamblia* to nylon and glass surfaces. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* **9**, 100-3 (1991).
79. Weiland, M. E.-L., McArthur, A. G., Morrison, H. G., Sogin, M. L. & Svärd, S. G. Annexin-like alpha giardins: a new cytoskeletal gene family in *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* **35**, 617-26 (2005).
80. Buret, A., Gall, D. G., Nation, P. N. & Olson, M. E. Intestinal protozoa and epithelial cell kinetics, structure and function. *Parasitol. Today* **6**, 375-80 (1990).
81. Buret, A., Olson, M. E., Gall, D. G. & Hardin, J. A. Effects of orally administered epidermal growth factor on enteropathogenic

- Escherichia coli infection in rabbits. *Infect. Immun.* **66**, 4917-23 (1998).
82. Rubin, W., Ross, L. L., Sleisenger, M. H. & Weser, E. An electron microscopic study of adult celiac disease. *Lab. Invest.* **15**, 1720-47 (1966).
83. Dvorak, A. *Ultrastructural pathology of Crohn's disease. Inflamm. bowel Dis. Res. Clin. Implic.* (1988).
84. Curtis, G. H., Patrick, M. K., Catto-Smith, A. G. & Gall, D. G. Intestinal anaphylaxis in the rat. Effect of chronic antigen exposure. *Gastroenterology* **98**, 1558-66 (1990).
85. Gunasekaran, T. S. & Hassall, E. Giardiasis mimicking inflammatory bowel disease. *J. Pediatr.* **120**, 424-6 (1992).
86. Scott, K. G., Logan, M. R., Klammer, G. M., Teoh, D. A. & Buret, A. G. Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect. Immun.* **68**, 3412-8 (2000).
87. Ferreira, R. C., Forsyth, L. E., Richman, P. I., Wells, C., Spencer, J. & MacDonald, T. T. Changes in the rate of crypt epithelial cell proliferation and mucosal morphology induced by a T-cell-mediated response in human small intestine. *Gastroenterology* **98**, 1255-63 (1990).
88. Ferguson, A. Models of intestinal hypersensitivity. *Clin. Gastroenterol.* **5**, 271-88 (1976).
89. Lionetti, P., Breese, E., Braegger, C. P., Murch, S. H., Taylor, J. & MacDonald, T. T. T-cell activation can induce either mucosal destruction or adaptation in cultured human fetal small intestine. *Gastroenterology* **105**, 373-81 (1993).
90. Roberts-Thomson, I. C. & Mitchell, G. F. Giardiasis in mice. I. Prolonged infections in certain mouse strains and hypothyroid (nude) mice. *Gastroenterology* **75**, 42-6 (1978).
91. Eckmann, L. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol.* **25**, 259-70 (2003).
92. Langford, T. D., Housley, M. P., Boes, M., Chen, J., Kagnoff, M. F., Gillin, F. D. & Eckmann, L. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect. Immun.* **70**, 11-8 (2002).
93. Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T. D., Hetsko, M. L., Smith, J. R., Kagnoff, M. F. & Gillin, F. D. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential

- determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* **164**, 1478-87 (2000).
94. Aley, S. B., Zimmerman, M., Hetsko, M., Selsted, M. E. & Gillin, F. D. Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect. Immun.* **62**, 5397-403 (1994).
 95. Li, E., Zhou, P., Petrin, Z. & Singer, S. M. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect. Immun.* **72**, 6642-9 (2004).
 96. Roxström-Lindquist, K., Ringqvist, E., Palm, D. & Svärd, S. *Giardia lamblia*-induced changes in gene expression in differentiated Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **73**, 8204-8 (2005).
 97. Kamda, J. D. & Singer, S. M. Phosphoinositide 3-kinase-dependent inhibition of dendritic cell interleukin-12 production by *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* **77**, 685-93 (2009).
 98. Rópolo, A. S. & Touz, M. C. A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. *ScientificWorldJournal.* **10**, 2019-31 (2010).
 99. Stadelmann, B., Hanevik, K., Andersson, M. K., Bruserud, O. & Svärd, S. G. The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during *Giardia* - host cell interactions *in vitro*. *BMC Microbiol.* **13**, 256 (2013).
 100. Banik, S., Renner Viveros, P., Seeber, F., Klotz, C., Ignatius, R. & Aebischer, T. *Giardia duodenalis* arginine deiminase modulates the phenotype and cytokine secretion of human dendritic cells by depletion of arginine and formation of ammonia. *Infect. Immun.* **81**, 2309-17 (2013).
 101. Nash, T. E. & Mowatt, M. R. Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and estimation of the VSP gene repertoire size. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**, 219-27 (1992).
 102. Nash, T. E., Aggarwal, A., Adam, R. D., Conrad, J. T. & Merritt, J. W. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* **141**, 636-41 (1988).
 103. Testa, F., Mastronicola, D., Cabelli, D. E., Bordi, E., Pucillo, L. P., Sarti, P., Saraiva, L. M., Giuffrè, A. & Teixeira, M. The superoxide reductase from the early diverging eukaryote *Giardia intestinalis*. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1567-74 (2011).

104. Pinto, A. F., Rodrigues, J. V & Teixeira, M. Reductive elimination of superoxide: Structure and mechanism of superoxide reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 285-97 (2010).
105. Mastronicola, D., Testa, F., Forte, E., Bordi, E., Pucillo, L. P., Sarti, P. & Giuffrè, A. Flavohemoglobin and nitric oxide detoxification in the human protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 654-8 (2010).
106. Rafferty, S., Luu, B., March, R. E. & Yee, J. *Giardia lamblia* encodes a functional flavohemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 347-51 (2010).
107. Mastronicola, D., Giuffrè, A., Testa, F., Mura, A., Forte, E., Bordi, E., Pucillo, L. P., Fiori, P. L. & Sarti, P. *Giardia intestinalis* escapes oxidative stress by colonizing the small intestine: A molecular hypothesis. *IUBMB Life* **63**, 21-5 (2011).
108. Soto-Méndez, M. J., Aguilera, C. M., Mesa, M. D., Campaña-Martín, L., Martín-Laguna, V., Solomons, N. W., Schuemann, K. & Gil, Á. Interaction of *Giardia intestinalis* and Systemic Oxidation in Preschool Children in the Western Highlands of Guatemala. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2015).
109. Demirci, M., Delibas, N., Altuntas, I., Oktem, F. & Yönden, Z. Serum iron, zinc and copper levels and lipid peroxidation in children with chronic giardiasis. *J. Health. Popul. Nutr.* **21**, 72-5 (2003).
110. Mabley, J. G., Pacher, P., Deb, A., Wallace, R., Elder, R. H. & Szabó, C. Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation. *FASEB J.* **19**, 290-2 (2005).
111. Altmeyer, M., Barthel, M., Eberhard, M., Rehrauer, H., Hardt, W.-D. & Hottiger, M. O. Absence of poly(ADP-ribose) polymerase 1 delays the onset of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced gut inflammation. *Infect. Immun.* **78**, 3420-31 (2010).
112. Nossa, C. W. & Blanke, S. R. *Helicobacter pylori* activation of PARP-1: usurping a versatile regulator of host cellular health. *Gut Microbes* **1**, 373-8 (2010).
113. Kowalczykowski, S. C. An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
114. Anderson, J. M. & Van Itallie, C. M. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* **269**, G467-75 (1995).

115. Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. & Tsukita, S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123**, 1777-88 (1993).
116. Fasano, A., Baudry, B., Pumplun, D. W., Wasserman, S. S., Tall, B. D., Ketley, J. M. & Kaper, J. B. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5242-6 (1991).
117. Berkes, J., Viswanathan, V. K., Savkovic, S. D. & Hecht, G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* **52**, 439-51 (2003).
118. Guttman, J. A. & Finlay, B. B. Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 832-41 (2009).
119. O'Hara, J. R. & Buret, A. G. Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Front. Biosci.* **13**, 7008-21 (2008).
120. Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A. & Anderson, J. M. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **273**, 29745-53 (1998).
121. González-Mariscal, L., Betanzos, A. & Avila-Flores, A. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 315-24 (2000).
122. Anderson, J. M. & Van Itallie, C. M. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a002584 (2009).
123. Tepass, U. Claudin complexities at the apical junctional complex. *Nat. Cell Biol.* **5**, 595-7 (2003).
124. Troeger, H., Epple, H.-J., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, G.-D., Jelinek, T., Zeitz, M., Fromm, M. & Schulzke, J.-D. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* **56**, 328-35 (2007).
125. Muza-Moons, M. M., Schneeberger, E. E. & Hecht, G. A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **6**, 783-93 (2004).
126. Guignot, J. & Servin, A. L. Maintenance of the Salmonella-containing vacuole in the juxtannuclear area: a role for intermediate filaments. *Microb. Pathog.* **45**, 415-22 (2008).

