



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS

**NANOPARTÍCULAS BIOADHESIVAS POLIMÉRICAS DE POLI VINIL METIL ÉTER-
ANHÍDRIDO MALEICO COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADO DE ÁCIDO
GLICIRRICÍNICO EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M.C. IRENE AGUILAR ROSAS

DRA. FLORA ADRIANA GANEM RONDERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DRA. HELGI JUNG COOK
FACULTAD DE QUÍMICA

DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

P R E S E N T A C I Ó N

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el “Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica” de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán bajo la supervisión del comité tutor integrado por: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero, Dra. Helgi Jung Cook y Dra. Luz María Melgoza Contreras.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la investigación fueron presentados en los siguientes eventos académicos: 3er Conference Innovation in Drug Delivery. Advances in local drug delivery (22 -25 de Septiembre del 2013, Pisa Italia), XLV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas (23 -26 de Septiembre 2012, Oaxaca, Oaxaca), Foro Internacional sobre Avances en Tecnología Farmacéutica – CISDEM. 1era. Reunión Iberoamericana de Estudiantes de Posgrado en Farmacia (23 -25 de Noviembre del 2011, México, D.F.), XLIV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas (23 -26 de Octubre del 2011, Ixtapa –Zihuatanejo), 1° Congreso de Alumnos de Posgrado, UNAM (18 -20 de Mayo del 2011, México, D.F.), Simposio 2010 Nanotecnología y Nanociencias en la UAM (15 y 16 de Noviembre del 2010, UAM Xochimilco, México, D.F.), XLIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas (3, 4, 5 y 6 de Octubre del 2010, Puerto Vallarta).

Como producto final se publicó el artículo: **Aguilar-Rosas, I. et al, 2015.** Preparation and characterization of mucoadhesive nanoparticles of poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) containing glycyrrhizic acid intended for vaginal administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41 (10), pp. 1632-1639.

México, D.F. 2015

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, *número de becario: 223405, número de beca: 268005, proyecto: 129320*), Universidad Nacional Autónoma de México (*PAPIIT IN216313-3*), Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica y comité tutor.

A la Dra. Susana Elvira Mendoza, Dra. Norma Delgado Buenrostro y al técnico Rodolfo Robles Gómez (Laboratorio de microscopía, FES Cuautitlán) por su contribución.

A Viridiana, Sergio, Pablo, Toño y María Elena por su amistad.

A la Dra. Adriana Ganem, ¡Gracias Totales!.

DEDICATORIA

Para Irene, Juan, Andrea Victoria, Valeria, Jorge Yosue y Maria Jose.

In a universe of ambiguity, this kind of certainty comes only once, and never again, no matter how many lifetimes you live.

Robert James Waller

S U M M A R Y

Nanoparticles (NPs) based on poly (methyl vinyl ether co-maleic anhydride) (PVM/MA) intended for cervical cancer treatment including glycyrrhizic acid (GA) (a drug with well-known antiviral and anticarcinogenic properties) were prepared and characterized. GA-loaded NPs were generated by a solvent displacement method. Incorporation of GA was performed during nanoprecipitation by establishing a pH value of 2.9 to the aqueous phase (phase 1), followed by adsorption of drug once NPs were formed (phase 2). The prepared GA-loaded NPs were characterized in terms of size, Z-potential, morphology, drug loading and the interaction of GA with PVM/MA (by differential scanning calorimetry). The bioadhesive potential of GA-loaded NPs were evaluated through the measurement of the *in vitro* interaction with pig mucin (at two pH values, 3.6 and 5; with and without GA adsorbed). The *in vitro* biological activity of the GA-loaded NPs were evaluated using a cell culture model (HeLa cells) where the cytotoxic effect was measured and compared with GA solutions. The evaluation of apoptosis as a potential mechanism of action was performed. Cell internalization of PVM-MA NPs was determined too.

The preparation method led to GA-loaded NPs with a mean diameter of 176.3 ± 18.7 nm, zeta potential of 44.8 ± 3.6 mV and drug loading of 15.07 ± 0.86 μ g/mg polymer. The highest mucin interaction resulted at pH 3.6 for NPs without GA adsorbed. The cytotoxic effect in HeLa cell cultures after treatment with GA-loaded NPs were similar with that obtained with a GA solution of 4.843 mM (half maximal inhibitory concentration determined at the study conditions). In both cases, apoptosis appeared as the mechanism of action. For the first time, internalization of PVM-MA NPs and the delivery of its content into the cell is demonstrated.

In sum the data obtained suggest the promise of using NPs of PVM/MA in the treatment of cervical cancer as a drug delivery system of GA.

CONTENIDO

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Marco Teórico	4
Capítulo 3. Justificación, Hipótesis y Objetivos	32
Capítulo 4. Metodología Experimental	34
Capítulo 5. Resultados y Análisis	45
Capítulo 6. Conclusiones	79

Anexo 1. Validación del método analítico para la cuantificación de GA en NPs/PVM-MA por medio de la técnica de HPTLC

Anexo 2. Materiales, equipo y software

Bibliografía.

ABREVIATURAS

CaCU	Cáncer cérvico uterino
GA	Ácido glicirricínico
HPTLC	Cromatografía de capa fina de alta resolución
HPV	VPH de alto riesgo
LEBG	Lesión intraepitelial de bajo grado
LIEAG	Lesión intraepitelial de alto grado
NPs	Nanopartículas
NPs/PVM-MA	Nanopartículas bioadhesivas de PVM-MA
NPs/PVM-MA/GA	NPs/PVM-MA cargadas de ácido glicirricínico
NPs/PVM-MA/RN	NPs/PVM-MA cargadas con rojo nilo
PVM-MA	Poli (vinil metil éter-anhídrido maleico)
SLC	Sistemas de liberación controlada de fármacos
SLF	Sistema de liberación de fármacos
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es la complicación más grave de una infección por Virus del papiloma humano (VPH) en el cuello del útero, si esta no es detectada y tratada en las primeras etapas de la enfermedad. A pesar de ser una enfermedad totalmente prevenible y controlable, aún es considerada como un problema de salud pública mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS); el CaCU es el segundo tipo de cáncer de mayor incidencia en las mujeres y uno de los principales tipos de cáncer causante de muerte de la población femenina en el mundo. No es de sorprender que los mayores índices se registren en países de bajo ingreso económico, donde la baja calidad de los servicios de salud impiden llevar a cabo adecuadas acciones de prevención, control y diagnóstico. México es un claro ejemplo de esta situación, donde para el año 2010 la OMS esperaba que el CaCU fuera la principal causa de mortalidad entre mujeres de 15 y 44 años [Lewis, M.J., 2004; WHO, 2010; WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre); WHO Media Center, 2011].

Los programas para la reducción de la mortalidad y morbilidad del CaCU se basan en la detección oportuna de anomalías citológicas e histológicas en el cuello del útero empleando la prueba de Papanicolaou; sin embargo en muchas ocasiones los resultados de la citología cervical no son exactos, resultando en diagnósticos inadecuados que permiten que la infección evolucione silenciosamente hasta el desarrollo de cáncer. Otra contribución a los altos índices son factores socioculturales (costumbres, religión, equidad de género, etc.) y la idiosincrasia que impiden el acercamiento de la población a los servicios de salud para la prevención del CaCU, resultando en diagnósticos tardíos con resultados positivos a displasia leve (lesión intraepitelial de bajo grado,

LIEBG), moderada o grave (lesión intraepitelial de alto grado, LIEAG) [Hidalgo-Martínez, 2006; Lazcano-Ponce et al., 2008; Secretaría de Salud, 2007; Secretaría de Salud, 2010]. La importancia de un diagnóstico temprano radica en que las LIEBG pueden ser reversibles, mientras que las LIEAG son una señal inminente de metástasis; el tratamiento oportuno de estas últimas previene su progresión hasta el desarrollo de cáncer [McCredie et al., 2008; Moscicki et al., 2006; Steenbergen et al., 2005.]. El tratamiento de las LIEAG consiste en la eliminación o destrucción del tejido lesionado sin hacer daño al resto del órgano, manteniendo sus funciones. Aunque estos métodos de ablación son los de primera elección, existen terapias que consisten en la administración de sustancias químicas por aplicación vía tópica, entre estas se encuentra el tratamiento con un compuesto de origen natural conocido como ácido glicirricínico (GA) [Carrillo-Pacheco et al., 2012; Secretaría de Salud, 2007].

Investigaciones recientes han propuesto al GA como terapia coadyuvante en la regresión de las LIEAG y en la disminución del número de copias en la hibridación *in situ* para HPV de alto riesgo (HPV-AR) (serotipos 16 y 18), además ha demostrado la capacidad de remitir eficazmente las LIEBG [Dragustinovis et al., 2007; Hernández-Valencia et al., 2011].

El GA es una saponina triterpénica, principal responsable de la actividad farmacológica de las especies de *Glycyrrhiza*, especialmente de la regaliz; la cual es reconocida por sus propiedades antivirales, antitumorales, antitusivas, antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas, antioxidantes, etc. [Amagaya et al., 1984; Davis et al., 1991; Fiore et al., 2005; Fenwick, 1990; Groen et al., 1951; Hostettmann et al., 1995; Koide et al., 1997; Liao et al., 2012; Nomura et al., 2002; Ruiz et al., 2009; Scientific Committee on Food, 2003; Shibata, 2000; Sung et al., 2004; Zhang H. et al., 2009; Zhang y Ye, 2009]. La regaliz ha sido usada de forma común en la medicina tradicional, cuyos efectos farmacológicos han sido ampliamente investigados llamando la atención principalmente sus efectos anticancerígenos y antivirales; por lo cual el GA ha sido propuesto para el tratamiento de enfermedades como hepatitis C, cáncer y como estructura modelo en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), [Balbatina Jr. et al., 2010; Salminen et al., 2008; Van Rossum et al., 1998].

La necesidad de mejorar la eficacia terapéutica de las moléculas activas existentes, así como la seguridad de los fármacos y la aparición de nuevas moléculas activas, aunado al gran avance tecnológico entre otros, han dictado las reglas en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos (SLF) en los últimos 50 años [Li et al., 1987]. La idea se centra en el diseño SLF que logren la liberación del principio activo a un determinado ritmo en un sitio específico, tomando en cuenta las características terapéuticamente óptimas del fármaco y de acuerdo a un régimen de dosificación específico. Estos sistemas de liberación, llamados sistemas de liberación controlada (SLC), logran controlar de forma temporal y/o espacial la migración del fármaco desde su posición

inicial dentro del sistema de liberación hacia la capa más externa del mismo, para migrar posteriormente al medio circundante y al sitio de acción [Hoffman, 2008; Kreuter, 1994a]. Dentro de los SLC, los sistemas coloidales han demostrado cumplir con las características para vectorizar y controlar la velocidad y duración de la migración del fármaco hacia el sitio de acción debido a los materiales poliméricos con los cuales son fabricados, su tamaño, entre otras características [Kreuter, 1994b]. Las nanopartículas (NPs) poliméricas puede encapsular dentro de su matriz polimérica fármacos, o adsorbido en la superficie, contribuyendo a las propiedades de vectorización del sistema coloidal [Couvreur et al., 1996; Kreuter, 1994b].

El concepto de localización de fármacos no solo se limita a sistemas coloidales que por su tamaño nanométrico se acumulen en el sitio de acción del fármaco (vectorización pasiva) o que debido a la presencia de ligandos específicos sean retenidos en determinadas regiones del organismo (vectorización activa). El uso de polímeros con propiedades mucoadhesivas también representa una opción al momento de pensar en la vectorización de fármacos, sobre todo cuando se trata de localizar fármacos en regiones con presencia de membranas mucosas. Por lo tanto, si el sistema de liberación está fabricado con estos polímeros mucoadhesivos, el SLC tendrá la capacidad de mantenerse unido por un prolongado lapso de tiempo a la superficie mucosa, inhibiendo su dilución por fluidos corporales y aumentando el contacto entre el fármaco y el sitio de acción logrando los objetivos de la vectorización: incrementar la biodisponibilidad del fármaco, disminuyendo la dosis y frecuencia de administración. Además de la vectorización, el uso de polímeros también contribuye en el control de la liberación [Peppas et al., 2000].

Dentro de la gran cantidad de sistemas con propiedades bioadhesivas, sin duda las NPs son las que siguen llamando la atención; en particular las nanopartículas bioadhesivas de poli (vinil metil éter-anhídrido maleico) (NPs/PVM-MA). Las NPs/PVM-MA representan una gran opción para la incorporar el GA en un sistema capaz de retenerse en la mucosa del cuello del útero por un mayor periodo de tiempo, evitando la dilución por fluidos vaginales y aumentando el tiempo de contacto en el sitio de administración, contrarrestando las desventajas del sitio de administración.

