

Actualización en Sistemas Transportadores de Fármacos

MARCELO C. NACUCCHIO, MAURICIO J. GATTO BELLORA y MIGUEL D'AQUINO

*Cátedra de Higiene y Sanidad. Departamento de Toxicología,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires,
Junín 954 - Capital Federal (1113), República Argentina*

INTRODUCCION

No son muchas las oportunidades en las que experiencias realizadas *in vitro* con el objeto de evaluar la actividad biológica de drogas y otras sustancias, son representativas de lo que realmente ocurre cuando las mismas son administradas a un organismo viviente, constituyéndose este fenómeno en el paso limitante para la exitosa aplicación clínica de tales agentes.

Esta diferencia observada puede ser fácilmente comprendida cuando recordamos que entre el sitio de administración de la droga y su órgano o tejido "blanco" existen múltiples barreras —ya sean anatómicas, químicas o biológicas— que deben ser atravesadas o evitadas para lograr el efecto terapéutico deseado.

Si a lo antedicho sumamos el hecho que la mayoría de las drogas son tóxicas a los tejidos normales, los cuales deben ser generalmente atravesados, tendremos otro argumento en favor de la administración selectiva de fármacos, tema que la farmacología moderna ha aceptado como desafío y que ha sido, especialmente en la última década, sujeto de intensivas investigaciones que prosiguen con creciente entusiasmo.

A efectos de obtener soluciones viables a este problema se han encamina-

do diversas metodologías. Una de ellas consiste en la modificación química de las moléculas farmacológicamente activas, con el consiguiente cambio en sus propiedades físico-químicas y biológicas pero que puede traer aparejado cambios desventajosos en cuanto a su actividad, toxicidad, estabilidad, etc.

A causa de dichos inconvenientes ha surgido el concepto de sistemas transportadores de drogas, que bien pueden ser modificados con el objeto precitado pero que no alteran la estructura de las drogas vehiculizadas por los mismos y que permiten aumentar la accesibilidad de la droga al sitio de acción, incrementando su actividad, con dosis menores y consecuente disminución de aparición de efectos colaterales.

El logro de este objetivo depende fundamentalmente de la relación que exista entre el sitio blanco (es decir, el órgano o tejido que se desea impactar con la droga), el medio que la rodea y el sistema droga-transportador.

Dado que la modificación del medio ambiente y del sitio blanco es prácticamente imposible en condiciones fisiológicas, el diseño del sistema transportador y su interacción con la droga debe ser el adecuado para poder soslayar las posibles barreras que describimos al