127. Johnston, J. A., Ward, C. L. & Kopito, R. R. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* **143**, 1883-98 (1998).
128. Haslett, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *Br. Med. Bull.* **53**, 669-83 (1997).
129. Katelaris, P. H., Naeem, A. & Farthing, M. J. Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human intestinal cell line. *Gut* **37**, 512-8 (1995).
130. Ash, L. R. & Orihel, T. C. *Atlas de Parasitologia Humana/ Atlas of Human Parasitology*. (Ed. Médica Panamericana, 2010).
131. Gardner, T. B. & Hill, D. R. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 114-28 (2001).
132. Thompson, R. C. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* **30**, 1259-67 (2000).
133. Adam, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 447-75 (2001).
134. Bassily, S., Farid, Z., Mikhail, J. W., Kent, D. C. & Lehman, J. S. The treatment of *Giardia lamblia* infection with mepacrine, metronidazole and furazolidone. *J. Trop. Med. Hyg.* **73**, 15-8 (1970).
135. Guerreiro, N. M., Herrera, P. M., de Escalona, L., de Kolster, C. E., de Yanes, V. G., de Febres, O., Naveda, O. & de Naveda, M. *Giardia lamblia*: comparison of two diagnostic methods and evaluation of response to treatment with metronidazole. *G. E. N.* **45**, 105-10 (1991).
136. Cimerman, B., Camilo Coura L, C Salle JM, Gurvitz, R., Rocha, R., Bandeira, S., Cimerman, S. & Katz, N. Evaluation of Secnidazole Gel and Tinidazole Suspension in the Treatment of Giardiasis in Children. *Braz. J. Infect. Dis.* **1**, 241-247 (1997).
137. Di Prisco, M. C., Jiménez, J. C., Rodríguez, N., Costa, V., Villamizar, J., Silvera, A., Carrillo, M., Lira, C., Zerpa, E. & López, Y. Clinical trial with Secnidazole in a single dose in Venezuelan children infected by *Giardia intestinalis*. *Invest. Clin.* **41**, 179-88 (2000).
138. Vesey, C. J. & Peterson, W. L. Review article: the management of Giardiasis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **13**, 843-50 (1999).
139. Upcroft, J. A. & Upcroft, P. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today* **9**, 187-90 (1993).

140. Nash, T. E., Ohl, C. A., Thomas, E., Subramanian, G., Keiser, P. & Moore, T. A. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 22-8 (2001).
141. Secnidazol. en <<http://www.complejob.net/2011/11/secnidazol-500-mg.html>>. Acceso 5 de septiembre de 2015.
142. Edlind, T. D., Hang, T. L. & Chakraborty, P. R. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. *J. Infect. Dis.* **162**, 1408-11 (1990).
143. Misra, P. K., Kumar, A., Agarwal, V., Jagota, S. C. A comparative clinical trial of albendazole versus metronidazole in children with giardiasis. *Indian Pediatr.* **32**, 779-82 (1995).
144. Thews, G., Mutschler, E. & Vaupel, P. *Tracto Gastrointestinal y digestión. Anatomía, Fisiol. y Patol. del hombre.* (Reverté, 1983).
145. Plá-Delfina, J. & Martín Villodre, A. *Absorción gastrointestinal. Biofarm. y Farm. Vol. II* (1998).
146. Páez, X. Fisiología del aparato digestivo. (2014). en <<https://http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/32942/7/p9.pdf>>. Acceso 21 de agosto de 2105.
147. Oltra-Noguera, D. Estudio de la variabilidad de la permeabilidad intestinal de fármacos. Estudio *in vitro* e *in situ*. (2010).
148. Mayerson, M. *Principles of drug absorption. Mod. Pharm.* (Marcel Dekker, 1995).
149. Jackson, M. *Drug transport across gastrointestinal epithelia. Physiol. Gastrointest. tract* (Raven Press, 1987).
150. Merino Sanjuán, V., Catalán Latorre, A., Casabó Alós, V. G., Merino Sanjuán, M. en *Metodol. Biofarm. en el Desarro. Medicam.* (ed. Isabel González Álvarez, Miguel Ángel Cabrera Pérez, M. del V. B. S.) 567 (UMH, 2015).
151. Ballard, S. T., Hunter, J. H. & Taylor, A. E. Regulation of tight-junction permeability during nutrient absorption across the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 35-55 (1995).
152. Artursson, P. & Karlsson, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 880-5 (1991).
153. González-Álvarez, I. Estudio *in situ* e *in vitro* de los mecanismos de absorción y secreción intestinal del 3' metilciprofloxacino. (2003).

Bibliografía

154. Shiau, Y. F., Fernandez, P., Jackson, M. J. & McMonagle, S. Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *Am. J. Physiol.* **248**, G608-17 (1985).
155. Plá Delfina, J., Pérez Buendía, J., Casabó, V. & Martín Villodre, A. Absorption-partition relationships for true homologous series of compounds as a possible approach to study mechanisms of surfactants in absorption I. *Int J Pharm* 49-64 (1987).
156. Cormet-Boyaka, E., Huneau, J. F., Mordrelle, A., Boyaka, P. N., Carbon, C., Rubinstein, E. & Tomé, D. Secretion of sparfloxacin from the human intestinal Caco-2 cell line is altered by P-glycoprotein inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2607-11 (1998).
157. Carlstedt, I., Sheehan, J. K., Corfield, A. P. & Gallagher, J. T. Mucous glycoproteins: a gel of a problem. *Essays Biochem.* **20**, 40-76 (1985).
158. Sánchez-Picó, A., Peris-Ribera, J. E., Toledano, C., Torres-Molina, F., Casabó, V. G., Martín-Villodre, A. & Plá-Delfina, J. M. Non-linear intestinal absorption kinetics of cefadroxil in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **41**, 179-85 (1989).
159. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-31 (1972).
160. Modelo de mosaico fluido | Portal Académico del CCH. en <[http://portalacademico.cch.unam.mx/alumno/biologia1/unidad 2/membranacelular/mosaicofluido](http://portalacademico.cch.unam.mx/alumno/biologia1/unidad%202/membranacelular/mosaicofluido)>. Acceso 20 de septiembre de 2015.
161. Pignatello, R., Musumeci, T., Basile, L., Carbone, C. & Puglisi, G. Biomembrane models and drug-biomembrane interaction studies: Involvement in drug design and development. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **3**, 4-14 (2011).
162. La membrana plasmática. en <http://www.wikillerato.org/La_membrana_plasm%C3%A1tica.htm>. Acceso 22 de agosto de 2015.
163. Sjostrand, F. The ultrastructure of the plasma membrane of columnar epithelium cells of the mouse intestine. *J Ultrastruct Res* 517-543 (1963).
164. Brasitus, T. A. & Schachter, D. Lipid dynamics and lipid-protein interactions in rat enterocyte basolateral and microvillus membranes. *Biochemistry* **19**, 2763-9 (1980).