Con base en lo anterior y en vías de mejorar y contribuir al tratamiento de las lesiones precancerosas con GA, este proyecto de investigación tiene como propósito la incorporación del GA en NPs/PVM-MA. Además de su desarrollo, el sistema obtenido fue caracterizado físicamente haciendo énfasis en la capacidad de carga del fármaco en el sistema y optimizándola hasta lograr la mayor carga posible. Así mismo, se determinó la interacción NPs-mucina con el fin de evaluar su capacidad de bioadhesión. Complementando el desarrollo y la caracterización tecnológica, se evaluó el efecto farmacológico de las NPs desarrolladas sobre cultivos de células HeLa (células infectadas por VPH serotipo 18), contribuyendo en la determinación del mecanismo de acción.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

Ácido glicirricínico

El GA (Figura 1) es una saponina triterpénica, formado por un disacárido de β -D-(1 \rightarrow 2) ácido glucurónico unido a un O-3 triterpeno (ácido glicirretínico) [Groen et al., 1951; Hostettman y Marston, 1995; Koide, Ukawa, Tagaki y Tamagaki, 1997; Ruiz et al., 2009; Scientific Committee on Food, 2003].

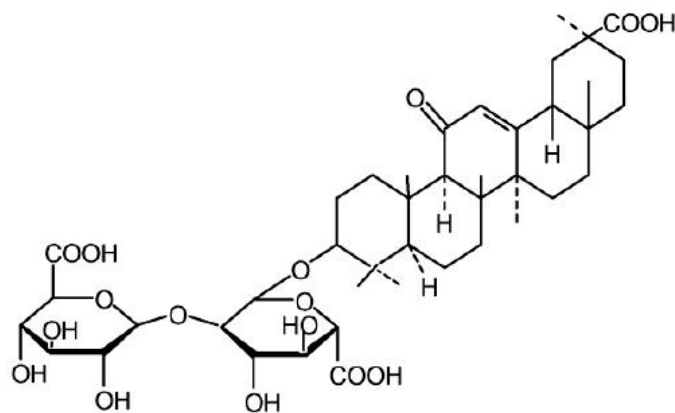


Figura 1. GA [Sun, Xie, Tian, Liu; 2007]

Presenta dos estereoisómeros, el α y β [Scientific Committee on Food, 2003], el α -GA presenta configuración cis en el C17 – C18 en la unión de los anillos D y E del triterpeno, siendo el estereoisómero responsable de la actividad farmacológica de la regaliz [Amagaya et al., 1984].

2.1.1 Características fisicoquímicas

- Fórmula molecular: $C_{42}H_{62}O_{16}$
- Peso molecular: 822.94 M
- Punto de fusión: 209 °C
- Coeficiente de partición (octanol/agua): $\log K_{o/w} = 2.80$
- Solubilidades: Muy soluble en agua caliente, alcohol
- Prácticamente insoluble en éter
- pKa's: $pK_{a1} = 2.76 \pm 0.70$, $pK_{a2} = 2.81 \pm 0.70$ y $pK_{a3} = 4.71 \pm 0.70$
- Concentración micelar crítica: $2 \text{ a } 3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$

Otras características: El GA es un ácido débil en cuya molécula se encuentran tres grupos carboxilo y cinco grupos hidroxilos capaces de interactuar con otros grupos funcionales por medio de la formación de puentes de hidrógeno. Aunque al igual que cualquier otra saponina, por la naturaleza anfifílica de su molécula, el GA presenta propiedades de superficie únicas en su tipo, como: actividad interfacial considerable, formación de micelas y geles rígidos termoresistentes y capacidad de actuar como agente emulsificante [Augustin, Kuzina, Andersen y Bak, 2011; Kondo, et al, 1986; National Library of Medicine's TOXNET, 2012; Niu, Xie, Lou y Liu, 2005; Scientific Committee on Food, 2003; Sun, Xie, Tian y Liu, 2007].

2.1.2 Obtención

El GA se encuentra exclusivamente en las partes leñosas [Hayashi et al., 2004] de las especies del género *Glycyrrhiza* (*G. glabra*, *G. uralensis* y *G. inflata*) y se obtiene a partir de la maceración de las raíces, rizomas y estomas secos de la planta por medio de un proceso de extracción con agua caliente en forma de sales de calcio, magnesio y potasio. El tratamiento ácido de los extractos acuosos seguido de una neutralización del material precipitado con amonio diluido, permite la obtención de la sal de amonio, la cual posteriormente es purificada por extracción de solvente entre otras técnicas de separación. Un 13 % del GA se presenta como el isómero α , el resto como en β [Davis y Morris, 1991; Fenwick, Lutomski y Nieman, 1990; National Library of Medicine's TOXNET, 2012; Nomura, Fukai y Akiyama, 2002; Scientific Committee on Food, 2003; The United States Pharmacopeial Convention, 2008. Zhang y Ye, 2009].

2.1.3 Farmacología

La gran atención recibida hacia las diferentes especies de *Glycyrrhiza* en la medicina tradicional y el descubrimiento del GA como principal componente activo en las preparaciones a base de regaliz han llevado al estudio de sus propiedades farmacológicas en los últimos años (Tabla 1), dentro de los cuales los efectos anticancerígenos y antivirales han captado la mayor atención [Balbatina, Jr. et al., 2010; Salminen et al., 2008; Van Rossum et al., 1998].

Tabla 1. Enfermedades tratadas efectivamente a base de GA [Fiore et al., 2005].

Usos	Referencia
Mucolítico	Blumenthal et al., 2000
Úlceras duodenales y gástricas, como tratamiento adjuvante en dolores espasmódicos por gastritis crónica, laxante.	Blumenthal et al., 2000; Bradley, 1992; Wichtl and Bisset, 1994; Armanini et al. 2002
Antioxidante, hipolipidémico	Fuhrman et al., 1997; Fuhrman et al. 2002
Dermatitis atópica, agente antiinflamatorio, edema y eritema	Saeedi et al., 2003; Fujita et al., 1980; Halder and Richards, 2004

El GA ha probado inducir la muerte selectiva de células infectadas por virus estimulando un incremento en la producción de ciclina viral, inducir la producción de la interleucina 12, inhibir la fosforilación de proteínas virales y modificar las señales post-transcripcionales esenciales para el crecimiento; además, de inhibir la producción de prostaglandina E2 y promover la producción de interferón gamma mejorando la respuesta del hospedero ante la infección [Curreli, Friedman-Kien, Flore, 2005; Dai, et. al., 2001; Dragustinovis et al., 2007; Ohuchi, Kamada, Levine, Tsurufuji, 1981; Shinada et al., 1986].

2.1.3.1 Propiedades Antivirales

La capacidad de presentar actividad antiviral está ligada a las propiedades generales de las saponinas, varios estudios experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* han evaluado la capacidad del GA de actuar contra una gran cantidad de virus como: Herpes virus simple tipo 1 (HSV-1), Virus de la polio tipo 1 y 2, Rinovirus tipo 1B (HRV 1B), Virus del herpes, Virus de la rubeola, HIV y Virus de la influenza humana tipo A y B [Francis et al., 2002; Hostettman, Marston, 1995; Lacaille-Dubois y Wagner, 1996; Sparg, Light y van Stade, 2004].

De la misma manera varios estudios han evaluado capacidad antiviral del GA al reportar la inhibición de diversos virus ADN y ARN, incluyendo el VIH, pero sin tener efecto alguno sobre la síntesis y replicación de células infectadas al contrario de otras saponinas. También el GA ha

demostrado inhibir la replicación de VIH en varios sistemas *in vitro*, ya sea en aquellos que evalúan la formación de placa, en aquellos que evalúan el efecto citopático y hasta en los ensayos de expresión de antígenos VIH específicos. Se ha sugerido que la actividad del GA es debido a la interferencia con la adsorción del virus y efectos inhibitorios en la proteína quinasa C, la cual se cree que es requerida para la unión de las partículas de VIH-1 a los receptores CD4. Aunque el GA no tiene efecto antiviral significativo en la transcriptasa reversa viral, la sal sulfatada ha demostrado ser cuatro veces más potente [Lacaille-Dubois y Wagner, 1996]. En estudios *in vivo* administrado a pacientes diagnosticados con SIDA el GA ha demostrado retrasar la progresión de los síntomas y disminución de la antigenicidad viral, sugiriendo la inhibición de la replicación del VIH *in vivo*. También el GA ha demostrado el aumento de la cuenta de linfocitos OKT4 en pacientes hemofílicos con infecciones por VIH asintomáticos. [Lacaille-Dubois y Wagner, 1996].

Entre otros virus en los que se ha estudiado la actividad antiviral del GA ha sido el herpes virus simple tipo 1 (HSV-1) en el cual se ha visto el efecto de su inhibición. Con respecto a partículas del virus del herpes simple estas son irreversiblemente inactivadas por el GA, además se ha demostrado actividad antiviral *in vitro* contra el virus Varicella-Zoster [Hostettman, Marston, 1995]. En otros estudios el GA ha demostrado inducción de la apoptosis en células de linfoma primario efusivo transformadas por Herpesvirus del Sarcoma de Kaposi e infección terminal latente en linfocitos B [Nassiri, y Hosseinzadeh, 2008]. Wolkerstorfer, Kurz, Bachhofner y Szolar (2009) demostraron la actividad antiviral del GA contra el virus de la influenza A por medio de la interacción con la membrana celular, que resulta en la reducción de la actividad endocítica y por tanto disminución en la captura del virus. Al respecto del Epstein-Barr virus el GA ha demostrado la inhibición *in vitro* de la infección, no obstante productos del metabolismo del GA, como el ácido glicirretínico, han presentando mayor actividad aunque también mayor efecto citotóxico [Lin et al., 2008].

Por otro lado, aunque el GA ha demostrado actividad antiviral *in vitro* contra el virus de la hepatitis A y el virus del herpes simple, la inducción del aclaramiento viral en pacientes con hepatitis C crónica no ha sido demostrada; solamente en una evaluación a largo plazo se ha observado que el tratamiento con el fármaco reduce las complicaciones producidas por el virus [Van Rossum, 1998]. Otros estudios se unen a esta serie de reportes que han demostrado la inhibición de la replicación viral *in vitro* del Epstein-Barr virus, Virus del herpes simple, Virus de la hepatitis A, Virus de la hepatitis B, Citomegalovirus humano, Coronavius SARS, Virus de la varicela zoster [Baba y Shigeta, 1987; Cinatl et al., 2003; Nassiri y Hosseinzadeh, 2008; Lin, 2003; Pompei et al., 1979; Takahara et al., 1994; Sato et al., 1996].

Se ha propuesto el uso del GA como tratamiento coadyuvante de verrugas genitales benignas de la piel y mucosas causadas por el VPH [Domínguez Gómez, Daniel Simón, Abreu Daniel,

Zelenkova, 2012.]. Actualmente existe un medicamento (Epigen[®]) en forma de solución que contiene GA indicado para el tratamiento tópico de infecciones por el virus del herpes simple, tanto HSV1 como HSV2, así como su utilidad en el herpes zóster.

2.1.3.2 Propiedades Anticarcinogénicas

De las más de once clases de saponinas identificadas en la naturaleza, y a pesar de su gran variabilidad estructural, numerosos reportes resaltan las propiedades anticarcinogénicas de las saponinas a través de una gran variedad de mecanismos; varias saponinas presentan inhibición del crecimiento de células tumorales por arresto en el ciclo celular, así como por medio de la apoptosis. Las saponinas en combinación con tratamientos antitumorales convencionales han resultado en la mejora del éxito de las terapias, e.g. Furcreastatina, Saponinas esteroidales, Saponinas tipo espirostanol y furostanol, Saponina triterpénica, Saponinas del ginseng [Man, 2010; Sparg, Light y van Stade, 2004]. Cabe mencionar que aunque varias clases de saponinas han reportado presentar efecto citotóxico, eso no quiere decir que puedan ser usadas como agente antitumoral [Sparg, Light y van Stade, 2004]. En esta moda, el GA se encuentra dentro de estas saponinas cuyos efectos anticarcinogénicos son relevantes para su estudio y aplicación.

Los efectos carcino-químio preventivos del GA han sido reportados en piel de ratón y tumores pulmonares y hepáticos [Konoshima y Takasaki, 2002]; tanto *in vivo* como *in vitro* un derivado del GA ha demostrado la inhibición de la acción de promotores tumorales por inhibición del incremento en el metabolismo por fosforilación, así como supresión de forma significativa del efecto promotor de teleocidina sobre la formación de tumores en piel de ratón [Nishino, Kitagawa e Iwashirma, 1984]. Además se ha visto que el GA protege de la carcinogénesis inducida químicamente al suprimir el desarrollo de lesiones precancerígenas [Khan, 2013], teniendo el potencial de proteger contra la carcinogénesis inducida por radiación por protección del DNA celular al captar radicales libres [Gandhi et al., 2004]. Se ha visto que esta saponina triterpenoide mejora la muerte de células tumorales por medio de la activación de macrófagos por IFN-gamma, muerte celular mediada principalmente por óxido nítrico [Yi, Nakashima e Isobe, 1996].