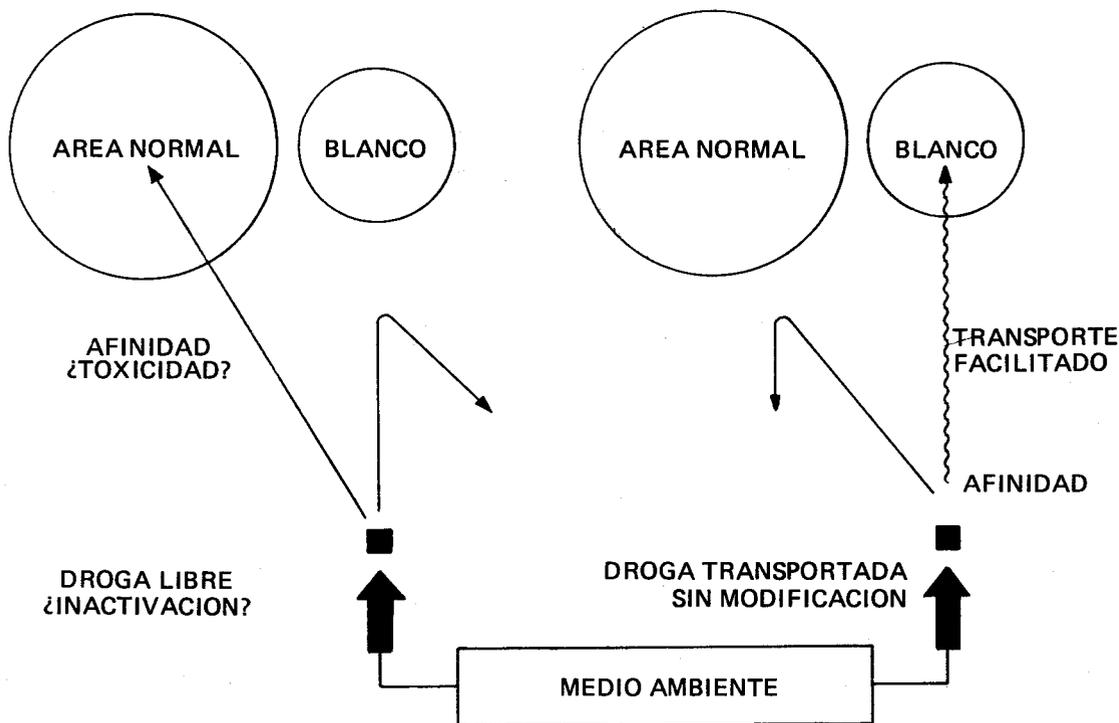


Figura 1. Situación de la droga administrada en forma normal y de la transportada por un sistema ideal frente al área de contacto posible dentro del organismo, tratando de representar en forma comparativa cuál es el objetivo deseado en el desarrollo de fármacos. Obsérvese el efecto que el medio ambiente pudiere ocasionar sobre la molécula con actividad farmacológica.

comienzo. La figura 1 resume el objetivo deseado en forma esquemática.

El diseño racional de lo que podríamos llamar un sistema transportador ideal, nos permite proponer una serie de requisitos fundamentales, los cuales enumeraremos a continuación:

- a) Debe mantener la actividad biológica de la droga.
- b) Debe restringir la distribución del fármaco al área o blanco deseado, interaccionando en mínima medida con el resto del organismo.
- c) Debe vehiculizar una cantidad suficiente de droga para obtener su efecto terapéutico.
- d) Debe mantener una liberación controlada y predecible del

agente vehiculizado.

- e) Debe enmascarar posibles efectos inmunogénicos o características no deseadas de la sustancia vehiculizada.
- f) Debe ser atóxico y biodegradable.
- g) Debe proteger al agente de medios biológicos inhóspitos que atenten contra la integridad de la molécula o su eficacia.
- h) Debe poseer la capacidad de vehiculizar una amplia gama de fármacos.

Muchas han sido las aproximaciones experimentales destinadas a obtener este modelo y algunas de ellas han resistido las pruebas aportadas por la experimentación, tanto *in vitro* como

in vivo y por lo tanto subsisten hoy como posibles sistemas transportadores, que con la realización de mayores investigaciones pueden perfilarse para ser utilizados en clínica en un futuro a corto plazo.

Con el propósito de facilitar el estudio de los sistemas transportadores hasta hoy propuestos, se han clasificado

en función de sus características estructurales. La Tabla 1 resume tal clasificación y demuestra la diversidad de formas logradas, sin entrar en una detallada descripción de las mismas, lo que escapa al alcance de este trabajo, para lo cual sugerimos remitirse a las citas bibliográficas respectivas.

Macromoleculares	Anticuerpos y F (a b') ₂
	Hormonas peptídicas
	Polilisina
	DNA (Acido deoxiribonucleico)
	Dextrano
	Polietilenglicol
Particulados	Biológicos
	Sintéticos
	Leucocitos Neutrófilos ⁴⁵
	Plaquetas ⁵⁰
	Eritrocitos ⁵²⁻⁵⁴
	Fibroblastos ⁵¹
	Varios tipos de polímeros magnéticos ^{61,62}
	Microesferas de acrílico ⁵⁸
	Microesferas de albúmina ^{55,56}
	Microesferas de almidón ⁵⁷
	Nanopartículas
	Liposomas

Tabla 1. Clasificación de sistemas transportadores de fármacos

Si bien no es posible abarcar con detalles todos los aspectos relacionados a los sistemas mencionados, nos haremos cargo de aquellos que hayan producido mayores expectativas.

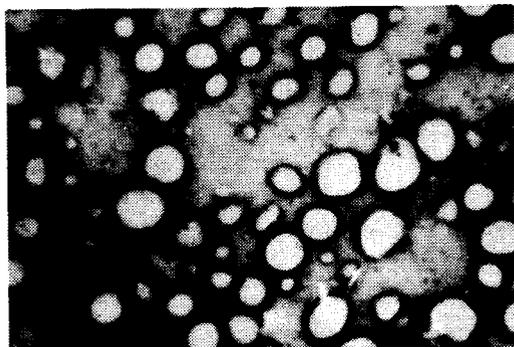
Considerando la cantidad y calidad de información suministrada y publicada en los últimos diez años, es indudable que los *liposomas* o también denominadas *vesículas lipídicas* han sido los más proficuos, no sólo como transportadores de fármacos, sino también de otras moléculas con actividad biológica de diversa naturaleza, razón por la cual en nuestra cátedra nos hemos dedicado al estudio de los mismos como carriers de ácidos nucleicos en el fenómeno de transformación bacteriana y

como transportadores de drogas anti-bióticas frente a microorganismos de importancia clínica.