165. Escribá, P. V, González-Ros, J. M., Goñi, F. M., Kinnunen, P. K. J., Vigh, L., Sánchez-Magraner, L., Fernández, A. M., Busquets, X., Horváth, I. & Barceló-Coblijn, G. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 829-75 (2008).
166. Hayton, W. L. Rate-limiting barriers to intestinal drug absorption: a review. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **8**, 321-34 (1980).
167. Bradshaw, D. M. & Arceci, R. J. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.* **16**, 3674-90 (1998).
168. Krishan, A., Fitz, C. M. & Andritsch, I. Drug retention, efflux, and resistance in tumor cells. *Cytometry* **29**, 279-85 (1997).
169. Berndt, W. O. The role of transport in chemical nephrotoxicity. *Toxicol. Pathol.* **26**, 52-7 (1998).
170. Owens, M. J. & Nemeroff, C. B. The serotonin transporter and depression. *Depress. Anxiety* **8 Suppl 1**, 5-12 (1998).
171. Reith, M. E., Xu, C. & Chen, N. H. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *Eur. J. Pharmacol.* **324**, 1-10 (1997).
172. Baly, D. L. & Horuk, R. The biology and biochemistry of the glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **947**, 571-90 (1988).
173. Silverthorn, D. U. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado 4a edición.* (Ed. Médica Panamericana, 2008).
174. Stainer, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. & Painter, P. R. en *Microbiología* 211-215 (1988).
175. Guyton, A. C. & Hall, J. E. *Textbook of Medical Physiology.* (Elsevier España, 2006).
176. Hall, A. C. G. and J. E. en *Tratado Fisiol. Médica* 45-60 (Mc Graw-Hill Interamericana, 1999).
177. P.W. Swaan, S. Oie, and J. F. C. S. Carrier-mediated oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1-4 (1996).
178. Estudante, M., Morais, J. G., Soveral, G. & Benet, L. Z. Intestinal drug transporters: An overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1340-1356 (2013).
179. Piquette-Miller, M., Pak, A., Kim, H., Anari, R. & Shahzamani, A. Decreased expression and activity of P-glycoprotein in rat liver during acute inflammation. *Pharm. Res.* **15**, 706-11 (1998).

180. Drozdziak, M., Groer, C., Penski, J., Lapczuk, J., Ostrowski, M., Lai, Y., Prasad, B., Unadkat, J. D., Siegmund, W. & Oswald, S. Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. *Mol Pharm* **11**, 3547-3555 (2014).
181. Dallas, S., Miller, D. S. & Bendayan, R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* **58**, 140-61 (2006).
182. Jeong, C.-B., Kim, B.-M., Lee, J.-S. & Rhee, J.-S. Genome-wide identification of whole ATP-binding cassette (ABC) transporters in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *BMC Genomics* **15**, 651 (2014).
183. Couture, L., Nash, J. A. & Turgeon, J. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacol. Rev.* **58**, 244-58 (2006).
184. Deeley, R. G., Westlake, C. & Cole, S. P. C. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol. Rev.* **86**, 849-99 (2006).
185. Maggwtun, N. Human ABC transporters. *Hum. ABC Transp.* (2002).
186. Hidalgo, I. J. Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**, 385-401 (2001).
187. Balimane, P. V & Chong, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov. Today* **10**, 335-43 (2005).
188. Cabrera Pérez, M. A., García, A. R., Teruel, C. F., Alvarez, I. G. & Sanz, M. B. A topological-substructural molecular design (TOPS-MODE) approach to determining pharmacokinetics and pharmacological properties of 6-fluoroquinolone derivatives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **56**, 197-206 (2003).
189. Cabrera, M. A., González, I., Fernández, C., Navarro, C. & Bermejo, M. A topological substructural approach for the prediction of P-glycoprotein substrates. *J. Pharm. Sci.* **95**, 589-606 (2006).
190. Pérez, M. A. C., Sanz, M. B., Torres, L. R., Avalos, R. G., González, M. P. & Díaz, H. G. A topological sub-structural approach for predicting human intestinal absorption of drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **39**, 905-16 (2004).
191. Acevedo Fernández, J.J., Angeles Chimal, J.S., Rivera, H.M., Petricevich López, V.L., N. & Quintana, N.Y., Collí Magaña, D.Y. & Santa-Olalla Tapia, J. en *Bioactividad péptidos Deriv. proteínas*

- Aliment.* (eds. M. Segura Campos, L. C. G. & D. & Ancona, B.) 29-82 (OmniaScience, 2013).
192. Yu, H., Wang, Q., Sun, Y., Shen, M., Li, H. & Duan, Y. A new PAMPA model proposed on the basis of a synthetic phospholipid membrane. *PLoS One* **10**, e0116502 (2015).
 193. Mandagere, A. K., Thompson, T. N. & Hwang, K.-K. Graphical model for estimating oral bioavailability of drugs in humans and other species from their Caco-2 permeability and *in vitro* liver enzyme metabolic stability rates. *J. Med. Chem.* **45**, 304-11 (2002).
 194. Sugano, K., Nabuchi, Y., Machida, M. & Aso, Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *Int. J. Pharm.* **257**, 245-51 (2003).
 195. Kansy, M., Senner, F. & Gubernator, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* **41**, 1007-10 (1998).
 196. Bendels, S., Tsinman, O., Wagner, B., Lipp, D., Parrilla, I., Kansy, M. & Avdeef, A. PAMPA - excipient classification gradient map. *Pharm. Res.* **23**, 2525-35 (2006).
 197. Bermejo, M., Avdeef, A., Ruiz, A., Nalda, R., Ruell, J. A., Tsinman, O., González, I., Fernández, C., Sánchez, G., Garrigues, T. M. & Merino, V. PAMPA--a drug absorption *in vitro* model 7. Comparing rat *in situ*, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *Eur. J. Pharm. Sci.* **21**, 429-41 (2004).
 198. Ottaviani, G., Martel, S. & Carrupt, P.-A. Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *J. Med. Chem.* **49**, 3948-54 (2006).
 199. Karadzovska, D. & Riviere, J. E. Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *Eur. J. Pharm. Sci.* **50**, 569-76 (2013).
 200. Dagenais, C., Avdeef, A., Tsinman, O., Dudley, A. & Beliveau, R. P-glycoprotein deficient mouse *in situ* blood-brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model. *Eur. J. Pharm. Sci.* **38**, 121-37 (2009).
 201. Fan, M. Z., Adeola, O., McBurney, M. I. & Cheeseman, C. I. Kinetic analysis of L-glutamine transport into porcine jejunal enterocyte brush-border membrane vesicles. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **121**, 411-22 (1998).

202. Koga, K., Murakami, M. & Kawashima, S. Effects of fatty acid sucrose esters on ceftibuten transport by rat intestinal brush-border membrane vesicles. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 747-51 (1998).
203. Stein, J., Milovic, V., Gerhard, R. & Caspary, W. F. Simultaneous preparation of rabbit intestinal brush border and basolateral membrane vesicles. *Res. Exp. Med. (Berl)*. **194**, 305-12 (1994).
204. Stewart, B. H., Chan, O. H., Lu, R. H., Reyner, E. L., Schmid, H. L., Hamilton, H. W., Steinbaugh, B. A. & Taylor, M. D. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models: relationship to absorption in humans. *Pharm. Res.* **12**, 693-9 (1995).
205. Pagliara, A., Reist, M., Geinoz, S., Carrupt, P. A. & Testa, B. Evaluation and prediction of drug permeation. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 1339-57 (1999).
206. Parsa, A., Saadati, R., Abbasian, Z., Azad Aramaki, S. & Dadashzadeh, S. Enhanced Permeability of Etoposide across Everted Sacs of Rat Small Intestine by Vitamin E-TPGS. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **12**, 37-46 (2013).
207. Chowhan, Z. T. & Amaro, A. A. Everted rat intestinal sacs as an *in vitro* model for assessing absorptivity of new drugs. *J. Pharm. Sci.* **66**, 1249-1253 (1977).
208. Díez-Sampedro, A., Pérez, M., Cobo, M. T., Martínez, J. A. & Barber, A. Effect of different beta-adrenergic agonists on the intestinal absorption of galactose and phenylalanine. *J. Pharm. Pharmacol.* **50**, 907-11 (1998).
209. Stewart, B. H., Amidon, G. L. & Brabec, R. K. Uptake of prodrugs by rat intestinal mucosal cells: mechanism and pharmaceutical implications. *J. Pharm. Sci.* **75**, 940-5 (1986).
210. Obringer, C., Manwaring, J., Goebel, C., Hewitt, N. J. & Rothe, H. Suitability of the *in vitro* caco-2 assay to predict the oral absorption of aromatic amine hair dyes. *Toxicol. In vitro* (2015).
211. Audus, K. L., Bartel, R. L., Hidalgo, I. J. & Borchardt, R. T. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm. Res.* **7**, 435-51 (1990).
212. Volpe, D. A. Application of method suitability for drug permeability classification. *AAPS J.* **12**, 670-8 (2010).
213. Moyer, M. P. Culture of human gastrointestinal epithelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **174**, 12-5 (1983).

214. Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G. & Zweibaum, A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* **48**, 1936-42 (1988).
215. Stewart BH, Cham OH, Jezyk N, F. D. Discrimination between drug candidates using models for evaluation of intestinal absorption. *Adv Drug Del Rev* 27-45 (1997).
216. Hillgren, K. M., Kato, A. & Borchardt, R. T. *In vitro* systems for studying intestinal drug absorption. *Med. Res. Rev.* **15**, 83-109 (1995).
217. Rousset, M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* **68**, 1035-40 (1986).
218. Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E. and Louvard, D. 2011. en *Handb. Physiol.* (ed. American Physiology Society) 223–255 (MD, 1991).
219. Artursson, P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.* **79**, 476-82 (1990).
220. Delie, F. & Rubas, W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **14**, 221-86 (1997).
221. Artursson, P. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **8**, 305-30 (1991).
222. Wilson G, Hassan IF, Dix CJ, Williamson I, Shah R, M. M. Transport and permeability properties of human Caco2 cells: an *in vitro* model of the intestinal epithelial cell barrier. *J. Control. Release* 25-40 (1990).
223. Hidalgo, I. J., Raub, T. J. & Borchardt, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**, 736-49 (1989).
224. Matsumoto, H., Erickson, R. H., Gum, J. R., Yoshioka, M., Gum, E. & Kim, Y. S. Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology* **98**, 1199-207 (1990).

225. Vachon, P. H. & Beaulieu, J. F. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* **103**, 414-23 (1992).
226. Prueksaritanont, T., Gorham, L. M., Hochman, J. H., Tran, L. O. & Vyas, K. P. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 634-42 (1996).
227. Mehran, M., Levy, E., Bendayan, M. & Seidman, E. Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**, 118-28 (1997).
228. Van Beers, E. H., Al, R. H., Rings, E. H., Einerhand, A. W., Dekker, J. & Büller, H. A. Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. *Biochem. J.* **308**, 769-75 (1995).
229. Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A. & Zucco, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* **21**, 1-26 (2005).
230. Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W. & Scarino, M. L. *In vitro* models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern. Lab. Anim.* **29**, 649-68 (2001).
231. Skolnik, S., Lin, X., Wang, J., Chen, X.-H., He, T. & Zhang, B. Towards prediction of *in vivo* intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. *J. Pharm. Sci.* **99**, 3246-65 (2010).
232. Camenisch, G., Alsenz, J., van de Waterbeemd, H. & Folkers, G. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *Eur. J. Pharm. Sci.* **6**, 317-24 (1998).
233. Artursson, P., Palm, K. & Luthman, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 27-43 (2001).
234. Lozoya-Agullo, I., González-Álvarez, I., González-Álvarez, M., Merino-Sanjuán, M. & Bermejo, M. *In Situ* Perfusion Model in Rat Colon for Drug Absorption Studies: Comparison with Small Intestine and Caco-2 Cell Model. *J. Pharm. Sci.* **104**, 3136-45 (2015).

235. Vázquez, M., Vélez, D. & Devesa, V. *In Vitro* Characterization of the Intestinal Absorption of Methylmercury using a Caco-2 Cell Model. (2014).
236. Angelis, I. D. & Turco, L. Caco-2 cells as a model for intestinal absorption. *Curr. Protoc. Toxicol.* (2011).
237. Feely, D. E. & Erlandsen, S. L. Effect of cytochalasin-B, low Ca⁺⁺ concentration, iodoacetic acid, and quinacrine-HCl on the attachment of *Giardia* trophozoites *in vitro*. *J. Parasitol.* **68**, 869-73 (1982).
238. Gillin, F. D. & Reiner, D. S. Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: role of reducing agents, serum, temperature, and ionic composition. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 369-77 (1982).
239. Zenian, A. & Gillin, F. D. Interactions of *Giardia lamblia* with human intestinal mucus: enhancement of trophozoite attachment to glass. *J. Protozool.* **32**, 664-8 (1985).
240. Kaplan, B., Altmanshofer, D. & Speck, W. 677 specific IgA and IgG interfere with *G. muris* adherence to intestinal epithelium. *Pediatr. Res.* **19**, 223A-223A (1985).
241. McCabe, R. E., Yu, G. S., Conteas, C., Morrill, P. R. & McMorrow, B. *In vitro* model of attachment of *Giardia intestinalis* trophozoites to IEC-6 cells, an intestinal cell line. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 29-35 (1991).
242. Conteas, C. N. & Majumdar, A. P. The effects of gastrin, epidermal growth factor, and somatostatin on DNA synthesis in a small intestinal crypt cell line (IEC-6). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **184**, 307-11 (1987).
243. Quaroni, A. Development of fetal rat intestine in organ and monolayer culture. *J. Cell Biol.* **100**, 1611-22 (1985).
244. Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R. L. & Isselbacher, K. J. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J. Cell Biol.* **80**, 248-65 (1979).
245. Vidal, F., Vidal, J. C., Gadelha, A. P. R., Lopes, C. S., Coelho, M. G. P. & Monteiro-Leal, L. H. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Exp. Parasitol.* **115**, 25-31 (2007).
246. Ma'ayeh, S. Y. & Brook-Carter, P. T. Representational difference analysis identifies specific genes in the interaction of *Giardia*

- duodenalis* with the murine intestinal epithelial cell line, IEC-6. *Int. J. Parasitol.* **42**, 501-9 (2012).
247. Hausen, M. A., Menna-Barreto, R. F. S., Lira, D. C., de Carvalho, L. & Barbosa, H. S. Synergic effect of metronidazole and pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*. *Parasitol. Int.* **60**, 54-8 (2011).
248. Pérez, P. F., Minnaard, J., Rouvet, M., Knabenhans, C., Brassart, D., De Antoni, G. L. & Schiffrin, E. J. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from Lactobacilli: an *in vitro* study. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5037-42 (2001).
249. Brassart, D. & Schiffrin, E. J. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends Food Sci. Technol.* **8**, 321-326 (1997).
250. Emery, S. J., Mirzaei, M., Vuong, D., Pascovici, D., Chick, J. M., Lacey, E. & Haynes, P. A. Induction of virulence factors in *Giardia duodenalis* independent of host attachment. *Sci. Rep.* **6**, 20765 (2016).
251. Ringqvist, E., Avesson, L., Söderbom, F. & Svärd, S. G. Transcriptional changes in *Giardia* during host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* **41**, 277-85 (2011).
252. Ferella, M., Davids, B. J., Cipriano, M. J., Birkeland, S. R., Palm, D., Gillin, F. D., McArthur, A. G. & Svärd, S. Gene expression changes during *Giardia*-host cell interactions in serum-free medium. *Mol. Biochem. Parasitol.* **197**, 21-3 (2014).
253. Kanzato, H., Manabe, M. & Shimizu, M. An *in vitro* approach to the evaluation of the cross talk between intestinal epithelium and macrophages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 449-51 (2001).
254. Maia-Brigagão, C., Morgado-Díaz, J. A. & De Souza, W. *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitol. Int.* **61**, 280-7 (2012).
255. Hernández-Covarrubias, C., Vilchis-Reyes, M. A., Yépez-Mulia, L., Sánchez-Díaz, R., Navarrete-Vázquez, G., Hernández-Campos, A., Castillo, R. & Hernández-Luis, F. Exploring the interplay of physicochemical properties, membrane permeability and giardicidal activity of some benzimidazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **52**, 193-204 (2012).
256. Ming, H., Jie, L., Huimin, L. & Jun, C. en *Optim. Drug Discov.* (eds. Yan, Z. & Caldwell, G. W.) 19-35 (Humana Press, 2004).