En varios estudios se ha reportado la inducción de la apoptosis en diversos tipos de células tumorales por parte del GA y sus derivados, como en: líneas celulares de cáncer de próstata, células de cáncer gástrico KATO III, células de leucemia promielocítica humana HL-60, células de hepatoma humano, y células tumorales de útero (SiHa) [Hibasami, Iwase, Yoshioka y Takahashi, 2005 y 2006; Lee et al., 2008; Thirugnanam, Xu, Ramaswamy y Gnanasekar, 2008].

2.1.4 Ácido Glicirricínico y Cáncer Cérvico Uterino

Aunque las propiedades anticancerígenas y antivirales del GA son bien conocidas y ampliamente estudiadas, poca es la experiencia tanto *in vitro* como *in vivo* con respecto a su la capacidad de actuar como una alternativa o terapia coadyuvante en el tratamiento del CaCU. Con respecto a los estudios *in vitro* sobre el efecto anticarcinogénico del GA, Badam (1997) y Herrmann y Wink (2011) reportan un efecto citotóxico sobre cultivos de células HeLa al someter los cultivos a un tratamiento con la saponina. Aunque el mecanismo por el cual inducen citotoxicidad es desconocido, se ha reportado el efecto apoptótico por parte del GA en varias líneas celulares cancerígenas [Logashenko et al., 2011].

Pocos son los estudios que han sido llevados a cabo *in vivo*, uno de ellos fue realizado en pacientes jóvenes con infecciones persistentes por VPH, de las cuales un 85.4 % presentaba LIEBG. Durante el tratamiento con GA por 3 meses hubo una reducción en el número de pacientes con manifestaciones clínicas de cervicitis, mejora en los resultados de las pruebas de la prueba de papanicolau (valores normales) y disminución en el número de cambios atípicos evidenciados por colposcopia; con una velocidad de eliminación del VPH de 6 meses del 40 % en los pacientes con tratamiento [Shargorodskaya, 2013]. De la misma forma, el uso de GA resultó ser efectivo en la resolución clínica de lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado en pacientes diagnosticados con VPH en edad reproductiva [Hernández-Valencia et al., 2011].

Otro estudio revela remisión de la infección por el virus y regresión de las lesiones intraepiteliales, realizado en pacientes con infección por el VPH-AR que presentaban lesión LIEAG, en las cuales se aplicó GA formulado en gel termorreversible (500 mg). Al seguir la evolución del estado clínico inicial de displasia grave (NIC3), mediante los criterios de diagnóstico tales como: la citología, colposcopia, biopsia, cultivos vaginales, captura de híbridos para HPV-AR, como diagnóstico (estudio histopatológico), tipificación viral por PCR e inmunohistoquímica, comparada contra un control negativo se sugiere su uso como posible terapia coadyuvante en la regresión de las LIEAG y las disminución del número de copias en la hibridación *in situ* para HPV-AR (Dragustinovis, 2007).

Nanopartículas

2.2.1 Sistemas de liberación controlada de fármacos

Se entiende como “liberación de fármaco o principio activo” al proceso en el cual el fármaco, en solución, migra de su posición inicial dentro del SLF hacia la capa más externa del mismo para

migrar posteriormente al medio circundante [Fu y Kao 2010]. Aquellos sistemas con la capacidad para controlar de forma temporal y/o espacial el proceso de liberación del principio activo hacia el organismo son los llamados SLC [Li, Robinson y Lee, 1987].

Para que un SLF logre tener control sobre la liberación del activo se tiene que diseñar de tal forma que se pueda controlar la estructura molecular del sistema y las interacciones termodinámicas específicas con el fármaco [Peppas, 2013]. Debido a que los polímeros son materiales cuya composición química puede ser diseñada, y por tanto sus propiedades físicas, químicas y mecánicas pueden ser controladas; estos son utilizados dentro de los SLC para que las interacciones del fármaco pueden ser predecibles, al igual que su desempeño dentro del organismo [Pillai y Panchagnula, 2001].

El principal propósito de los SLC es controlar de forma planeada y predecible la liberación del fármaco a su sitio de acción con el fin de lograr y mantener niveles plasmáticos semejantes a una administración intravenosa [Bernad-Bernad, Ganem-Rondero, Melgoza-Contreras, Quintanar-Guerrero, 2003].

2.2.1.1 Control temporal de la liberación

El control temporal de la liberación de principio activo se da cuando un SLC gobierna la velocidad y la duración de la migración de fármaco desde su posición inicial dentro del SLC hacia el medio circundante [Dash, Murthy, Nath y Chowdhury, 2010]. El control temporal de la liberación de fármacos se obtiene del control de la estructura molecular de SLC influenciada por la composición de los materiales poliméricos que lo forman, lo que le da características únicas con respecto a su estructura, erosión, degradación, etc. Las propiedades fisicoquímicas del fármaco, el medio de liberación y las interacciones termodinámicas específicas entre el fármaco y el SLC resultan en patrones de liberación específicos para cada uno de ellos [Fu y Kao, 2010; Peppas, 2013].

2.2.1.2 Control espacial de la liberación

Se define como vectorización de fármacos a la optimización del índice terapéutico por la localización de la actividad farmacológica del activo en el sitio de acción [Bodor y Buchwald, 2001]. Aunque esta definición es muy amplia, la vectorización de fármacos puede referirse a [Schreier, 2001]:

1. La manipulación de la liberación y absorción del fármaco en un compartimento específico del organismo con el fin de: a) obtener una acción prolongada, b) proteger al fármaco y c) proteger compartimentos del cuerpo de efectos adversos no deseados.

CAPÍTULO 2

2. Entrega selectiva del fármaco a un tejido, órgano o población de células específicas.
3. Evitar que un tejido u órgano en específico, por su sensibilidad, sea afectado por el fármaco.

La entrega sitio-específica puede lograr el incremento de la cantidad de fármaco que llega al sitio de acción y, simultáneamente, disminuir la cantidad de fármaco distribuido en otras partes del cuerpo para evitar efectos adversos; lo cual se traduce en la administración de la dosis adecuada, disminución de los efectos adversos e incremento del índice terapéutico [Kreuter, 1994a].

2.2.2 Sistemas coloidales

La palabra coloide deriva del griego $\kappa\omicron\lambda\omicron\iota$, goma o cola, y es el término que se usa para referirse a partículas con una talla (tamaño) entre los 5 nm a 50 μm [Pashely y Karaman, 2004]. Es precisamente su tamaño lo que permite que estos sistemas presenten las siguientes ventajas al ser utilizados como escalafones para la liberación de fármacos [Beija, 2012; Burgess, 2007; Mishra, Patel, Tiwari, 2010]:

- Un sistema de mayor área superficial comparado con su volumen
- Mejora en la farmacocinética y biodistribución de los fármacos
- Disminución de la toxicidad del principio activo en puntos diferentes al sitio de acción
- Estímulo del sistema inmune
- Acumulación preferencial del fármaco en el sitio de acción
- Mejora de la solubilidad de compuestos hidrofóbicos
- Incremento de la estabilidad de activos (e.g. péptidos y proteínas)
- Disminución de la degradación de los fármacos
- Control de la liberación de fármacos, etc.

Los sistemas coloidales pueden dividirse en dos tipos: acarreadores particulados (capsular, monolítico o celular) y acarreadores solubles (conjugados de fármaco con macromoléculas) [Burgess, 2007]. Hasta el día hoy se han propuesto una gran variedad de sistemas coloidales como SLF, cada uno con sus ventajas y desventajas tales como: Liposomas, micelas poliméricas, polimersomas, niosomas, micropartículas, NPs poliméricas, nanocápsulas, nanocristales, quantum dots, NPs lípidicas sólidas, NPs magnéticas, NPs inorgánicas (oro, plata, etc), dendrímeros, conjugados fármaco-anticuerpo, eritrocitos y virus [Beija, 2012; Burgess, 2007; Mishra, Patel, Tiwari, 2010; Parveen, Misra y Sahoo, 2012].

Idealmente los sistemas acarreadores de fármaco deberían acumularse selectivamente en el sitio requerido, ser capaces de cargar una cantidad suficiente de fármaco y liberarlo a una velocidad apropiada en el sitio de acción, ser estables tanto *in vitro* como *in vivo* hasta alcanzar su sitio blanco, ser biodegradables, no tóxicos, no inmunogénicos, fáciles de preparar, de bajo costo y ser capaces de poder esterilizarse (para su uso parenteral) [Burgess, 2007]. La evolución de los sistemas coloidales ha permitido que estos cumplan, en su mayoría, con las características de vectorización combinadas con la capacidad de una liberación del fármaco a una velocidad óptima, de entre los cuales las NPs aventajan por presentar una mejor estabilidad [Kreuter, 1994b].

Muchos y diversos materiales han sido utilizados para la fabricación de NPs utilizadas como SLC, como: polímeros, lípidos, virus y compuestos organometálicos, etc. [Naahidi et al., 2013]; de los cuales los polímeros (sintéticos y/o de origen natural) son los que cumplen con las características de biocompatibilidad y biodegradación necesarias para su aplicación. Los polímeros para la fabricación de NPs pueden ser sintéticos, naturales y pseudosintéticos. La arquitectura del polímero dicta las propiedades fisicoquímicas del acarreador, su efectividad de carga y velocidad de liberación del fármaco, así como su biodistribución. Se ha encontrado que los polímeros pueden controlar la liberación sostenida de los fármacos encapsulados, proteger a los fármacos de la actividad enzimática del organismo y condiciones degenerativas, proveer la capacidad de vectorización y presentar propiedades adjuvantes [Naahidi et al., 2013]. En las siguientes secciones la información presentada hace referencia a NPs hechas con materiales poliméricos utilizadas para la liberación de fármacos.

2.2.3 Definición de nanopartículas

Las NPs son partículas sólidas coloidales cuyas dimensiones se encuentran entre los 10 – 1000 nm que consisten, en general, de materiales macromoleculares en donde el principio activo (fármaco o material biológicamente activo) se disuelve, entrapa o encapsula, y/o se adsorbe o une [Kreuter, 1994b].

2.2.4 Tipos de nanopartículas

Dependiendo del procedimiento de formación de NPs se puede nanoesferas o nanocápsulas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en donde el fármaco está confinado a una cavidad rodeada por una única membrana polimérica, mientras que las nanoesferas son un sistema matricial en donde el fármaco se encuentra disperso por todo el cuerpo de la partícula (Figura 2) [Couvreur, Couarraze, Devissaguet, Puisieux, 1996].



Figura 2. Tipos de nanopartículas.

2.2.5 Métodos de formación de nanopartículas

Existen varios métodos de preparación de NPs poliméricas, en general se pueden clasificar en dos categorías dependiendo si la formación requiere una reacción de polimerización o si se obtienen directamente de macromoléculas o polímeros preformados [Couvreur, Couarraze, Devissaguet, Puisieux, 1996]. Al preparar NPs a partir de reacciones de polimerización una de las principales desventajas son los meticulosos procesos de purificación que conllevan después de su formación con el fin de separar las partículas coloidales de compuestos residuales del proceso de polimerización potencialmente tóxicos (monómeros, oligómeros o surfactantes). Por lo tanto, con el fin de evitar dichas complicaciones, los polímeros preformados representan una mejor opción para la formación de NPs [Reis, Neufel, Ribeiro y Veiga, 2006].

Existen varios métodos para la formación de NPs a partir de polímeros preformados, entre los más comunes se encuentran:

- 1) Desplazamiento de disolvente
- 2) Emulsificación difusión de disolvente
- 3) Emulsificación evaporación de disolvente
- 4) Salting-out

Estos métodos tienen en común que las NPs se forman a partir de soluciones orgánicas conteniendo el fármaco y el polímero que las constituye, el uso de soluciones acuosas con estabilizantes como medio de dispersión de la suspensión coloidal y la baja eficiencia de encapsulamiento de fármacos hidrofílicos o moderadamente solubles en agua en comparación con altos porcentajes de encapsulación que pueden lograrse con fármacos hidrofóbicos (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de las metodologías más comunes para la formación de NPs con polímeros preformados [Quintanar-Guerrero, Alléman, Fesi y Doelker, 1998; Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga; 2006].