LIPOSOMAS

Consisten en microvesículas o microesferas (100-3000 Å) constituidos por una o más bicapas de fosfolípidos dispuestas en forma concéntrica dejando atrapada en su interior fase acuosa.

El fundamento de los mismos radica en la capacidad de vehiculización de moléculas disueltas en sus fase acuosa (hidrófilas) o bien en su fase lipídica (hidrófobas), las cuales son atrapadas en el proceso de formación de las vesículas.



Fotomicrografía electrónica de transmisión de Liposomas unilamelares grandes (LU) (x 14.000)

El origen de los liposomas se remonta a mediados de la década del '60, en la que fueron descriptos¹ y fueron utilizados como modelos de membranas biológicas para el estudio de los

mecanismos de transporte de iones a través de las mismas, hasta que a principios de los años '70 fueron propuestos como posibles vehículos de moléculas farmacológicamente activas, lo que promovió la formación de grupos de trabajo que produjeron múltiples informes sobre la aplicabilidad terapéutica y limitaciones acerca de los mismos. Según el tamaño que presenten estas vesículas, las mismas se clasifican en pequeñas (S) y grandes (L) y en base al número de bicapas en unilamelares (U) y multilamelares (M). En función de estos parámetros, la clasificación internacionalmente aceptada se resume en la Tabla 2.

Tipo de Vesículas	Diámetro (μ)	Vol. Encapsulado (μ l/ μ mol lípido)	% encapsulamiento
ML	0,2 - 1	5	5 - 15
SU	0,02 - 0,05	0,5	0,5 - 1
LU	0,7 - 3	5 - 10	35 - 65

Tabla 2. Clasificación y características generales de los liposomas

En base a la carga que poseen los lípidos constituyentes, los liposomas pueden ser neutros, catiónicos o aniónicos, lo cual debe ser considerado en la interacción liposoma-droga y liposoma-célula, pudiendo producir un efecto positivo o negativo sobre la misma.

En la elaboración de los mismos, si bien puede realizarse por diversas metodologías, el fundamento es similar y consiste en la interposición de fosfolípidos secos en un medio acuoso, lo que promueve la formación de bicapas esféricas concéntricas (MLV) de gran tamaño, dado que esta es la estructura de menor

energía libre de todas las posibles. Posteriormente y si se quiere lograr la estabilización de esta microemulsión se la somete a la acción de ultrasonido, produciendo éste una disrupción de los MLV, formándose liposomas unilamelares de menor tamaño (SUV).

Los componentes lipídicos de estas vesículas son principalmente fosfolípidos, que pueden ser de distinta naturaleza, ya sea en carga, sustituyentes, etc. Se suele añadir otros componentes a efectos de modificar la superficie liposomal, modificar la fluidez de la membrana, o bien, como el colesterol,

que produce un empaquetamiento mayor de la estructura fosfolipídica de la bicapa, reduciendo la permeabilidad de sustancias a través de la misma, consiguiendo así que el soluto encapsulado no difunda rápidamente a través de la membrana liposomal².

Como vemos, la versatilidad de este sistema es muy amplia, lo cual será más profundamente ejemplificado en los párrafos siguientes y permite, dentro de ciertos límites, el diseño premeditado de algunas variables y parámetros útiles para el desempeño de los liposomas como transportadores.

Comportamiento "in vivo" de los liposomas. La primera experiencia clínica que describe el uso de liposomas como vehículos terapéuticos fue realizada en el tratamiento de un paciente que sufría enfermedad de Gaucher, al cual le fue administrada glucocerebrósido: β glucosidasa, previo encapsulamiento liposomal, con resultados satisfactorios³.

Esto marcó el comienzo de una nueva aplicación que posteriormente fue difundida y que promovió la realización de más y sofisticados trabajos con el objeto de conocer en profundidad los parámetros farmacocinéticos y las variables que determinan su comportamiento *in vivo*.

La diversidad en la estructura y composición de los liposomas permite diseñarlos de forma tal de soslayar algunos inconvenientes surgidos de la interacción de los mismos con medios biológicos, así como también aprovechar algunas propiedades del medio para mejorar su eficacia.