257. Lennernäs, H. Human intestinal permeability. *J. Pharm. Sci.* **87**, 403-10 (1998).
258. Lennernäs, H., Ahrenstedt, O., Hällgren, R., Knutson, L., Ryde, M. & Paalzow, L. K. Regional jejunal perfusion, a new *in vivo* approach to study oral drug absorption in man. *Pharm. Res.* **9**, 1243-51 (1992).
259. Fleisher, D. en *Pept. drug Des.* 500-523 (A.C.S. books, 1995).
260. Doluisio, J. T., Billups, N. F., Dittert, L. W., Sugita, E. T. & Swintosky, J. V. Drug absorption. I. An *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J. Pharm. Sci.* **58**, 1196-200 (1969).
261. Schanker, L. S., Tocco, D. J., Brodie, B. B. & Hogben, C. A. Absorption of drugs from the rat small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **123**, 81-8 (1958).
262. Stappaerts, J., Brouwers, J., Annaert, P. & Augustijns, P. *In situ* perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: challenges and opportunities. *Int. J. Pharm.* **478**, 665-81 (2015).
263. Ensayos clínicos. en <<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/clinicaltrials.html>>. Acceso 30 de noviembre de 2015.
264. The Nuremberg Code. en <<http://www.hhs.gov/ohrp/archive/nurcode.html>>. Acceso 30 de noviembre de 2015.
265. Declaración de Helsinki - Bioéticas. Guía internacional de la Bioética. en <<http://www.bioeticas.org/bio.php?articulo270>>. Acceso 30 de noviembre de 2015.
266. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios - Investigación Clínica - Investigación con Medicamentos - Ensayos clínicos con medicamentos de uso humano. en <<http://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/medicamentos/ensayosClinicos.htm>>. Acceso 30 de noviembre de 2015.
267. Russell W. and Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique.* (1959).
268. Avances en materia de bienestar animal: OIE - World Organisation for Animal Health. en <<http://www.oie.int/es/bienestar-animal/avances-en-materia-de-bienestar-animal/>>. Acceso 30 de noviembre de 2015.
269. Gonzalez-Alvarez, M., Gonzalez-Alvarez, I., Noguera, I. & Bermejo, M. en *Metodol. Biofarm. en el Desarro. Medicam.* (ed. Isabel

- González Álvarez, Miguel Ángel Cabrera Pérez, M. del V. B. S.) 567 (UMH, 2015).
270. González-García, I., Mangas-Sanjuán, V., Merino-Sanjuán, M. & Bermejo, M. *In vitro-in vivo* correlations: general concepts, methodologies and regulatory applications. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **41**, 1935-47 (2015).
 271. Mangas-Sanjuan, V., González-Álvarez, I., González-Álvarez, M., Casabó, V. G. & Bermejo, M. Innovative *in vitro* method to predict rate and extent of drug delivery to the brain across the blood-brain barrier. *Mol. Pharm.* **10**, 3822-31 (2013).
 272. Oltra-Noguera, D., Mangas-Sanjuan, V., Centelles-Sangüesa, A., Gonzalez-Garcia, I., Sanchez-Castaño, G., Gonzalez-Alvarez, M., Casabo, V. G., Merino, V., Gonzalez-Alvarez, I. & Bermejo, M. Variability of permeability estimation from different protocols of subculture and transport experiments in cell monolayers. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **71**, 21-32 (2015).
 273. Arcos, R. R., Magdalena Cerón, Leticia Ruiz González, F. G. S. & Guillermo Valle Cervantes, Jesús Alberto Elizondo Villarreal, H. U.-M. Fiebre en pediatría. *Rev. Mex. Pediatría* **77**, S3-S8 (2010).
 274. Vahlquist, B. Migraine in children. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **7**, 348-55 (1955).
 275. Oster, J. Recurrent abdominal pain, headache and limb pains in children and adolescents. *Pediatrics* **50**, 429-36 (1972).
 276. Egger, H. L., Angold, A. & Costello, E. J. Headaches and psychopathology in children and adolescents. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **37**, 951-8 (1998).
 277. Egger, H. L., Costello, E. J., Erkanli, A. & Angold, A. Somatic complaints and psychopathology in children and adolescents: stomach aches, musculoskeletal pains, and headaches. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **38**, 852-60 (1999).
 278. Palermo, T. M. Impact of recurrent and chronic pain on child and family daily functioning: a critical review of the literature. *J. Dev. Behav. Pediatr.* **21**, 58-69 (2000).
 279. Juan, O. R. Las cefaleas psicógenas de la infancia. *Asoc. Esp. Neuropsiq.* **82**, 23-42 (2002).
 280. Raffa, R. B., Pergolizzi, J. V, Taylor, R., Decker, J. F. & Patrick, J. T. Acetaminophen (paracetamol) oral absorption and clinical influences. *Pain Pract.* **14**, 668-77 (2014).

281. Pediamécum., C. de M. de la A. E. de P. Paracetamol (Aminofén). (2012). en <<http://www.pediamecum.es>>. Acceso 1 de agosto de 2015.
282. Pediamécum., C. de M. de la A. E. de P. Ibuprofeno. (2015). en <<http://www.pediamecum.es>>. Acceso 1 de agosto de 2015.
283. Katzung, B. *Basic & clinical pharmacology*. (McGraw-Hill, 2007).
284. Pediamécum., C. de M. de la A. E. de P. Quinidina. (2015). en <<http://pediamecum.es/quinidina/>>. Acceso 2 de diciembre de 2015.
285. Marín, M. & Gudiol, F. Beta-Lactam antibiotics. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **21**, 42-55 (2003).
286. Pediamécum., C. de M. de la A. E. de P. Amoxicilina. (2015). en <<http://www.pediamecum.es>>. Acceso 1 de agosto de 2015.
287. Enfermedades más comunes en los niños. en <<http://www.monografias.com/trabajos12/ninio/ninio.shtml#ixz33koaZ8ulX>>. Acceso 1 de agosto de 2015.
288. Vera, C. G. Otitis Media Aguda. *Flashes pediátricos AEPap.* **22**, 49-59 (2013).
289. Craft, J. C., Holt, E. A. & Tan, S. H. Malabsorption of oral antibiotics in humans and rats with giardiasis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **6**, 832-6 (1987).
290. Buck, R. E. & Price, K. E. Cefadroxil, a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**, 324-30 (1977).
291. Tsuji, A., Nakashima, E., Kagami, I. & Yamana, T. Intestinal absorption mechanism of amphoteric beta-lactam antibiotics I: Comparative absorption and evidence for saturable transport of amino-beta-lactam antibiotics by *in situ* rat small intestine. *J. Pharm. Sci.* **70**, 768-72 (1981).
292. De Waart, D. R., van de Wetering, K., Kunne, C., Duijst, S., Paulusma, C. C. & Oude Elferink, R. P. J. Oral Availability of Cefadroxil Depends on ABCC3 and ABCC4. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 515-521 (2011).
293. Shen, H., Smith, D. E., Yang, T., Huang, Y. G., Schnermann, J. B. & Brosius, F. C. Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **276**, F658-65 (1999).
294. Scheffer, G. L., Kool, M., de Haas, M., de Vree, J. M. L., Pijnenborg, A. C. L. M., Bosman, D. K., Elferink, R. P. J. O., van der Valk, P., Borst, P.