	Tipo de disolvente	Estabilizante	Agitación	Mecanismo de formación	Eliminación de solvente
Desplazamiento de disolvente	Miscible en agua	Opcional	No necesaria a ligera	Turbulencia interfacial	Presión reducida
Emulsificación difusión de disolvente	Parcialmente soluble en agua	Indispensable	Vigorosa	Emulsificación espontánea	Presión reducida
Emulsificación evaporación de disolvente	Inmiscible en agua	Indispensable	Homogenización	Precipitación del polímero	Incremento de la temperatura, presión reducida o agitación
Salting-out	Miscible en agua	Indispensable	Vigorosa	Precipitación salina	Filtración de flujo cruzado

2.2.5.1 Desplazamiento de disolvente

La técnica de nanoprecipitación o el método de desplazamiento de disolvente es un método rápido y fácil de formación de NPs, que implica la precipitación instantánea de un polímero a partir de una solución orgánica por difusión del solvente al medio acuoso. El método involucra el uso de dos disolventes mutuamente miscibles: uno de ellos debe ser solvente del polímero y del fármaco (fase orgánica) y el otro debe ser no solvente de estos, generalmente agua. El polímero es disuelto en el solvente orgánico y de esta manera es inyectado a una solución acuosa (no solvente), tan pronto la fase orgánica que contiene al polímero entra en contacto con la fase acuosa, el solvente difunde rápidamente hacia el medio de dispersión acuoso provocando la precipitación del polímero en la interfase agua-solvente involucrando la encapsulación del fármaco. La adición progresiva de la solución orgánica con el polímero disuelto hacia la fase acuosa y la posterior eliminación del solvente por presión reducida da como resultado la formación de nanoesferas con tallas entre los 100 nm y 300 nm con baja dispersión de su tamaño (Figura 3).

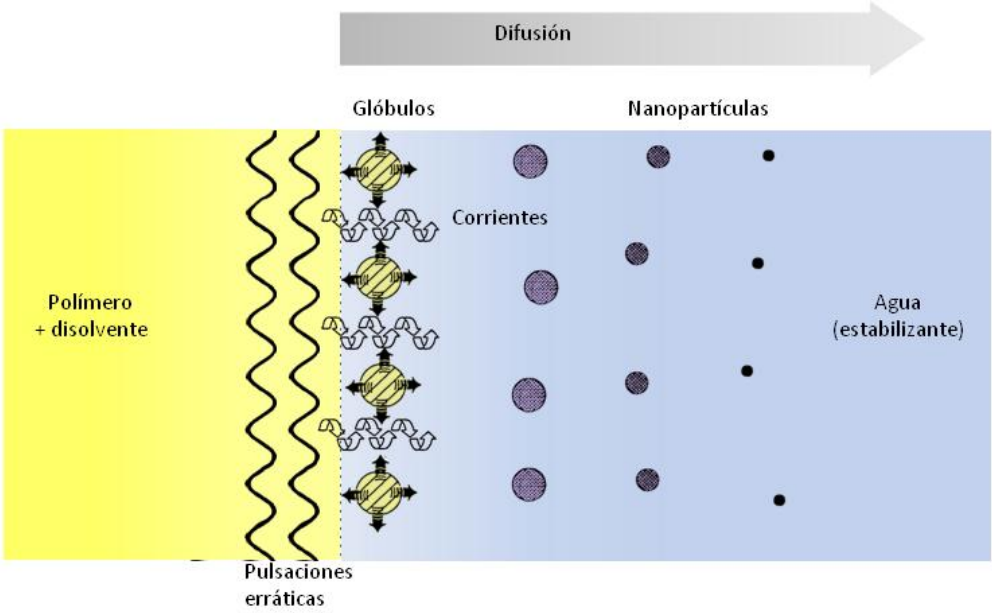


Figura 3. Preparación de NPs por el método de desplazamiento de disolvente [modificado de , Neufeld, Ribeiro y Veiga, 2006].

Aunque la formación de las nanoesferas es instantánea con el uso de estabilizantes, la aplicación de una ligera agitación/sonicación o temperaturas moderadas es posible para mejorar las características del sistema. [Bilati, Allemann y Doelker 2005; Quintanar-Guerrero, Alléman, Fesi y Doelker, 1998; Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga; 2006].

La formación instantánea de la suspensión coloidal está gobernada por el llamado efecto Marangoni, el cual se debe a la turbulencia interfacial formada entre la fase orgánica y la fase acuosa como resultado de la suma de complejos fenómenos de flujo, difusión y variaciones de la tensión superficial [Bilati, Allemann y Doelker, 2005]. La turbulencia interfacial es causada por la disminución localizada de la tensión interfacial en donde la fase orgánica experimenta rápidas y erráticas pulsaciones "kicks", siendo cada una de ellas rápidamente detenidas por la resistencia del medio; la energía necesaria para causar dichos movimientos erráticos proviene de la energía liberada por el solvente al redistribuirse en un nuevo estado de equilibrio.

Aunque la elección del sistema fármaco/polímero/solvente/no solvente para la formación de NPs con un encapsulamiento eficiente del fármaco no es sencilla, debido a la dificultad de encontrar un solvente y no solvente del polímero que sean mutuamente miscibles; el método de desplazamiento de disolvente representa una opción fácil y útil para la preparación de NPs. Sin embargo su uso se limita al empleo de solventes miscibles en agua cuya velocidad de difusión es suficiente como para emulsificar espontáneamente (e.g. etanol o acetona). No obstante el método es ampliamente utilizado para la encapsulación de fármacos lipofílicos debido a la miscibilidad de los solventes con agua.



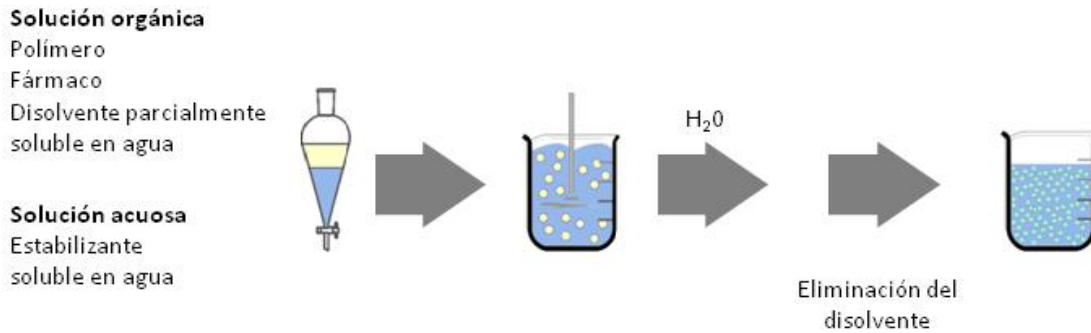


Figura 5. Preparación de NPs por el método emulsión/difusión disolvente [modificado de Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga, 2006].

Entre las diferentes variables que afectan el tamaño de partícula se encuentra la concentración de polímero y la cantidad de estabilizante [Quintanar-Guerrero, Alléman, Fesi y Doelker, 1998; Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga; 2006].

Este método presenta muchas ventajas como altos porcentajes de encapsulación (mayor del 70 %), no hay necesidad de homogeneización, alta reproducibilidad lote tras lote, fácil escalamiento, simplicidad, uso de solventes orgánicos de uso farmacéutico, altos rendimiento de formación y obtención de NPs con tallas de partícula con una baja dispersión y una alta eficiencia de encapsulamiento de fármacos lipofílicos. Sin embargo como todo método presenta desventajas, las principales son las grandes cantidades de agua que deben ser eliminadas después de la obtención de la suspensión coloidal, así como la baja eficiencia de encapsulamiento de fármacos solubles en agua debido a su fuga hacia la fase externa acuosa saturada [Quintanar-Guerrero, Alléman, Fesi y Doelker, 1998; Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga; 2006].

2.2.5.3 Emulsificación evaporación de disolvente

El método de emulsificación evaporación de disolvente tiene dos etapas: la primera etapa consiste en la emulsificación de la solución conteniendo al polímero en una fase externa acuosa y en la segunda etapa el solvente del polímero es evaporado, induciendo la precipitación del polímero para la formación de las nanoesferas [Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga; 2006].

En la primera etapa el polímero y el fármaco son solubilizados en un solvente orgánico inmiscible en agua, solución que posteriormente es emulsificada en una solución acuosa conteniendo agentes estabilizantes. La emulsión resultante es sometida un proceso de homogeneización de alta energía, ya sea con el uso de molinos coloidales, homogeneizadores, aparatos de ultrasonificación; siendo el paso determinante para la reducción del tamaño del glóbulo a tamaños nanométricos. Posteriormente, el solvente es evaporado por medio del incremento de la temperatura bajo presión reducida o agitación continua, dando como resultado la precipitación del polímero concomitante a

la formación de nanoesferas en donde el fármaco se encuentra molecularmente disperso en la red de la matriz polimérica (Figura 6).

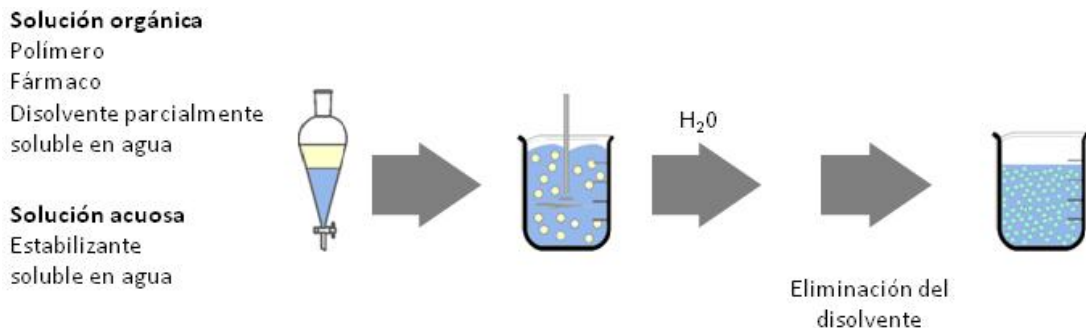


Figura 6. Preparación de NPs por el método emulsión/evaporación de disolvente [Modificado de Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga, 2006].

La talla de las partículas puede ser controlada ajustando la velocidad de agitación, el tipo y la cantidad de agente estabilizante, la viscosidad de las fases orgánica y acuosa, así como la temperatura [Quintanar-Guerrero, Alléman, Fesi y Doelker, 1998; Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga; 2006].

Dentro de las limitaciones del método se encuentran su aplicación casi exclusiva a fármacos liposolubles y dificultad de escalamiento debido al gran requerimiento energético en la etapa de homogeneización, así como la gran polidispersidad de las NPs [Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga; 2006].

2.2.5.4 Salting-out

El método de salting-out se basa en la separación de un solvente miscible en agua a partir de una solución acuosa por medio del efecto de precipitación salina (salting-out), siendo considerado como una modificación del método de emulsificación desplazamiento de disolvente. En este método el polímero y el fármaco son disueltos en el disolvente y es emulsificado bajo agitación vigorosa en una solución acuosa conteniendo el agente salino precipitante (electrolítico o no electrolítico) y el estabilizante. Posteriormente al diluirse en una cantidad suficiente de agua, la difusión del solvente orgánico hacia la fase acuosa induce la formación de las nanoesferas debido a la turbulencia interfacial generada y el agente precipitante se elimina por medio de filtración de flujo cruzado. El tamaño de las partículas obtenidas se puede ver influenciado por el agente estabilizante, velocidad de agitación y concentración del polímero (Figura 7) [Quintanar-Guerrero, Alléman, Fesi y Doelker, 1998; Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga; 2006].

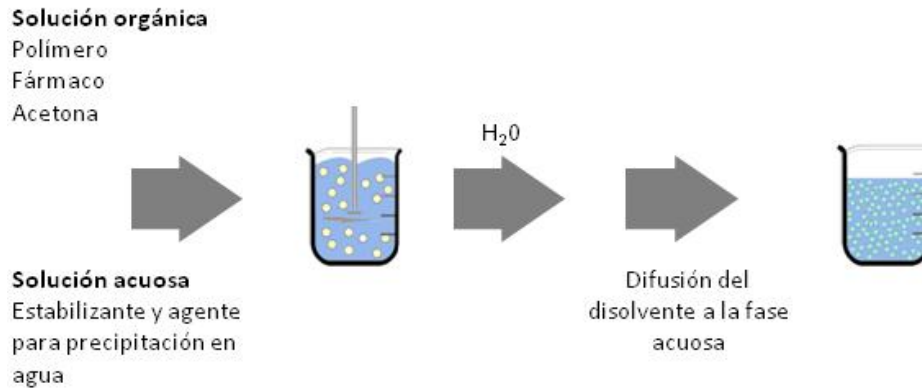


Figura 7. Preparación de NPs por el método salting-out [modificado de Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga, 2006].