Para clarificar estos conceptos procederemos a citar experiencias representativas de los mismos: por ejemplo, se ha observado que la incorporación de

determinados fosfolípidos (dipalmitoil o diestearoil fosfatidilcolina) otorgan a los liposomas la capacidad de resistir a la hidrólisis por jugos pancreáticos, lo que permite que sustancias encapsuladas y sensibles a los mismos puedan ser administradas por vía oral. Este es el caso de la insulina, en la que se ha demostrado que su administración intragástrica encapsulada en liposomas en ratas diabéticas permite su absorción intestinal y una reducción significativa de los niveles de glucosa sanguínea^{4,5}. El mismo efecto fue observado para la tubocurarina⁴ y para la gentamicina en ratas⁶.

Los liposomas han mejorado el transporte de algunas sustancias a través de la barrera hematoencefálica⁷, sugiriendo que ellos pueden ser de particular valor para vehiculizar drogas al sistema nervioso central.

En cuanto a la interacción de los componentes sanguíneos con los liposomas, se ha descrito que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) remueven fosfolípidos liposomales produciendo desestabilización de las bicapas^{8,9} y pérdida de la molécula vehiculizada¹⁰. Pero este fenómeno ocasionado por las HDL puede ser controlado ajustando la concentración de colesterol en las bicapas, lo cual ha sido reportado por varios investigadores¹¹⁻¹⁴.

La modificación de las propiedades fisicoquímicas de las vesículas a través de su composición lipídica nos permite, en cierta forma, seleccionar el sitio de liberación de las moléculas atrapadas. Dos ejemplos interesantes permitirán una mejor interpretación de esto último: incluyendo en la estructura lipídica fosfolípidos cuya temperatura de transición sea ligeramente superior a la temperatura corporal, se logrará

que cuando dichos liposomas atraviesen una zona hipertérmica, como la que pueden ocasionar determinados tumores, la fluidez de las bicapas aumente, con la consiguiente liberación del principio activo encapsulado¹⁵. El mismo fundamento fue utilizado para la elaboración de liposomas pH-sensibles, útiles para la administración de drogas en zonas inflamadas o de ciertos tumores que producen una disminución del pH del medio local¹⁶. Las modificaciones precitadas y su efecto sobre el comportamiento *in vivo* de los liposomas son sólo algunos de los hasta hoy conocidos.

De particular interés es el uso de anticuerpos, que unidos a la superficie liposomal otorgan a los mismos capacidad de reconocer ligandos inmunoespecíficos y posibilitan dirigir a las vesículas y su contenido específicamente hacia diversos tipos celulares¹⁷⁻¹⁹. Esta última aproximación ha sido rápidamente desarrollada en los últimos años, en especial con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales²⁰ y presenta mayores posibilidades de éxito dado que no requiere cambios químicos en la molécula que posee la actividad farmacológica, como ocurre con la unión de anticuerpos a drogas, ya que en este caso sólo se modifica la superficie liposomal de forma tal que puedan anclar las moléculas con actividad de anticuerpos (ya sean inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas con capacidad de reconocimiento antigénico) manteniendo su actividad.

No todos los estudios con este sistema transportador han sido exitosos, ya que se han encontrado algunos obstáculos para la aplicabilidad clínica de los liposomas. Los principales consisten en su rápida captación por células del sistema retículoendotelial (hígado, bazo, ganglios) y el pobre pasaje

a través de capilares, los cuales son fenómenos tamaño-dependientes que se encuentran hoy bajo detallado estudio a efecto de encontrar soluciones viables, algunas de las cuales se han propuesto con relativa eficacia^{21,22}.

Otro factor que ha entorpecido el desarrollo en esta área es el fenómeno de la transferencia tecnológica en cuanto a lo referente al logro de la elaboración de una forma farmacéutica estable, con métodos de producción estandarizados y económicamente accesibles, pero es conocido el esfuerzo que realizan muchas empresas farmacéuticas mundiales y que paso a paso van logrando sus objetivos, lo que se verifica por la aparición de patentes en esta temática^{23,24}, no solamente en liposomas sino también en otros sistemas transportadores.