- & Scheper, R. J. Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab. Invest.* **82**, 193-201 (2002).
295. Ming, X. & Thakker, D. R. Role of basolateral efflux transporter MRP4 in the intestinal absorption of the antiviral drug adefovir dipivoxil. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 455-462 (2010).
296. Pediamécum., C. de M. de la A. E. de P. Cefadroxilo. (2015). en <<http://www.pediamecum.es>>. Acceso 1 de agosto de 2015.
297. Hauser, W. A. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia* **35**, S1-6 (1994).
298. Waaler, P. E., Blom, B. H., Skeidsvoll, H. & Mykletun, A. Prevalence, classification, and severity of epilepsy in children in western Norway. *Epilepsia* **41**, 802-10 (2000).
299. Serdaroğlu, A., Ozkan, S., Aydin, K., Gücüyener, K., Tezcan, S. & Aycan, S. Prevalence of epilepsy in Turkish children between the ages of 0 and 16 years. *J. Child Neurol.* **19**, 271-4 (2004).
300. Wong, V. Study of seizure and epilepsy in Chinese children in Hong Kong: period prevalence and patterns. *J. Child Neurol.* **19**, 19-25 (2004).
301. Larsson, K. & Eeg-Olofsson, O. A population based study of epilepsy in children from a Swedish county. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **10**, 107-13 (2006).
302. Dra. Ileana Valdivia Álvarez. Epilepsia Infantil de difícil control. Estrategias de tratamiento en el hospital pediátrico docente «Juan M. Marquez» 2002-2006. (2008).
303. Freitag, C. M., May, T. W., Pfäfflin, M., König, S. & Rating, D. Incidence of epilepsies and epileptic syndromes in children and adolescents: a population-based prospective study in Germany. *Epilepsia* **42**, 979-85 (2001).
304. Ochoa Sangrador, C. & Palencia Luaces, R. Study of the prevalence of epilepsy among schoolchildren in Valladolid, Spain. *Epilepsia* **32**, 791-7 (1991).
305. Onsurbe Ramírez, I., Hernández Rodríguez, M., Aparicio Meix, J. M. & Carrascosa Romero, C. [Incidence of epilepsy and epileptic syndromes in children in the province of Albacete]. *An. españoles pediatría* **51**, 154-8 (1999).
306. Cowan, L. D., Bodensteiner, J. B., Leviton, A. & Doherty, L. Prevalence of the epilepsies in children and adolescents. *Epilepsia* **30**, 94-106 (1989).

307. Palencia, R. Prevalence and incidence of epilepsy in childhood. *Rev. Neurol.* **30**, S1-4 (2000).
308. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Medicamentos no sustituibles. en <<http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/medNoSustituibles/home.htm>>. Acceso 5 de septiembre de 2015.
309. Fichas técnicas del Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS. *Agencia Española Medicam. y Prod. Sanit.* en <<http://www.aemps.gob.es/>>. Acceso 6 de septiembre de 2015.
310. Fortuna, A., Alves, G., Falcão, A. & Soares-da-Silva, P. Evaluation of the permeability and P-glycoprotein efflux of carbamazepine and several derivatives across mouse small intestine by the Ussing chamber technique. *Epilepsia* **53**, 529-38 (2012).
311. Mintegi, S. *Manual de intoxicaciones en pediatría.* (2008).
312. Pediamécum, C. de M. de la A. E. de P. Diazepam. (2015). en <<http://www.pediamecum.es>>. Acceso 1 de agosto de 2015.
313. Ansiedad Infantil | Ansiedad. en <<http://infoansiedad.org/trastornos-de-ansiedad-2/ansiedad-infantil/>>. Acceso 5 de septiembre de 2015.
314. Chavira, D. A., Garland, A., Yeh, M., McCabe, K. & Hough, R. L. Child anxiety disorders in public systems of care: comorbidity and service utilization. *J. Behav. Health Serv. Res.* **36**, 492-504 (2009).
315. Herranz, J. L., Armijo, J. A. & Arteaga, R. Clinical side effects of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, and valproate during monotherapy in children. *Epilepsia* **29**, 794-804 (1988).
316. Tedeschi, G., Casucci, G., Allocca, S., Riva, R., Di Costanzo, A., Tata, M. R., Quattrone, A., Baruzzi, A. & Bonavita, V. Neuroocular side effects of carbamazepine and phenobarbital in epileptic patients as measured by saccadic eye movements analysis. *Epilepsia* **30**, 62-6 (1989).
317. Mellado Peña M. J., Méndez Echevarría, A. & Martínez Fenández, M. R. en *Pediatría Extrahospitalaria. Asp. básicos en Atención Primaria.* (ed. Muñoz Calvo MT, Hidalgo Vicario MI, Rubio Roldán LA, C. P. J.) 443-50 (Ergon, 2008).
318. Minns, A. B., Ghafouri, N. & Clark, R. F. Isoniazid-induced status epilepticus in a pediatric patient after inadequate pyridoxine therapy. *Pediatr. Emerg. Care* **26**, 380-1 (2010).

319. Muñoz Aguilar, G., Alcón Sáez, J. J., Gómez Zafra, R. & Domingo Triadó, I. Acute isoniazid poisoning: seizure in a patient on anti-tuberculosis treatment. *An. Pediatr. (Barc)*. **80**, e58-9 (2014).
320. Kola, I. & Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 711-5 (2004).
321. Yadav, S. C., Kumari, A. & Yadav, R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides* **32**, 173-87 (2011).
322. Kumari, A., Yadav, S. K. & Yadav, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **75**, 1-18 (2010).
323. Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* **53**, 283-318 (2001).
324. Rani, R., Dilbaghi, N., Dhingra, D. & Kumar, S. Optimization and evaluation of bioactive drug-loaded polymeric nanoparticles for drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **78**, 173-9 (2015).
325. Roy, I., Sharma, S. & Gupta, M. N. Smart biocatalysts: design and applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **86**, 159-89 (2004).
326. Aguilar, M.R., Elvira, C., Gallardo, A., Vazquez, B. & Roman, J. S. en *Top. Tissue Eng.* (ed. N. Ashammakhi, R. R. & E. C.) (2007).
327. Shtanko, N. I., Lequieu, W., Goethals, E. J. & Du Prez, F. E. pH- and thermo-responsive properties of poly(N-vinylcaprolactam-co-acrylic acid) copolymers. *Polym. Int.* **52**, 1605-1610 (2003).
328. Alexander, C. Temperature- and pH-responsive smart polymers for gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **3**, 573-81 (2006).
329. Bag, D.S. & Rao, K. U. B. Smart polymers and their applications. *J. Polym. Mater.* **23**, 225-248 (2006).
330. Qiu, Y. & Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 321-39 (2001).
331. Zintchenko, A., Ogris, M. & Wagner, E. Temperature dependent gene expression induced by PNIPAM-based copolymers: potential of hyperthermia in gene transfer. *Bioconjug. Chem.* **17**, 766-72 (2006).
332. Dani, R. K., Schumann, C., Taratula, O. & Taratula, O. Temperature-tunable iron oxide nanoparticles for remote-controlled drug release. *AAPS PharmSciTech* **15**, 963-72 (2014).

333. Talelli, M., Rijcken, C. J. F., Lammers, T., Seevinck, P. R., Storm, G., van Nostrum, C. F. & Hennink, W. E. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in biodegradable thermosensitive polymeric micelles: toward a targeted nanomedicine suitable for image-guided drug delivery. *Langmuir* **25**, 2060-7 (2009).
334. Hruby, M., Kucka, J., Lebeda, O., Mackova, H., Babic, M., Konak, C., Studenovský, M., Sikora, A., Kozempel, J. & Ulbrich, K. New bioerodable thermoresponsive polymers for possible radiotherapeutic applications. *J. Control. Release* **119**, 25-33 (2007).
335. Paris, J. L., Cabañas, M. V., Manzano, M. & Vallet-Regí, M. Polymer-Grafted Mesoporous Silica Nanoparticles as Ultrasound-Responsive Drug Carriers. *ACS Nano* (2015).
336. Wang, Y., Wang, K., Zhang, R., Liu, X., Yan, X., Wang, J., Wagner, E. & Huang, R. Synthesis of core-shell graphitic carbon@silica nanospheres with dual-ordered mesopores for cancer-targeted photothermochemotherapy. *ACS Nano* **8**, 7870-9 (2014).
337. De la Torre, C., Agostini, A., Mondragón, L., Orzáez, M., Sancenón, F., Martínez-Máñez, R., Marcos, M. D., Amorós, P. & Pérez-Payá, E. Temperature-controlled release by changes in the secondary structure of peptides anchored onto mesoporous silica supports. *Chem. Commun. (Camb)*. **50**, 3184-6 (2014).
338. Aznar, E., Mondragón, L., Ros-Lis, J. V, Sancenón, F., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Soto, J., Pérez-Payá, E. & Amorós, P. Finely tuned temperature-controlled cargo release using paraffin-capped mesoporous silica nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 11172-5 (2011).
339. Gillies, E. R. & Fréchet, J. M. J. A new approach towards acid sensitive copolymer micelles for drug delivery. *Chem. Commun. (Camb)*. 1640-1 (2003).
340. Schmaljohann, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1655-70 (2006).
341. Miyata, T., Nakamae, K., Hoffman, A. S. & Kanzaki, Y. Stimuli-sensitivities of hydrogels containing phosphate groups. *Macromol. Chem. Phys.* **195**, 1111-1120 (1994).
342. Nakamae, K., Miyata, T. & Hoffman, A. S. Swelling behavior of hydrogels containing phosphate groups. *Die Makromol. Chemie* **193**, 983-990 (1992).