La gran ventaja de este método se encuentran durante la encapsulación de proteínas terapéuticas, ya que el estrés producido para su encapsulación es mínimo y el método no involucra un aumento de temperatura; además presenta altos rendimientos de formación y encapsulación y fácil escalamiento. Entre las desventajas del método se encuentra su aplicación casi exclusiva a fármacos lipofílicos, dificultad de encontrar agentes precipitantes que permitan la separación de fase sin precipitación previa y agentes estabilizantes compatibles con soluciones acuosas saturadas sin coacervar en presencia de solvente; así como los muchos pasos de purificación de las partículas que se requieren [Quintanar-Guerrero, Alléman, Fesi y Doelker, 1998; Reis, Neufeld, Ribeiro y Veiga; 2006].

2.2.6 Caracterización de nanopartículas

Para determinar propiedades de las NPs desarrolladas estas deben someterse a una serie de pruebas para poder ser descritas (caracterización fisicoquímica), conocer su capacidad (análisis de carga del fármaco), demostrar su desempeño (liberación del fármaco), entre otras [Kreuter, 2007]. Existe un gran número de métodos disponibles para la caracterización de NPs tales como: el método de dispersión dinámica de la luz o resonancia magnética nuclear para determinar la talla, calorimetría diferencial de barrido o difracción de rayos X para la determinación de su interior, etc; a continuación se describen las características y metodologías más comunes.

2.2.6.1 Tamaño de partícula.

Uno de los métodos de mayor uso para la determinación de la talla de partículas nanométricas es la dispersión dinámica de la luz, también conocida como espectroscopia de correlación fotónica o dispersión de la luz cuasi-elástica. Esta técnica analiza la dependencia con el tiempo de las fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada por partículas en disolución bajo movimiento

browniano. Las variaciones de la luz dispersa se cuantifica por medio de su compilación en una función de autocorrelación, la cual se ajusta a una ecuación exponencial o alguna combinación o modificación de la misma, que decae exponencialmente hacia una constante; el valor de esa constante está relacionada con el coeficiente de difusión. Bajo la suposición de que se trata de partículas esféricas de baja concentración y conociendo la viscosidad del medio de suspensión, a través del coeficiente de difusión es posible determinar la talla de las partículas.

Las ventajas de este método radican en la rapidez del análisis sin necesidad de calibración y su sensibilidad para detectar partículas submicrónicas, entre sus desventajas se encuentra la necesidad de diluir la muestra, la limpieza en la preparación de la muestra, la inestabilidad matemática del procedimiento utilizado para extraer las constantes de decaimiento y la posible influencia de interacciones interparticulares [Haskell, 2006].

2.2.6.2 Morfología

La microscopía electrónica de barrido es un método utilizado para examinar la morfología de las NPs obtenidas y comprobar el tamaño obtenido por otros métodos analíticos (e.g. dispersión dinámica de la luz). La técnica requiere una muestra de NPs en seco la cual es recubierta superficialmente con un agente de contraste, un material conductor generalmente oro o paladio, al alto vacío.

2.2.6.3 Potencial zeta

La determinación del potencial zeta de una partícula en solución es utilizada para determinar su carga superficial y sirve como un parámetro importante para caracterizar las interacciones electrostáticas entre las partículas. El potencial zeta es determinado generalmente a través de la técnica de microelectroforesis en donde se le da seguimiento al movimiento de las partículas individuales bajo la influencia de un campo eléctrico conocido. El potencial zeta puede ser calculado de la velocidad electroforética de las partículas utilizando la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski.

2.2.6.4 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido es utilizada para determinar la naturaleza y forma cristalina dentro de las NPs a través de la medición de la temperatura de transición vítrea y temperatura de fusión y sus entalpías asociadas [Haskell, 2006].

2.2.6.5 Control de la liberación del fármaco (mecanismos de liberación)

La forma en que un SLC controla la liberación del fármaco puede describirse a través de un modelo cinético obtenido a partir de una prueba de disolución *in vitro*, en donde el perfil de disolución del SLC puede representarse por medio de una función (ft) dependiente del tiempo (t), relacionada a la cantidad del fármaco disuelto/liberado del SLC [Costa y Sousa Lobo, 2001; Dash, et al., 2010].

Bioadhesión (Mucoadhesión)

2.3.1 Definición

La bioadhesión se define como el estado en el cual dos materiales, en el que al menos uno de ellos es de naturaleza biológica, se mantienen unidos por un prolongado lapso de tiempo por fuerzas interfaciales. Esta superficie biológica puede tratarse de una superficie epitelial o una superficie mucosa; se refiere a mucoadhesión cuando la unión se realiza sobre el *mucus* o una membrana mucosa [Ahuja, Khar, Ali, 1997; Smart, 2005].

2.3.2 Membrana mucosa

Las membranas mucosas son las superficies húmedas que recubren las paredes de las cavidades del cuerpo. Estas consisten de una capa de tejido conectivo (lamina propia) por arriba de la cual se encuentra una capa de epitelio (puede ser monoestratificado o multiestratificado), humedecida en su superficie por una capa de *mucus* (Figura 8) [Smart, 2005].

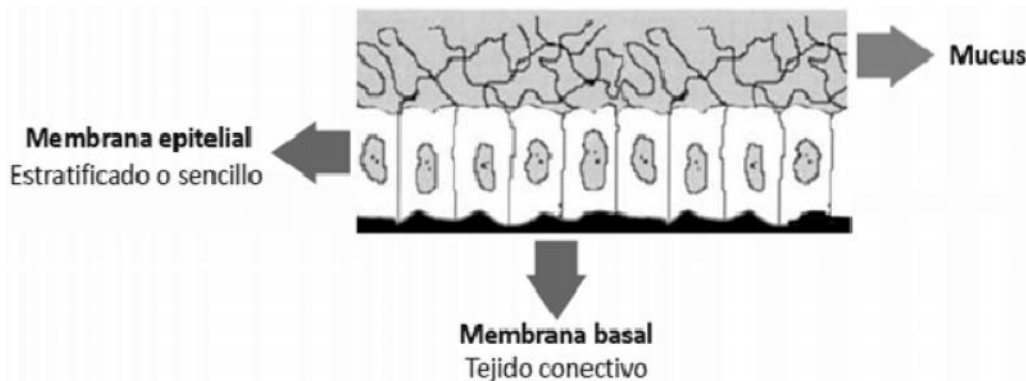


Figura 8. Composición de la membrana mucosa [Smart, 2005].

2.3.2.1 *Mucus*

La capa de *mucus* es una capa continua delgada de gel adherida a la superficie del epitelio de las membranas mucosas formada por la secreción viscosa y translúcida de las células cáliz, células especializadas secretoras de *mucus* o por glándulas especializadas adyacentes al tejido [Ahuja, Khar, Ali, 1997]. Esta capa gelosa presenta un grosor heterogéneo que va desde los 5 a 50 μm hasta los 200 a 450 μm con un promedio de 80 μm ; sus funciones van desde la protección contra compuestos químicos, virus y bacterias, como barrera de difusión de moléculas para evitar su absorción, hasta la adhesión y lubricación de las mucosas [Ahuja, Khar, Ali, 1997; Duchene, Tocuchar, Peppas, 1988].

El *mucus* está compuesto por glicoproteínas, proteínas, lípidos, sales y minerales, etc. en la siguiente proporción: 95 % agua, 0.5 a 5 % glicoproteína y lípidos, 1 % sales minerales y 0.5 a 1 % proteína libre. De entre sus componentes las glicoproteínas son las responsables de la viscosidad y propiedades adhesivas y cohesivas del *mucus*, cuya consistencia gelosa se debe a sus interacciones intermoleculares [Ahuja, Khar, Ali, 1997; Duchene, Tocuchar, Peppas, 1988].

2.3.2.2 Mucina

Las mucinas son glicoproteínas extracelulares las cuales dependiendo de sus características estructurales y el estado en el organismo, se pueden clasificar en aquellas que son secretadas y aquellas que se encuentran unidas a la membrana celular. En el *mucus* se encuentran aquellas mucinas secretadas por las células cáliz o glándulas especializadas, también llamadas glicoproteínas del *mucus*, cuya función es proporcionar las características de protección, lubricación e hidratación del *mucus*; sin embargo también se les ha relacionado con procesos biológicos como renovación epitelial, diferenciación, señalización celular y adhesión celular [Andrianifahanana, Moniaux y Batra, 2006].

En general las mucinas están formadas por un centro proteico “apomucina” al cual se encuentran unidas lateralmente una gran cantidad de cadenas de oligosacáridos (Figura 9) [Ahuja, Khar, Ali, 1997; Duchene, Tocuchar, Peppas, 1988, Rouseel, 1988]. Las mucinas tienen un tamaño que va de los 2×10^6 a 14×10^6 Daltons, del cual entre el 70 al 90 % está constituido por el peso total de las cadenas laterales con una relación aproximadamente de una cadena de carbohidratos por cada cuatro residuos de aminoácidos de la cadena central. Las regiones que no contienen cadenas laterales (región desnuda) comprenden el 25 % del polipeptido, siendo una zona susceptible a la actividad enzimática y susceptible a la formación de uniones intramoleculares [Rodríguez, Cerezo, Salem, 2000].

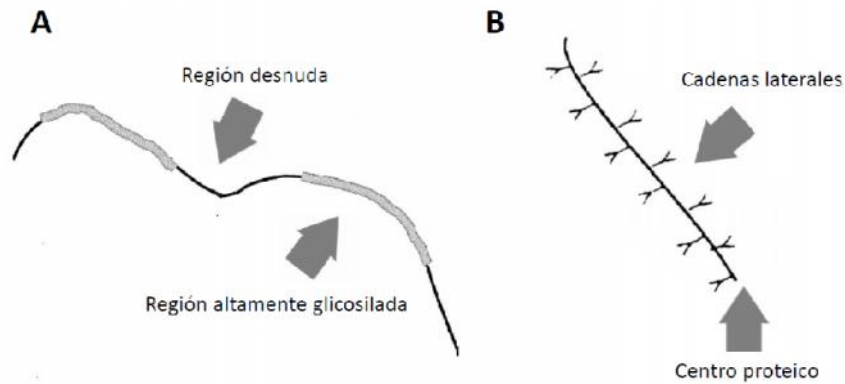


Figura 9. Mucina, representación esquemática [Ahuja, Khar, Ali, 1997] A) Distribución de las regiones desnudas y altamente glicosiladas B) Regiones glicosiladas, indicando el centro proteico y las cadenas laterales.

El centro proteico “apomucina” consta de una cadena polipeptídica de aproximadamente 800 aminoácidos, rica en treonina, serina, prolina que representan el 60 % de los aminoácidos totales, así como la presencia de glicina y alanina (Figura 10). Mientras que las cadenas laterales de oligosacáridos tienen un tamaño de entre 8 a 10 unidades [Ahuja, Khar, Ali, 1997] y una composición que está dada por las diversas combinaciones de galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, L-fucosa y ácido siálico, con estos dos últimos monosacáridos como unidad terminal (Figura 11). Que el ácido siálico (pka 2.6) sea un residuo terminal de las cadenas de oligosacáridos confiere una de las principales características de la mucina, su comportamiento como polielectrolito de carga negativa entre un pH neutro y mayor a 2.8. [Duchene, Tocuchar, Peppas, 1988].

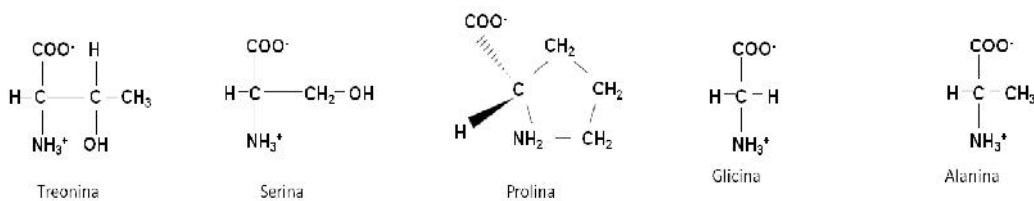


Figura 10. Aminoácidos presentes en mayor proporción en la cadena central de la mucina

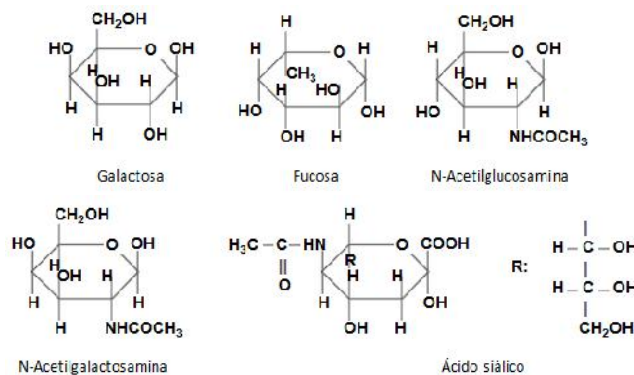


Figura 11. Carbohidratos formadores de los oligosacáridos de la mucina.