Con respecto a la interacción liposoma-célula, los mecanismos propuestos para la misma son fundamentalmente: fusión²⁵ y endocitosis²⁶, que serán favorecidos el uno o el otro en función de los componentes lipídicos de la membrana celular y la liposomal, como así también de la presencia de agentes fusógenos y del tamaño de las vesículas lipídicas. Cabe mencionar que en ambos casos, así como por otros mecanismos propuestos, la introducción de moléculas y materiales biológicamente activos se ve incrementada generalmente por la intermediación liposomal.

El hecho que los componentes estructurales de los liposomas sean componentes normales de todo ser vivo y capaces de ser metabolizados implica que la posible toxicidad provocada por la administración de los mismos sea nula, lo que ha sido demostrado por algunos investigadores^{29,27}. Este suceso constituye una ventaja significativa con respecto a otros sistemas transporta-

dores elaborados en base a sustancias no metabolizables que puedan acumularse en el organismo. Se podría seguir mencionando más información obtenida hasta el momento pero su extensión supera la de esta actualización.

Aplicaciones de los liposomas.

Muchas han sido las reportadas en los últimos diez años, pero sólo nos referiremos en primer lugar a aquellas que más impacto han ocasionado en el área de medicina. La experimentación en animales ha sido muy amplia, pero en humanos han sido realizados limitados ensayos²⁷⁻³⁰.

En quimioterapia de cáncer es donde más atención se le han prestado, no sólo por su capacidad de vehiculizar drogas citotóxicas y mejorar su eficacia con respecto a la droga libre en tumores sólidos en animales, evaluados como regresión del tumor y sobrevivencia, sino también por su capacidad de activar la actividad macrofágica y consiguientemente incrementar su capacidad de eliminar células malignas; a través de la vehiculización de limfocinas y muramyl dipéptidos por vía liposomal^{31,32}, en el caso del MAF, aparentemente entra en la célula en ausencia del receptor³².

La capacidad del sistema retículo-endotelial de captar liposomas ha sido utilizada para administrar selectivamente drogas para el tratamiento de patologías parasitarias a nivel de macrófagos, como por ejemplo leishmaniasis en modelos animales por vehiculización de drogas antimoniales^{33,34}. Otras enfermedades han sido experimentalmente tratadas con drogas encapsuladas en liposomas, como malaria^{35,36}, brucelosis³⁷, tripanosomiasis³⁷, etc.

Recientemente, nosotros hemos reportado³⁸ la interacción *in vitro* de un microorganismo productor de β lac-

tamasas, resistente a antibióticos β lactámicos, frente a un antibiótico β lactamasa sensible (piperacilina) encapsulado en liposomas y que en nuestras condiciones retiene su actividad frente al sistema enzimático inactivante, como se observa en la Figura 2, lo que permite superar tal barrera o mecanismo de resistencia bacteriana.

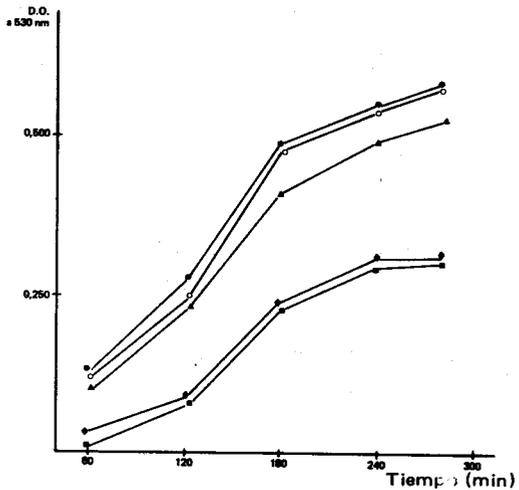


Figura 2. Curvas de crecimiento en medio líquido de *Staphylococcus aureus* (C.I.M. = 64 µg/ml) productor de β -lactamasas en presencia de: ▲ piperacilina 32 µg/ml, ○ piperacilina 32 µg/ml + β -lactamasa exógena preincubada, ■ piperacilina 32 µg/ml encapsulada en liposomas, ◆ piperacilina 32 µg/ml encapsulada en liposomas + β -lactamasa exógena. ● Curva control (*Staphylococcus aureus*), inóculo: $2,5 \times 10^{-5}$ microorg.

Otro uso terapéutico de los liposomas que aparece promisorio es la vehiculización de agentes quelantes para incrementar la remoción de metales pesados en pacientes que accidentalmente hayan estado expuestos a los mismos, lo que permitiría una efectiva y rápida detoxificación celular³⁹.