343. Yilmaz, E., Yalinca, Z., Yahya, K. & Sirotina, U. pH responsive graft copolymers of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* (2015).
344. Casasús, R., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Ros-Lis, J. V, Soto, J., Villaescusa, L. A., Amorós, P., Beltrán, D., Guillem, C. & Latorre, J. Toward the development of ionically controlled nanoscopic molecular gates. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8612-3 (2004).
345. Aznar, E., Coll, C., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Soto, J., Amorós, P., Cano, J. & Ruiz, E. Borate-driven gate-like scaffolding using mesoporous materials functionalised with saccharides. *Chemistry* **15**, 6877-88 (2009).
346. Pérez-Esteve, É., Ruiz-Rico, M., Martínez-Máñez, R. & Barat, J. M. Mesoporous Silica-Based Supports for the Controlled and Targeted Release of Bioactive Molecules in the Gastrointestinal Tract. *J. Food Sci.* **80**, E2504-16 (2015).
347. Angelos, S., Yang, Y.-W., Khashab, N. M., Stoddart, J. F. & Zink, J. I. Dual-controlled nanoparticles exhibiting AND logic. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11344-6 (2009).
348. Angelos, S., Yang, Y.-W., Patel, K., Stoddart, J. F. & Zink, J. I. pH-Responsive Supramolecular Nanovalves Based on Cucurbit[6]uril Pseudorotaxanes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **47**, 2222-2226 (2008).
349. Aguilar, M. R., Elvira, C., Gallardo, A., Vázquez, B. & Román, J. S. Smart Polymers and Their Applications as Biomaterials. (2007).
350. *Functional Monomers and Polymers, Second Edition.* (Marcel Dekker, 1997).
351. Suzuki, A. & Tanaka, T. Phase transition in polymer gels induced by visible light. *Nature.* **346**, 345-347 (1990).
352. Yan, H., Teh, C., Sreejith, S., Zhu, L., Kwok, A., Fang, W., Ma, X., Nguyen, K. T., Korzh, V. & Zhao, Y. Functional mesoporous silica nanoparticles for photothermal-controlled drug delivery *in vivo*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 8373-7 (2012).
353. Bharti, C., Nagaich, U., Pal, A. K. & Gulati, N. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *Int. J. Pharm. Investig.* **5**, 124-33 (2015).
354. Mal, N. K., Fujiwara, M. & Tanaka, Y. Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica. *Nature* **421**, 350-3 (2003).
355. Mal, N. K., Fujiwara, M., Tanaka, Y., Taguchi, T. & Matsukata, M. Photo-Switched Storage and Release of Guest Molecules in the

- Pore Void of Coumarin-Modified MCM-41. *Chem. Mater.* **15**, 3385-3394 (2003).
356. Zhu, Y. & Fujiwara, M. Installing dynamic molecular photomechanics in mesopores: a multifunctional controlled-release nanosystem. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 2241-4 (2007).
357. Liu, N., Chen, Z., Dunphy, D. R., Jiang, Y.-B., Assink, R. A. & Brinker, C. J. Photoresponsive nanocomposite formed by self-assembly of an azobenzene-modified silane. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 1731-4 (2003).
358. Croissant, J., Chaix, A., Mongin, O., Wang, M., Clément, S., Raehm, L., Durand, J.-O., Hugues, V., Blanchard-Desce, M., Maynadier, M., Gallud, A., Gary-Bobo, M., Garcia, M., Lu, J., Tamanoi, F., Ferris, D. P., Tarn, D. & Zink, J. I. Two-photon-triggered drug delivery via fluorescent nanovalves. *Small* **10**, 1752-5 (2014).
359. Wang, Y., Li, B., Zhang, L., Song, H. & Zhang, L. Targeted delivery system based on magnetic mesoporous silica nanocomposites with light-controlled release character. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 11-5 (2013).
360. Aznar, E., Casasús, R., García-Acosta, B., Marcos, M. D., Martínez-Mañez, R., Sancenón, F., Soto, J. & Amorós, P. Photochemical and Chemical Two-Channel Control of Functional Nanogated Hybrid Architectures. *Adv. Mater.* **19**, 2228-2231 (2007).
361. Knežević, N. Ž. & Lin, V. S.-Y. A magnetic mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system for photosensitive cooperative treatment of cancer with a mesopore-capping agent and mesopore-loaded drug. *Nanoscale* **5**, 1544-51 (2013).
362. Infante, D. F. Metodología de caracterización de polímeros electroactivos y diseño de músculos artificiales. (2007).
363. *Polymer Sensors and Actuators*. (Springer Berlin Heidelberg, 2000).
364. Xu, X.-D., Cheng, Y.-J., Wu, J., Cheng, H., Cheng, S.-X., Zhuo, R.-X. & Zhang, X.-Z. Smart and hyper-fast responsive polyprodrug nanoplatform for targeted cancer therapy. *Biomaterials* **76**, 238-249 (2015).
365. Resendiz-Hernandez, P.J., Rodrigue-Fernandez, O.S. & Garcia-Cerda, L. A. Synthesis of poly(vinyl alcohol)-magnetite ferrogel obtained by freezing-thawing technique. *J Magn Magn Mater* **320**, E373-E376 (2008).

366. Cezar, C. A., Kennedy, S. M., Mehta, M., Weaver, J. C., Gu, L., Vandenburg, H. & Mooney, D. J. Biphasic ferrogels for triggered drug and cell delivery. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 1869-76 (2014).
367. Hernando, B. Informe de Vigilancia Tecnológica. Hidrocefalia. (2011). en <<http://www.slideshare.net/laflordelis/presentacion-vigilancia-tecnologica-1>>
368. Agostini, A., Mondragón, L., Coll, C., Aznar, E., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Soto, J., Pérez-Payá, E. & Amorós, P. Dual enzyme-triggered controlled release on capped nanometric silica mesoporous supports. *ChemistryOpen* **1**, 17-20 (2012).
369. Du, C., Zhao, J., Fei, J., Gao, L., Cui, W., Yang, Y. & Li, J. Alginate-based microcapsules with a molecule recognition linker and photosensitizer for the combined cancer treatment. *Chem. Asian J.* **8**, 736-42 (2013).
370. Brahmabhatt, H., Poma, A., Pendergraff, H. M., Watts, J. K. & Turner, N. W. Improvement of DNA recognition through molecular imprinting: hybrid oligomer imprinted polymeric nanoparticles (oligoMIP NPs). *Biomater. Sci.* (2015).
371. El Sayed, S., Giménez, C., Aznar, E., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F. & Licchelli, M. Highly selective and sensitive detection of glutathione using mesoporous silica nanoparticles capped with disulfide-containing oligo(ethylene glycol) chains. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 1017-21 (2015).
372. Pascual, L., Baroja, I., Aznar, E., Sancenón, F., Marcos, M. D., Murguía, J. R., Amorós, P., Rurack, K. & Martínez-Máñez, R. Oligonucleotide-capped mesoporous silica nanoparticles as DNA-responsive dye delivery systems for genomic DNA detection. *Chem. Commun. (Camb)*. **51**, 1414-6 (2015).
373. Díez, P., Sánchez, A., Gamella, M., Martínez-Ruiz, P., Aznar, E., de la Torre, C., Murguía, J. R., Martínez-Máñez, R., Villalonga, R. & Pingarrón, J. M. Toward the design of smart delivery systems controlled by integrated enzyme-based biocomputing ensembles. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 9116-23 (2014).
374. Mondragón, L., Mas, N., Ferragud, V., de la Torre, C., Agostini, A., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Amorós, P., Pérez-Payá, E. & Orzáez, M. Enzyme-responsive intracellular-controlled release using silica mesoporous nanoparticles capped with ϵ -poly-L-lysine. *Chemistry* **20**, 5271-81 (2014).