Estas cadenas laterales le confieren a las moléculas de mucina una estructura elongada y rígida y contribuyen a las propiedades reológicas/viscoelásticas del *mucus* [Andrianifahanana, Moniaux y Batra, 2006]. Las regiones altamente glicosiladas presentan un gran número de repeticiones en tándem ricas en serina, treonina y prolina (SerThrPro); es precisamente con los residuos de treonina y serina, a través de uniones o-glicosídicas, con los que se establece la unión entre las cadenas de oligosacáridos y la cadena central [Andrianifahanana, Moniaux y Batra, 2006; Bansil y Turner 2006; Duchene, Tocuchar, Peppas, 1988; Rodríguez, Cerezo, Salem, 2000].

Por otro lado, las mucinas poseen regiones ricas en cisteína las cuales están involucradas en la dimerización por la formación de puentes disulfuro a través de la región C-terminal o en aglomerados macromoleculares por interacciones intermoleculares. Estas interacciones permiten formar una red polimérica debido a su unión física estabilizada por interacciones electrostáticas, resultando en la consistencia gelosa tan característica del *mucus* [Bansil y Turner 2006; Duchene, Tocuchar, Peppas, 1988].

Bajo condiciones fisiológicas normales la producción de mucina se mantiene en óptimas condiciones con un patrón de expresión bien definido en cuanto al tejido, tiempo y distribución. El estado de homeostasis de las mucinas puede perderse debido a cambios ambientales y/o factores intrínsecos (modificaciones epigenéticas) que afecten la integridad celular por consecuencia de un estado patológico como cáncer o procesos inflamatorios, los cuales están asociados a la desregulación de la producción de mucinas [Andrianifahanana, Moniaux y Batra, 2006].

2.3.3 Teorías de mucoadhesión

El fenómeno de bioadhesión sobre las superficies mucosas ha tratado de ser explicado por diversas teorías, de las cuales todas son válidas ya que cada una de ellas explica el fenómeno con base a las diferentes características y propiedades de los diversos materiales con capacidad de interaccionar con la superficie mucosa. Debido a la complejidad de la interacción, no existe una única teoría que englobe todas las interacciones implicadas para explicar el mecanismo de mucoadhesión; sin embargo existen seis teorías reconocidas que tratan de definir el fenómeno de manera general [Smart, 2005]:

- Teoría electrónica
- Teoría de humectación
- Teoría de adsorción

- Teoría de difusión
- Teoría mecánica
- Teoría de fractura

2.3.3.1 Teoría mecánica

La teoría asume que la adhesión se debe al anclaje del material adhesivo en las grietas, poros y oquedades superficiales que proveen un aumento en el área de contacto y múltiples sitios de anclaje [Ahuja, Khar, Ali, 1997; Smart, 2005]. En el caso de materiales sólidos, el hinchamiento al contacto con la superficie húmeda es necesario para que sus moléculas tengan la suficiente libertad para anclarse. La hidratación del material resulta en la relajación o contracción, entrelazamiento o enrollamiento de sus moléculas causando la disociación de las interacciones intramoleculares, liberando y poniendo al descubierto grupos funcionales con potencial para la formación de uniones adhesivas y favoreciendo la interdifusión de las cadenas poliméricas. Es decir, las interacciones intramoleculares e intermoleculares incrementan la movilidad de las macromoléculas y facilita su penetración en las fracturas de la superficie [Duchene, Tocuchar, Peppas, 1988].

2.3.3.2 Teoría de humectación

Esta teoría explica principalmente la mucoadhesión de sistemas líquidos o de baja viscosidad, en la cual la adhesión se describe en términos de la habilidad del líquido de expandirse sobre el sistema biológico, considerando la energía de superficie y energías interfaciales. La capacidad del líquido de extenderse espontáneamente sobre una superficie es un requisito para que haya adhesión [Smart, 2005; Ahuja, Khar, Ali, 1997; Smart, 2005].

2.3.3.3 Teoría de la difusión

La teoría describe la interdifusión entre las cadenas poliméricas del material adhesivo dentro de la matriz del *mucus* a una profundidad suficiente como para crear uniones adhesivas semipermanentes. La profundidad de la interpenetración de las moléculas depende del coeficiente de difusión y del tiempo de contacto a través de la interfase adhesiva, el cual a su vez, está en función del peso molecular. Este proceso es conducido por un gradiente de concentración y se ve afectado por la disponibilidad de la longitud de las moléculas y sus residuos expuestos [Ahuja, Khar, Ali, 1997; Smart, 2005].

2.3.3.4 Teoría de la adsorción

De acuerdo a esta teoría después del contacto inicial entre dos superficies los materiales se adhieren debido a las fuerzas ejercidas entre los átomos de estas, distinguiéndose distintas fuerzas de unión secundarias tales como [Duchene, Touchard, Peppas, 1988]:

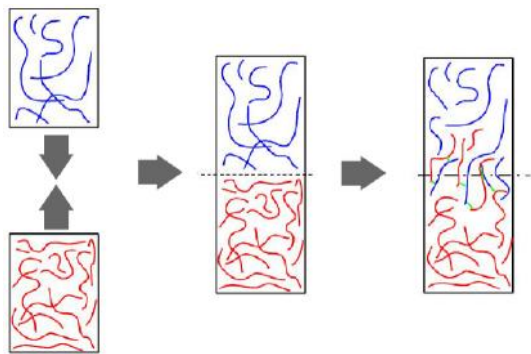
- Fuerzas electrostáticas: atracción debido a fuerzas coulombicas entre moléculas de carga opuesta
- Fuerzas de van der Waals: atracción entre moléculas sin carga por efecto de sus polaridades debido a la orientación de dipolos permanentes, dipolos inducidos o cambios en la distribución de cargas, forzando a las moléculas a adquirir una carga instantánea.
- Puentes de hidrógeno: asociación entre un átomo de hidrógeno de un grupo funcional en una molécula con un átomo de un grupo funcional de otra molécula.
- Interacciones hidrofóbicas: asociación de grupos no polares entre sí en solución acuosa debido a la tendencia de las moléculas de agua a excluir moléculas de polaridad diferente.

2.3.3.5 Teoría electrónica

La teoría electrónica sugiere que durante el contacto entre un material mucoadhesivo y la red de glicoproteínas del *mucus* ocurre una transferencia de electrones por diferencias en su estructura electrónica, resultando en la formación de una doble capa eléctrica en la interfase y la subsecuente adhesión por atracción a lo largo de la doble capa [Smart, 2005; Ahuja, Khar, Ali, 1997].

2.3.3.6 Teoría de la fractura

En esta teoría la fuerza de adhesión se relaciona con la fuerza necesaria para despegar las dos superficies involucradas, asumiendo que el rompimiento de la interacción adhesiva ocurre en la interfase. La ruptura generalmente ocurre en el punto más débil del sistema, es decir, en alguna de las superficies involucradas debido a la falta de cohesión entre sus moléculas. La teoría trata de relacionar la resistencia de dos superficies a separarse después de su adhesión, en donde la fuerza de fractura es equivalente a la fuerza de adhesión [Ahuja, Khar, Ali, 1997; Smart, 2005].



porcentaje de entrecruzamiento disminuye movilidad), pH del medio (ionización del polímero), fisiología del sitio de acción y condición médica [Ahuja, Khar, Ali, 1997].

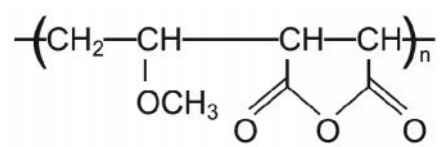
2.3.5 Polímeros mucoadhesivos

Se denomina polímeros mucoadhesivos a aquellos capaces de establecer interacciones con la superficie mucosa por un tiempo prolongado en las condiciones apropiadas. Entiéndase por condiciones apropiadas a las características químicas y estructurales del polímero, así como a los factores del medio (e.g. pH) en que se lleva a cabo la interacción [Ahuja, Khar, Ali, 1997; Smart, 2005; Rodríguez, Cerezo y Salem, 2000].

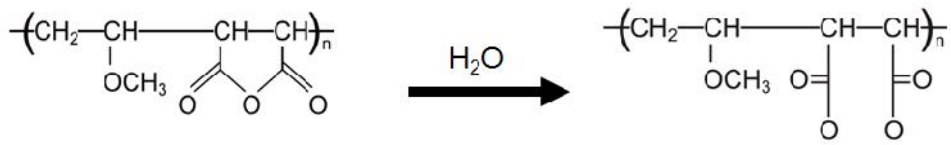
Se han identificado varias propiedades comunes en los polímeros capaces de interactuar con la superficie mucosa como lo son su hidrofilia, carga negativa, presencia de grupos formadores de puentes de hidrógeno, energía libre de superficie, etc [Ahuja, Khar, Ali, 1997; Andrews, Laverty, Jones, 2009].

En general los polímeros mucoadhesivos pueden dividirse en:

1. Polímeros hidrofílicos que en su estructura contienen numerosos grupos capaces de formar puentes de hidrógeno, como grupos hidroxilo, carboxilo o amino. En presencia de agua estos polímeros “se activan” adhiriéndose a superficies no específicas, una vez que se humectan presentan una gran adhesión a superficies secas inertes, en comparación con aquellas superficies húmedas (*mucus*). La unión adhesiva formada tiende a aumentar después de que el agua se elimina en su totalidad. Otras características generales de este tipo de polímeros es su limitada solubilidad en solventes, sensibles al pH y de alta viscosidad al estar en solución a bajas concentraciones.
2. Polímeros que se adhieren a través de interacciones no específicas no covalentes, cuya unión se debe principalmente a interacciones electrostáticas (aunque las uniones tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas también son significativas). Estos pueden dividirse en: polímeros aniónicos, catiónicos y no-iónicos; de entre los cuales los polímeros aniónicos y catiónicos presentan las mayores fuerzas de adhesión. La principal desventaja de estos polímeros es que la adhesión puede ocurrir en cualquier otro sitio que el intencionado.
3. Polímeros que se unen a sitios con receptores específicos en la superficie celular, lo cual los hace menos susceptibles a la renovación del *mucus*, uniéndose directamente a la superficie mucosa; una mejor descripción de este tipo de polímeros sería “citoadhesivos”.



Característica	Valor
Estado físico	Polvo blanco
Viscosidad CP a 25 °C	15 (15 %) /35 (10 %)
Tg °C	152
Gravedad específica 22 a 25 °C	1.018 (5 %)



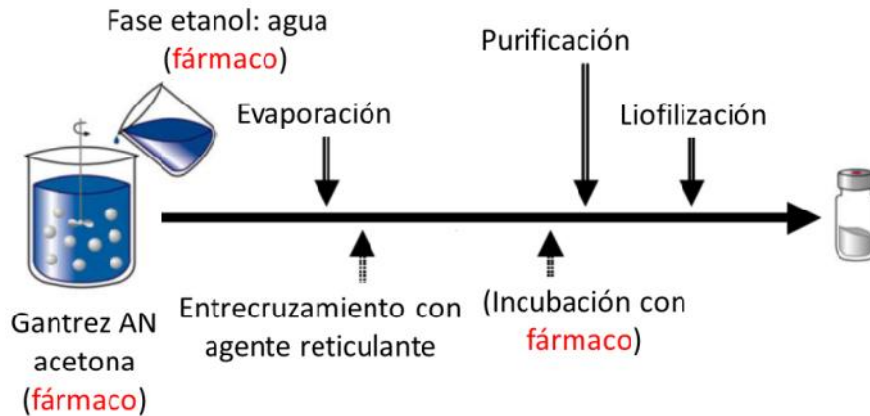


Figura 15. Ilustración del proceso de preparación de NPs PVM-MA. [Modificado de Irache et al., 2005].

Las NPs son capaces de retener la sustancia activa gracias a:

1. fenómenos de disolución o encapsulación dentro de la estructura molecular o matriz
2. adsorción mediada por enlaces débiles

El primer caso ocurre por interacción entre el fármaco y el polímero cuando estos se encuentran en solución, y al desolvatar el polímero, el fármaco se encapsula dentro de la matriz de las NPs formadas (nanoprecipitación); mientras que en el segundo caso, después de la formación de las NPs el fármaco se fija a su superficie mediante su incubación con una solución acuosa del fármaco [Arbós et al., Instituto Científico y Tecnológico de Navarra, S.A., 2004].