La absorción de liposomas y sus contenidos por el tracto gastrointestinal tiene un gran potencial terapéutico, ya que permite la administración de insu-

lina y otras moléculas de importancia clínica por dicha vía, lo que eliminaría al paciente del trauma de las inyecciones repetidas.

Otro de los más promisorios aspectos de los liposomas consiste en la administración de sustancias antigénicas para promover la respuesta inmune humoral y celular, pero que al estar atrapados se ven enmascarados sin producir los efectos adversos de otros adyuvantes inmunológicos^{40,41}.

Este último aspecto, sumado a la mayor absorción a nivel celular de los agentes mediados por liposomas, sostiene la utilización de los mismos como carriers de enzimas, de gran utilidad para terapia de reemplazo enzimático en aquellos casos clínicos que, por causas congénitas o no, presentan déficit, o ausencia de alguna enzima o sistema enzimático participante del metabolismo^{42,43}.

Otras áreas han sido también beneficiadas con la disponibilidad de estas vesículas lipídicas, como por ejemplo la tecnología del DNA recombinante, dado que los liposomas han permitido la transferencia de material genético entre distintos tipos celulares tanto *in vitro*^{44,47} como *in vivo*, a través de la incorporación, por vía liposomal, de genes que codifican para la biosíntesis de insulina en ratas, observándose la producción de dicho polipéptido en cantidad significativa respecto a animales que han sido inyectados con los mismos genes pero sin previo encapsulamiento⁴⁸, lo que abre una inquietante ventana hacia la terapia de reemplazo o sustitución genética.

Dentro de la fisicoquímica de membranas, el uso de liposomas como modelos de membranas biológicas ha permitido el estudio de la distribución

de lípidos y proteínas de las mismas, así como también de los mecanismos de transporte que ocurren a nivel de membrana plasmática.

Otros sistemas de transporte de drogas. Como se observa en la Tabla 1 la diversidad de los mismos impide su tratamiento detallado en un artículo de estas características. Pero intentaremos brindar una mínima información de aquellas que, si bien no han tenido el suceso provocado por los liposomas, bien pueden justificar interés como integrantes de un concepto moderno como es la administración selectiva de fármacos.

La utilización de células como vehículos de agentes farmacológicos representan una nueva alternativa, pero pese a existir algunas experiencias con las mismas^{45,50,51} permanecen en niveles más teóricos que prácticos, posiblemente por sus complejas limitaciones técnicas. Pero es importante destacar que el principio de su utilización consiste en la administración de sustancias encapsuladas a órganos homólogos, es decir a aquellos tejidos o sistemas de tejidos donde se encuentran las células que poseen las mismas características que el vehículo. La literatura cita resultados satisfactorios con el uso de los mismos como transportadores de agentes quimioterapéuticos.

Los fantasmas de eritrocitos, constituidos por glóbulos rojos a los cuales por un fenómeno osmótico se ha cambiado su contenido fisiológico por una solución acuosa de la droga a vehiculizar mantienen características similares a los liposomas excepto su versatilidad en cuanto a tamaño, composición química, etc. De cualquier manera una gran cantidad de información avala su utilidad como transportadores de moléculas con

actividad biológica⁵²⁻⁵⁴, especialmente hacia bazo e hígado como órganos receptores.

Otros sistemas particulados, pero no ya biológicos, han sido propuestos en los últimos años. Principalmente se los puede agrupar como microesferas que pueden ser elaboradas por materiales de distinta naturaleza, como por ejemplo albúmina^{55,56}, almidón⁵⁷, acrílicos⁵⁸, plásticos⁵⁹, etc.

En los casos en que la materia prima no es biodegradable, la desventaja en cuanto a la acumulación en el organismo y su toxicidad barrió con la posibilidad de éxito *in vivo*.

En cuanto a aquellas elaboradas por albúmina sérica humana agregada, no presentan dichos problemas y su uso como carrier es relativamente nuevo, pero ocurre que microesferas mayores de 7 μm de diámetro no pueden producir saturación de los tejidos blancos sin producir un masivo bloqueo de la circulación microvascular, por la que sólo pequeñas microesferas pueden ser utilizadas *in vivo* y de cualquier manera el sistema retículo endotelial los capta muy rápidamente, por lo que se proponen para el tratamiento de afecciones en dicha área corporal. Otra desventaja de los mismos es su capacidad immuno-

génica, que puede desencadenar reacciones alérgicas no deseadas⁶⁰.