375. Villalonga, R., Díez, P., Sánchez, A., Aznar, E., Martínez-Máñez, R. & Pingarrón, J. M. Enzyme-controlled sensing-actuating nanomachine based on Janus Au-mesoporous silica nanoparticles. *Chemistry* **19**, 7889-94 (2013).
376. Climent, E., Gröniger, D., Hecht, M., Walter, M. A., Martínez-Máñez, R., Weller, M. G., Sancenón, F., Amorós, P. & Rurack, K. Selective, sensitive, and rapid analysis with lateral-flow assays based on antibody-gated dye-delivery systems: the example of triacetone triperoxide. *Chemistry* **19**, 4117-22 (2013).
377. Climent, E., Martínez-Máñez, R., Maquieira, A., Sancenón, F., Marcos, M. D., Brun, E. M., Soto, J. & Amorós, P. Antibody-capped mesoporous nanoscopic materials: design of a probe for the selective chromo-fluorogenic detection of finasteride. *Chem. Open* **1**, 251-9 (2012).
378. Climent, E., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Marcos, M. D., Soto, J., Maquieira, A. & Amorós, P. Controlled delivery using oligonucleotide-capped mesoporous silica nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 7281-3 (2010).
379. Alvarez-Lorenzo, C. & Concheiro, A. Molecularly imprinted materials as advanced excipients for drug delivery systems. *Biotechnol. Annu. Rev.* **12**, 225-68 (2006).
380. Su, H.-L., Liao, J.-W., Hsu, S., Lin, S.-Z. & Lin, J.-J. Efficacy and safety of nanohybrids comprising silver nanoparticles and silicate clay for controlling Salmonella infection. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 2421 (2012).
381. Xiao, B., Laroui, H., Viennois, E., Ayyadurai, S., Charania, M. A., Zhang, Y., Zhang, Z., Baker, M. T., Zhang, B., Gewirtz, A. T. & Merlin, D. Nanoparticles with surface antibody against CD98 and carrying CD98 small interfering RNA reduce colitis in mice. *Gastroenterology* **146**, 1289-1300 (2014).
382. Javier, D. J., Castellanos-Gonzalez, A., Weigum, S. E., White, A. C. & Richards-Kortum, R. Oligonucleotide-gold nanoparticle networks for detection of *Cryptosporidium parvum* heat shock protein 70 mRNA. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 4060-6 (2009).
383. Melariri, P., Kalombo, L., Nkuna, P., Dube, A., Hayeshi, R., Ogotu, B., Gibhard, L., deKock, C., Smith, P., Weisner, L. & Swai, H. Oral lipid-based nanoformulation of tafenoquine enhanced bioavailability and blood stage antimalarial efficacy and led to a reduction in human red blood cell loss in mice. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 1493 (2015).

384. Coelho, E., Ribeiro, T., Chávez-Fumagalli, M., Valadares, D., França, J., Rodrigues, L., Duarte, M., Lage, P., Andrade, P., Lage, D., Arruda, L., Abánades, D., Costa, L., Martins, V., Tavares, C., Castilho, R. & Faraco, A. Novel targeting using nanoparticles: an approach to the development of an effective anti-leishmanial drug-delivery system. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 9**, 877 (2014).
385. DrugBank. en <<http://www.drugbank.ca/>>. Acceso 15 de enero de 2016.
386. Wang, W., McConaghy, A. M., Tetley, L. & Uchegbu, I. F. Controls on polymer molecular weight may be used to control the size of palmitoyl glycol chitosan polymeric vesicles. *Langmuir* **17**, 631-636 (2001).
387. Uchegbu, I. F., Sadiq, L., Arastoo, M., Gray, A. I., Wang, W., Waigh, R. D., Schätzlein, A. G. & Schätzlein, A. G. Quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan--a new polysoap for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **224**, 185-99 (2001).
388. Cabrera, S., El Haskouri, J., Guillem, C., Latorre, J., Beltrán-Porter, A., Beltrán-Porter, D., Marcos, M. D. & Amorós *, P. Generalised syntheses of ordered mesoporous oxides: the atrane route. *Solid State Sci.* **2**, 405-420 (2000).
389. Tuğcu-Demiröz, F., Gonzalez-Alvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M. & Bermejo, M. Validation of phenol red versus gravimetric method for water reabsorption correction and study of gender differences in Doluisio's absorption technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* **62**, 105-110 (2014).
390. Lozoya-Agullo, I., Zur, M., Wolk, O., Beig, A., González-Álvarez, I., González-Álvarez, M., Merino-Sanjuán, M., Bermejo, M. & Dahan, A. In-situ intestinal rat perfusions for human Fabs prediction and BCS permeability class determination: Investigation of the single-pass vs. the Doluisio experimental approaches. *Int. J. Pharm.* **480**, 1-7 (2015).
391. González-Alvarez, I., Fernández-Teruel, C., Garrigues, T. M., Casabo, V. G., Ruiz-García, A. & Bermejo, M. Kinetic modelling of passive transport and active efflux of a fluoroquinolone across Caco-2 cells using a compartmental approach in NONMEM. *Xenobiotica.* **35**, 1067-88 (2005).
392. Vivancos, V., González-Alvarez, I., González-Alvarez, M., Bermejo, M. en *Metodol. Biofarm. en el Desarrollo. Medicam.* (ed. Isabel González Álvarez, Miguel Ángel Cabrera Pérez, M. del V. B. S.) (UMH, 2015).

393. Hu, M., Chen, J., Zhu, Y., Dantzig, A. H., Stratford, R. E. & Kuhfeld, M. T. Mechanism and kinetics of transcellular transport of a new beta-lactam antibiotic loracarbef across an intestinal epithelial membrane model system (Caco-2). *Pharm. Res.* **11**, 1405-13 (1994).
394. Hu, M., Chen, J., Tran, D., Zhu, Y. & Leonardo, G. The Caco-2 cell monolayers as an intestinal metabolism model: metabolism of dipeptide Phe-Pro. *J. Drug Target.* **2**, 79-89 (1994).
395. Hunter, J., Hirst, B. H. & Simmons, N. L. Epithelial secretion of vinblastine by human intestinal adenocarcinoma cell (HCT-8 and T84) layers expressing P-glycoprotein. *Br. J. Cancer* **64**, 437-44 (1991).
396. Mangas-Sanjuan, V., González-Álvarez, I., González-Álvarez, M., Casabó, V. G. & Bermejo, M. Modified nonsink equation for permeability estimation in cell monolayers: comparison with standard methods. *Mol. Pharm.* **11**, 1403-14 (2014).
397. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
398. European Pharmacopeia. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe. en <<https://www.edqm.eu/>>. Acceso 24 de diciembre de 2015.
399. Jantratid, E., Janssen, N., Reppas, C. & Dressman, J. B. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm. Res.* **25**, 1663-76 (2008).
400. Klein, S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the *in vivo* performance of a drug. *AAPS J.* **12**, 397-406 (2010).
401. Galia, E., Nicolaidis, E., Hörter, D., Löbenberg, R., Reppas, C. & Dressman, J. B. Evaluation of various dissolution media for predicting *in vivo* performance of class I and II drugs. *Pharm. Res.* **15**, 698-705 (1998).
402. Leonard, F., Collnot, E.-M. & Lehr, C.-M. A three-dimensional coculture of enterocytes, monocytes and dendritic cells to model inflamed intestinal mucosa *in vitro*. *Mol. Pharm.* **7**, 2103-19 (2010).
403. Buret, A. G., Mitchell, K., Muench, D. G. & Scott, K. G. E. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology* **125**, 11-9 (2002).

Bibliografía

404. Posada, M. M. & Smith, D. E. Relevance of PepT1 in the intestinal permeability and oral absorption of cefadroxil. *Pharm. Res.* **30**, 1017-25 (2013).
405. Casasús, R., Climent, E., Marcos, M. D., Martínez-Mañez, R., Sancenón, F., Soto, J., Amorós, P., Cano, J. & Ruiz, E. Dual aperture control on pH- and anion-driven supramolecular nanoscopic hybrid gate-like ensembles. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 1903-17 (2008).