2.4.3 Ventajas

Del método propuesto por Arbós et al. (2002) se obtienen poblaciones homogéneas de NPs, en las cuales una porción del fármaco está atrapado y otra adsorbida a la superficie de la nanoesfera [Arbós et al., Instituto Científico y Tecnológico de Navarra, S.A., 2004]. El tamaño de las NPs se encuentra alrededor de los 100 nm, lo que favorece su distribución, mejora el transporte de sustancias activas hasta su lugar de acción e incrementa la penetración en las células deseadas. Además, estas NPs presentan una superficie altamente reactiva y de fácil interacción permitiendo la modificación de la superficie de las partículas para modificar sus propiedades fisicoquímicas (potencial zeta), vectorización (unión a ligandos específicos a un sitio de acción) o interacción con moléculas biológicas (mucinas) [Arbós et al., 2002; Arbós et al., 2003; Irache et al., 2005].

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Justificación

Tomando en cuenta las características del sitio de acción (cérvix), así como las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas del GA en el tratamiento de las lesiones precancerígenas por infecciones por VPH, se pretendió desarrollar un SLC de GA capaz de incrementar el tiempo de residencia, localizando la liberación del fármaco en la mucosa cervical. Para ello se eligió utilizar NPs/PVM-MA, cuyas propiedades bioadhesivas pudieran favorecer la localización del sistema en el sitio de acción, ofreciendo un control espacial en la liberación.

Hipótesis

La inclusión del GA en las NPs/PVM-MA favorecerá su interacción con la mucosa cérvico uterina, controlando la liberación espacial del fármaco, retardando la eliminación y prolongando el tiempo de residencia, y por tanto mejorando el efecto terapéutico.

Objetivos

El principal objetivo fue desarrollar NPs/PVM-MA como SLC de GA para el tratamiento de las lesiones precancerosas del cuello del útero debido a infecciones por el VPH.

Como objetivos particulares se propusieron los siguientes:

- Cargar las NPs/PVM-MA con GA y determinar los factores que influyen.
- Aumentar la cantidad de GA que puede cargarse en las NPs PVM-MA.
- Desarrollar y validar un método analítico basado en la cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) para la cuantificación del contenido de GA en las NPs/PVM-MA.
- Caracterizar fisicoquímicamente las NPs/PVM-MA/GA: talla, carga superficial, morfología, rendimiento de formación y análisis térmico.
- Realizar el estudio de bioadhesión de las NPs/PVM-MA/GA considerando las condiciones fisiológicas de la enfermedad.
- Evaluar la actividad farmacológica de las NPs/PVM-MA/GA sobre cultivos de células HeLa.
- Proponer un mecanismo de acción del efecto citotóxico de las NPs/PVM-MA/GA sobre cultivos de células HeLa a partir de la evaluación del GA como agente promotor de la apoptosis.

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

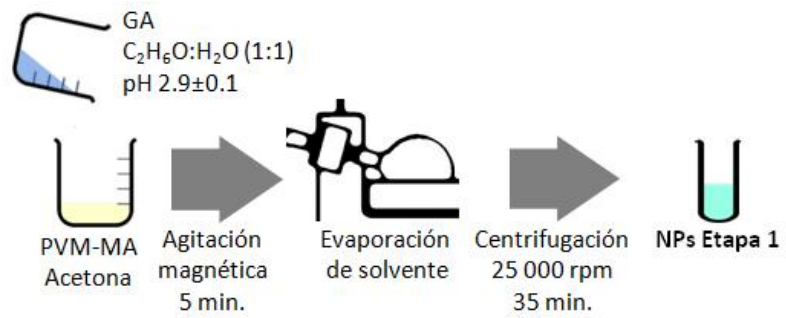
Preparación de las NPs/PVM-MA/GA

El método desarrollado se basó en aquel descrito por Arbós et al. (2002) para la fabricación de NPs/PVM-MA, el cual fue modificado y adaptado para encapsular (Etapa 1) y adsorber GA (Etapa 2) y así obtener NPs/PVM-MA/GA.

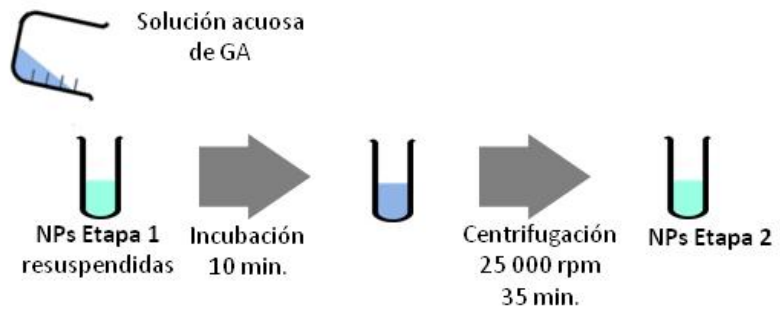
Etapa 1 (encapsulación de GA): Se preparó la fase acuosa formando una mezcla de alcohol y agua acidificada con ácido clorhídrico hasta un pH de 2.9 (1:1). Posteriormente se pesó aproximadamente 20 mg de GA, siendo disuelto en 10 mL de la fase acuosa. Por otro lado, se pesó 110 mg de PVM-MA, cantidad que fue disuelta en 5 mL de acetona (fase orgánica). Posteriormente, fue incorporada la fase acuosa en la fase orgánica, gota por gota bajo agitación magnética por 5 minutos. Para la formación de las NPs se retiraron los solventes orgánicos por medio de presión reducida durante 15 minutos. La recuperación de las NPs PVM-MA encapsulando GA (NPs Etapa 1) se llevó a cabo por ultracentrifugación a 25000 rpm por 35 minutos. El sobrenadante fue recuperado y guardado en tubos de vidrio a 4 °C por no más de 24 h.

Etapa 2 (adsorción del fármaco): Las NPs Etapa 1 fueron resuspendidas en 10 mL de una solución de GA (2 mg/mL) por 10 minutos bajo agitación magnética, para promover la adsorción del fármaco sobre las partículas. Al término, la suspensión de NPs fue centrifugada nuevamente bajo las mismas condiciones utilizadas en la etapa 1 (25000 rpm por 35 minutos), y de la misma manera, el sobrenadante obtenido fue recuperado y almacenado por separado en tubos de vidrio a 4 °C por

ETAPA 1
Encapsulamiento
del fármaco



ETAPA 2
Adsorción
del fármaco



5.2.2 Carga eléctrica superficial

La carga eléctrica superficial (potencial zeta) fue obtenida a partir de la determinación de la movilidad electroforética de las NPs. De las NPs resuspendidas en agua desionizada se tomó una muestra y se colocó en una celda con sistema micro-electroforético; a la cual se le hizo pasar una corriente eléctrica de 150 mV a una temperatura de 25° C. La movilidad electroforética fue obtenida midiendo la velocidad con la que migran las partículas hacia el electrodo de carga opuesta, haciendo uso de la ecuación de Henry y la aproximación de Smoluchowski. La medición fue determinada por triplicado.

5.2.3 Morfología

La morfología de las partículas fue examinada partir de imágenes obtenidas por la microscopía electrónica de barrido. De una suspensión de NPs se realizó una dilución, de la cual se tomó una muestra, la cual se dejó secar sobre una superficie para inmovilizarla; posteriormente fue recubierta con oro (material de contraste) y fue observada por medio del microscopio electrónico de barrido.

5.2.4 Rendimiento de formación

El rendimiento de formación de las NPs fue obtenido a través del método gravimétrico. El peso total del material resultante después de ser convertido en NPs fue determinado, después de ser liofilizado, y comparado contra los 110 mg de PVM-MA, considerando la cantidad de GA utilizado.

5.2.5 Porcentaje de encapsulamiento

La eficiencia de carga fue determinada al cuantificar el GA no asociado a las NPs etapa 1 y NPs etapa 2, que es el fármaco presente en los sobrenadantes obtenidos en la purificación de las NPs de las dos etapas de fabricación. La cantidad de GA no asociado fue obtenido por medio del método de HPTLC, previamente validado [Aguilar-Rosas, Alcalá-Alcalá, Llera Rojas y Ganem-Rondero, 2015] (Anexo 1). El resumen de los resultados de la validación del método analítico se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la validación del método analítico para la cuantificación de GA en NPs/PVM-MA por medio de la técnica de HPTLC [Aguilar-Rosas, Alcalá-Alcalá, Llera Rojas y Ganem-Rondero, 2015].

Parámetros		Resultados	
Exactitud	Recobro	100.4 %	
	IC(\bar{y})	98 -102 %	
Precisión	Repetibilidad	Promedio	3892.7 AUC
		Desviación estándar (S)	33.94
		Coeficiente de variación (CV)	0.9 %
	Precisión intermedia	Valor	580.43 ng/banda
		S	11.38
		CV	0.79 %
		Valor	1044.81 ng/banda
		S	32.45
		CV	1.31 %
		Valor	1973.53 ng/banda
		S	42.64
		CV)	1.22 %
Especificidad	La respuesta del método se debe únicamente al analito	El GA presenta una señal característica ($R_f = 0.33$ a una λ_{max} de 260 nm). La señal del analito no presenta interferencias con otros compuestos.	
Límite de detección	99.605 ng/banda		
Límite de cuantificación	292.0 ng/banda		
Linealidad	Regresión	Presenta una relación lineal	
	Pendiente (b_1)	1.821 AUC/ng	
	Ordenada en el origen (b_0)	400.725 AUC	
	Coeficiente de correlación (r)	0.998	
	Gráfico de residuales	Presenta distribución aleatoria	
Rango	374 – 2253 ng/banda		

5.2.5.1 Preparación de la solución muestra problema

Los sobrenadantes recuperados en ambas etapas del método fueron llevados a un volumen total de 50 mL. De este volumen total, se tomó una alícuota de 500 μ L y se aforó a 5 mL con alcohol metílico. La preparación del blanco se realizó de la misma manera desde la preparación de las NPs hasta las diluciones, pero sin agregar el fármaco.

5.2.5.2 Condiciones cromatográficas.

- Volumen de aplicación: 25 μ L, en forma de bandas de 10 mm
- Fase estacionaria: Placas de aluminio (5 x 10 cm) recubiertas con gel de sílice 60 (0,20 mm de espesor) con indicador de fluorescencia UV 254 nm.
- Desarrollo de placas: Cámara de elusión de vidrio.
- Fase móvil: acetato de etilo : ácido acético : metanol : agua (4:0.5:0.5:1)
- Lectura de placas: Densitometría óptica a 260 nm (max GA)

5.2.5.3 Análisis de las muestras problema

A partir de los cromatogramas resultantes de los sobrenadantes, el área de la señal cromatográfica con un Rf. de 0.33 fue obtenida e interpolada en el gráfico de linealidad (Anexo 1) para obtener la eficiencia de encapsulamiento de GA en las NPs/PVM-MA. La medición fue realizada por triplicado.

5.2.6 Análisis térmico

Con el fin de determinar el estado en el cual se encontraba el fármaco dentro del sistema se realizó el análisis térmico de las NPs/PVM-MA/GA por medio de la calorimetría diferencial de barrido. Una muestra de NPs fue colocada en charolas de aluminio no herméticas y fue sometida a una rampa de calentamiento de los 0 °C hasta los 300 °C, con un incremento de temperatura de 10 °C /min. El flujo de calor asociado a las transiciones relativas del material fue obtenido a partir del gráfico “Temperatura vs Flujo de calor”, donde se muestran los cambios térmicos característicos del material. Este mismo análisis le fue realizado al fármaco, polímero y mezcla física de ambos y los resultados fueron comparados.

Estudio de bioadhesión de las NPs/PVM-MA/GA

Las propiedades bioadhesivas de las NPs/PVM-MA/GA fueron evaluadas a través su interacción *in vitro* con mucina gástrica de cerdo [Yin et al., 2006; Yoncheva, Lizagarra e Irache, 2005].

A un lote de NPs/PVM-MA/GA se le agregó 4 mL de buffer fosfato citratos pH 3.6 ± 0.1 o pH 5 ± 0.1 y se mezcló con 1 mL de una suspensión de mucina gástrica de cerdo tipo II (5 mg/mL). La

mezcla se dejó interaccionar bajo agitación magnética por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL de dicha mezcla y se centrifugó a 17 000 rpm por 20 min. El sobrenadante fue recuperado y la mucina libre (sin interaccionar) fue cuantificada por medio del ensayo del ácido bicinconínico (Ensayo BCA): a 2 mL del reactivo de trabajo del Kit de BCA se le agregó 0.1 mL del sobrenadante obtenido (mucina libre sin interaccionar), se mezcló bajo agitación vigorosa e incubó por 2 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo la absorbancia de la mezcla fue obtenida mediante espectroscopia UV-Visible a 562 nm (Figura 17). El resultado obtenido fue interpolado en las curva de calibración correspondiente, previamente realizada. Las evaluaciones fueron hechas por triplicado.