Recientemente⁵⁷ ha sido citada la creación de microesferas de almidón, las cuales presentan algunas ventajas con respecto a las de otros materiales. La degradación por amilasas plasmáticas es la principal, sumada al hecho de minimizar reacciones inmunológicas adversas.

Otra aproximación experimental para el logro del objetivo, que es la administración selectiva de fármacos, ha sido introducida hace cuatro años y consiste en microesferas de albúmina pero de pequeños tamaños y que poseen la particular característica de contener moléculas de magnetita (Fe_3O_4) y por lo tanto responder a campos magnéticos, permitiendo así dirigir las microesferas a través de magnetos extracorpóreos colocados en la zona de interés (tumores, inflamación, etc)^{61,62}

Con respecto a los transportadores macromoleculares, como cuando mencionamos la unión de inmunoglobulinas a drogas, presentan como principal obstáculo el hecho que generalmente requieren la modificación estructural de los fármacos, pudiendo traer aparejadas modificaciones irreversibles negativas para el logro del efecto terapéutico deseado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bangham, A. D., M. M. Standish y G. C. Watkins (1965) *J. Mol. Biol.* 13, 238
2. Papahadjopoulos, D. S. Nir y S. Ohki (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 266, 561.
3. Gregoriadis, G., P. D. Leathwood y B. E. Ryman (1971) *FEBS Lett.* 14, 95-99
4. Dapergolas, G. y G. Gregoriadis (1977) *Biochem. Soc. Trans.* 5: 1383-86
5. Dapergoles, G. y G. Gregoriadis (1976) *Lancet* 2: 824-827
6. Morgan, J. R. y K. E. Williams (1980) *Antimicrob. AG. Chemother.* 17: 544-48
7. Mayhen, E., D. Papahadjopoulos, Y. M. Rustum y C. Dane (1976) *Cancer Res.* 36, 4406
8. Scherphof, G., F. Roerdink, M. Waite y J. Parks (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 542: 296-307
9. Chobanian, J. V., A. R. Tall y P. I. Brecher (1979) *Biochemistry* 18: 180-187
10. Gregoriadis, G. (1976) *N. Engl. J. Med.*, 295: 704-10 y 765-70
11. Gregoriadis, G y C. Davis (1979) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 89: 1287-93

12. Kirby, C. y G. Gregoriadis (1980) *Life Sci.* 27:2223-30
13. Gregoriadis, G. y J. Senior (1980) *FEBS Lett.* 119:43-46
14. Finkelstein, M. C. y G. Weissman (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 587 202-16
15. Wainstein, J. N., R. L. Magin, M. B. Yatvin y D. S. Saharko (1979) *Science* 204:188-91
16. Yatun, M. B., W. Krentz, B. A. Horwitz y M. Shinitzky (1980) *Science* 210: 1253-55
17. Gregoriadis, G y E. D. Neerunjun (1975) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 65:537-544
18. Martin, F. T., W. L. Hubbell y D. Papahadjopoulos (1981), *Biochemistry* 20, 4229-4238
19. Machy, P., J. Barbet y L. D. Leserman (1982) *Porc.Natl.Acad.Sci. USA*, 79, 4148-4152
20. Barbet, J., P. Machy y L. D. Leserman (1981), *J.Supramolec.Struct.Cell.Biochem.*, 16, 243-258
21. Gregoriadis, G. y D. E. Neerunjun (1974), *Eur.J.Biochem.* 47, 179-185
22. Tanaka, T., K.Taneda, H.Kobayashi, K.Okumura, S.Muranisai y H.Sezaki (1975), *Chem. Pharm.Bull.* 23, 3069-3074
23. Bayer Actien Gesell Schaft (1974). Institut National de la propiete industrielle, Republique Francaise. N° Publication 2.221.122
24. Hoffman-La Roche AG. (1979) *U.S. Patent. Appl. N° 813.913*
25. Batzri, S. y E. D. Korn (1975) *J.Cell,Biol.* 66, 621-634
26. Papahadjopoulos, D., G. Poste y E. W. Mayhew (1975) *Biochem.Soc.Trans.* 3, 606-608
27. Gregoriadis, D., C. P. Swain, E. S. Wills y A. S. Tauill (1974) *Lancet* 1: 1313-16
28. Ryman, B. E., R. F. Jewkes y K. Jegasingh (1978) *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 308:281-307
29. Belchetz, P. E., I. P. Braidman, J. C. W. Crawley y G. Gregoriadis (1977) *Lancet* 2: 116-17
30. Tyrrel, D. A., B. E. Ryman, B. R. Keeton y V. Dubonitz (1976) *Br.Med.J.* 2: 88-89
31. Fidler, I. J. (1980) *Science* 208:1469-71
32. Poste, G., R. Kirsh, W. E. Fogler y I. J. Findler (1979) *Cancer Res.* 39:881-92
33. New R. R. C., M. L. Chance, S. C. Thomas y W. Peters (1978) *Nature* 272: 55-56
34. Alving, C. R., E. A. Steck, W. R. Chapman Jr., V. B. Waitz, L. D. Hendricks, G. M. Swartz jr. y W. L. Hanson (1978), *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75:2959-63
35. Pirson, P., R. F. Steiger y A. Trovet (1980) *Trop.Med.Parasitol.* 74:383-91
36. Alving, C. R., I. Schneider, G. M. Swartz y E. A. Steck (1979) *Science* 205: 1142-44
37. Gregoriadis, G. (1980) *Pharmacol.Ther* 10:103-18
38. Nacucchio, M.C., M.J. Gatto Bellora y M.D'Aquino (1983) (remitido para su publicación)
39. Gregoriadis, G. y A. C. Allison (Eds.) (1980) "*Liposomes in Biologic Systems*". Chichester, N. Y. John Wiley and Sons
40. Gregoriadis, G. (1981) *Clin.Immunol.Newsl.* 2:33-36
41. Van Rooijen, N. y R. Van Nicuwmeagan (1980) *Cell.Immunol.* 49:402-407
42. Roerdink, F. H., G. L. Scherphof (1974) en *Enzyme therapy in lysosomal storage disense* (Tager, J. M., G. J. M. Hooghniker y W. T. Daems Eds.) New York: Elsevier (North-Holland) pág. 179
43. Weissman, G., H. Korchak, M. Finkelstein, J. Smolen y S. Hoffstein (1978) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 308: 235
44. Fraley, R. y D. Papahadjopoulos (1982) *Corrients topics in microbiology and immunology*, vol. 96, págs. 171-191
45. Fraley, R., S. Subramani, P. Berg y D. Papahadjopoulos (1980) *J. Biol.Chem.* 225:10431-32
46. Schaeffer-Ridder, M., Y. Wang y P. H. Hofschneider (1982) *Science* 215:116-168
47. Santini, P., M. C. Nacucchio y M. D'Aquino (1982) *Abstracts del III Congreso Argentino de Microbiología*
48. Nicolau, C., A. Le Pape, P. Soriano, F. Fargette (1982) *Cell Function and differentiation*, Alan R. Liss. Inc. N.Y., pág. 321-30
49. Ahn, Y.S., J.J.Byrnes, W.J.Harrington, M.L.Cayer, D.S.Smith, B.E.Brunskill y L.M.Pall (1978) *N.Eng.J.Med.* 298:1101-07
50. Gregoriadis, G. (Ed.) "*Drug Carriers in biology and medicine*" (1979) London - New York, Academic Press

51. Mc Affe, J. G., G. M. Gagne, G. Sobramanian, (1980) *J.Nucl.Med.* 21:1059-68
52. Ihler, G. M. (1979) "Drug carriers in biology and medicine" (G. Gregoriadis, ed.) London - New York, Academic Press, págs. 129-53
53. Fiddler, M. B., L. D. S. Hudson y R. J. Desnick (1977) *Biochem. J.* 168: 141-45
54. Hubbard, A. R., V. Sprandel y R. A. Chalmers (1980) *Biochem. J.* 190: 653-58
55. Rhodes, B. A., I. Zolle, J. W. Buchanan y H. N. Wagner (1969) *Radiology* 92, 1453-55
56. Senyrt, J. E., K. J. Widder y G. Czerlinski (1978) *J.Appl.Phys.* 49:3578-80
57. Russel, G. F. J. (1983) *Pharm International* 4:260-62
58. Edman, P. e I. Sjöholm (1979) *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 211:663-67
59. Parker, B. M., D. C. Andersen y J. R. Smith (1958) *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 98:306-309
60. Kramer, P. A. (1974) *J.Pharm.Sci.* 63:1646-49
61. Widder, K. J., A. E. Senyer y D. G. Scarpelli (1978) *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 158, 141-46
62. Widder, K. J., A. E. Senyrt y D. F. Ranney (1979) *Advances in pharmacology and chemotherapy* vol. 16, Academic Press. Inc.