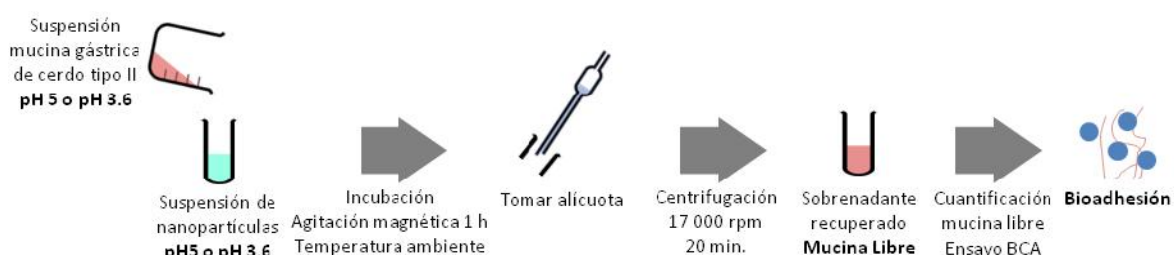


Figura 17. Metodología para el estudio de la interacción *in vitro* de las NPs/PVM-MA/GA con mucina gástrica de cerdo.

Evaluación *in vitro* del efecto de las NPs/PVM-MA/GA sobre un cultivo de células HeLa

La estrategia para el estudio del efecto farmacológico de las NPs/PVM-MA/GA fue, primeramente, determinar la IC_{50} del GA en células HeLa y proponer un mecanismo de acción (evaluación de la promoción de la apoptosis). Posteriormente, los resultados obtenidos por el GA sirvieron para comparar el efecto de las NPs/PVM-MA/GA sobre células HeLa y su capacidad para promover la apoptosis.

5.4.1 Prueba de citotoxicidad y determinación de la concentración mínima inhibitoria (IC_{50}) GA por medio de la prueba de MTT

Para demostrar el efecto citopático del GA sobre un cultivo de células HeLa, se llevó a cabo un estudio de citotoxicidad por medio de la determinación de la inhibición de crecimiento por medio de la prueba de MTT.

En una placa de 96 micropozos se sembraron células HeLa y cultivaron con medio DMEM/F12 (1:1) al 10 % de suero de ternera neonato (STN) y 100 u/mL de penicilina-estreptomicina a 37 °C, bajo una atmósfera de 95 % humedad y 5% de CO₂. A las 24 h se descartó el medio de cultivo presente en la placa multipozo y fue remplazado por 100 µL de cada una de las soluciones de GA de distintas concentraciones (ente 0.12 mM a 11.89 mM) con 8 repeticiones cada una, manteniéndolas en incubación a 37 °C y bajo una atmósfera de 95 % humedad y 5% de CO₂. Se utilizó medio DMEM/F12 (1:1) con penicilina-estreptomicina 100 u/mL sin suero como tratamiento para las células del control negativo (Figura 18).

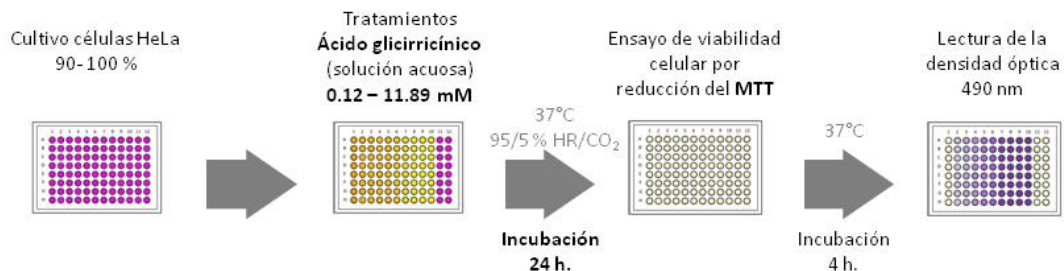


Figura 18. Metodología para la determinación de la inhibición del crecimiento por medio de la prueba del MTT.

Posterior al tratamiento con GA, se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular por reducción del MTT. Las soluciones de GA fueron descartadas de cada uno de los pozos de la placa y se estos fueron lavados con 100 µL de buffer fosfato salino (PBS) por duplicado. Se añadieron 100 µL de medio de cultivo DMEM/F12 (1:1) al 10 % de SFN y 100 u/mL penicilina-estreptomicina, sin suero y 50 µL de la solución de MTT (5 mg/mL). Se incubó la placa multipozos por 4 h a 37°C para permitir la formación de los cristales de formazan.

Posterior a las 4 h de incubación, se descartó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de DMSO a cada uno de los pozos, dejando reposar 15 minutos para permitir la disolución de los cristales de formazan y poder realizar la lectura de densidad óptica a una longitud de onda de 490 nm. Se tomó como blanco un pozo sin crecimiento celular tratado como el control negativo. El porcentaje de viabilidad celular se obtuvo tomando como referencia la absorbancia del control negativo (100 % de crecimiento).

Los datos obtenidos fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal para la determinación de la IC₅₀ de GA sobre células HeLa.

5.4.2. Estudio de la inducción de la apoptosis de células HeLa por parte del GA utilizando la tinción de Anexina V- Yoduro de propidio

La evaluación de la capacidad del GA de inducir apoptosis en cultivos de células HeLa se realizó por medio de la tinción con Anexina V – FITC.

En una placa de 16 micropozos se sembraron y cultivaron células HeLa en medio DMEM/F12 (1:1) al 90 % con SFB y 100 u/mL penicilina-estreptomicina a 37 °C y bajo una atmósfera de 95 % humedad y 5% de CO₂ por 24. A las 24 h se descartó el medio de cultivo presente en la placa multipozo y fue reemplazarlo por 100 µL de cada una de las siguientes soluciones por duplicado:

- Control positivo: Solución de doxorrubicina 1.5 µg/mL [Mizutani, et. al., 2005]
- Solución de prueba: solución IC₅₀ de GA
- Control negativo: Medio DMEM/F12 (1:1) con 100 u/mL de penicilina-estreptomicina sin suero

El tratamiento con las diferentes soluciones problema consistió en la exposición de los cultivos de células HeLa por 24 h a cada una de las soluciones, manteniendo el cultivo en incubación a 37 °C, bajo una atmósfera de 95 % humedad y 5% de CO₂.

Posterior al tratamiento, se realizó la tinción con Anexina V – FITC. El procedimiento se realizó de la siguiente manera: Se lavaron cada uno de los pozos con 200 µL de PBS por duplicado y fueron agregados 200 µL de Anexina V: FITC en buffer de unión al 2.5 %. Se dejó incubar la placa después de agregar el marcador por 10 min en la oscuridad, a temperatura ambiente. Al término del tiempo de incubación la solución fue descarta y cada uno de los pozos fue lavado con 190 µL de buffer de unión. Al retirar el buffer de unión agregado, 200 µL de una solución de yoduro de propidio en buffer de unión al 5% fue agregado a cada uno de los pozos. La microplaca fue incubada nuevamente por 10 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Al terminar los 10 min, la solución fue retirada de cada uno de los pozos.

Por último, las células se fijaron utilizado 100 µL de formaldehido al 2% e incubando durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Los cultivos celulares de los diferentes tratamientos fueron observados por medio de microscopía de fluorescencia para su análisis y evaluación (Figura 19).



Figura 19. Procedimientos para la determinación de la inducción de la apoptosis de células HeLa por parte del GA utilizando la tinción de Anexina V- Yoduro de propidio.

5.4.3 Evaluación del efecto citotóxico en células HeLa por parte de las NPs/PVM-MA/GA por medio de microscopía de fluorescencia utilizando tinción de faloidina-rodamina

El efecto de las NPs/PVM-MA/GA sobre un cultivo de células HeLa fue evaluado en función de los daños morfológicos provocados por el sistema de liberación; además, la capacidad de penetración de la NPs/PVM-MA/GA fue evaluada utilizando un marcado fluorescente (rojo nilo, RN) y microscopía confocal.

La primera etapa de la evaluación del efecto citotóxico consistió en la determinación del daño provocado al cultivo, para lo cual en una placa de 16 micropozos fueron sembradas y cultivadas células HeLa con medio DMEM/F12 (1:1) al 10 % con SFN y 100 u/mL penicilina-estreptomicina a 37 °C, bajo una atmósfera de 95 % humedad y 5% de CO₂ por 24 h. A las 24 h el medio de cultivo fue descartado y reemplazado por 100 µL de cada una de las siguientes muestras:

- Control: Medio DMEM/F12 (1:1) con 100 u/mL de penicilina-estreptomicina sin suero
- Blanco: NPs/PVM-MA (sin fármaco)
- NPs/PVM-MA/GA

Los tratamientos consistieron en la exposición de los cultivos de células HeLa por 24 h con las suspensiones de las NPs problema, manteniendo el cultivo en incubación a 37 °C y bajo una atmósfera de 95 % humedad y 5% de CO₂ (Figura 21). Después de las 24 horas de incubación, la morfología del cultivo celular fue evaluada por medio de microscopía óptica.

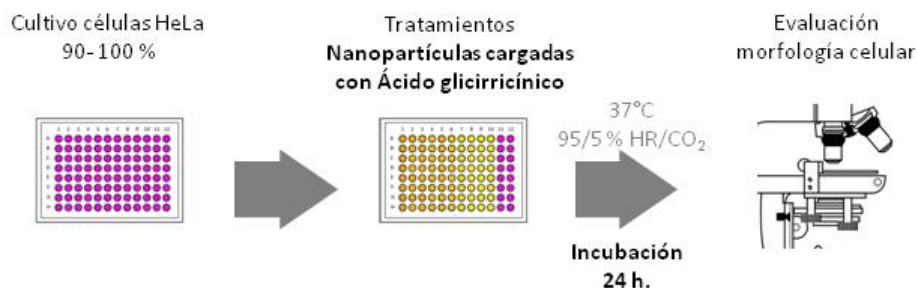


Figura 21. Estudio del efecto citotóxico de células HeLa por parte de NPs/PVM-MA/GA a partir de la evaluación de los daños al cultivo celular.

La segunda etapa consistió de la evaluación del efecto citotóxico en función de los daños provocados en la estructura celular por medio de microscopía confocal; de la misma manera, en una placa de 16 micropozos se sembraron y cultivaron células HeLa en medio DMEM/F12 (1:1) al 10 % de STN y 100 u/mL penicilina-estreptomicina a 37 °C, bajo una atmósfera de 95 % humedad y 5% de CO₂ por 24 h. A las 24 h, el medio de cultivo de la placa multipozo fue descartado y reemplazado por 100 µL de cada una de las siguientes combinaciones de las siguientes suspensiones por duplicado:

- Control Negativo: Medio DMEM/F12 (1:1) con 100 u/mL penicilina-estreptomicina sin suero
- NPs/PVM-MA/RN
- NPs/PVM-MA/GA + NPs/PVM-MA/RN

Posteriormente, la placa fue incubada a 37 °C y bajo una atmósfera de 95 % humedad y 5% de CO₂ por 24 h.

Los daños provocados a los cultivos fueron evaluados mediante el estudio de los cambios morfológicos de las células, los cuales fueron evidenciados haciendo uso de la tinción rodamina-faloidina y observados a través de microscopía confocal. Para lo cual, terminando la incubación con las suspensiones problemas los pozos con los cultivos fueron lavados con 200 µL de PBS por duplicado para poder fijar las células con 200 µL de paraformaldehído al 4 % en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Al término del periodo de incubación, las células fueron lavadas con PBS por duplicado. Posteriormente se agregó 100 µL de tritón X-100 al 0.5 % en PBS y se dejó incubar por 5 minutos con el fin de permeabilizar a la células; al término se lavó por duplicado con PBS. Se bloqueó con SFN al 1 % en PBS por 1 hora, y se volvió a lavar por duplicado con PBS. La incubación con el marcador fluorescente se llevó a cabo en la oscuridad durante 1 hora con 100 µL faloidina-rodamina, a una dilución 1 a 100 en PBS. Al término de la incubación los

cultivos se lavaron con PBS por duplicado y las células fueron montadas en laminillas con glicerol-PBS (1:1). Las muestras fueron guardadas en la oscuridad a 4 °C hasta su análisis (Figura 22).



Figura 22. Determinación de los daños provocados por parte de NPs/PVM-MA/GA en células HeLa a partir de la evaluación de la morfología celular y evaluación de su internalización.

El resumen de la metodología experimental se presenta en la Figura 23.

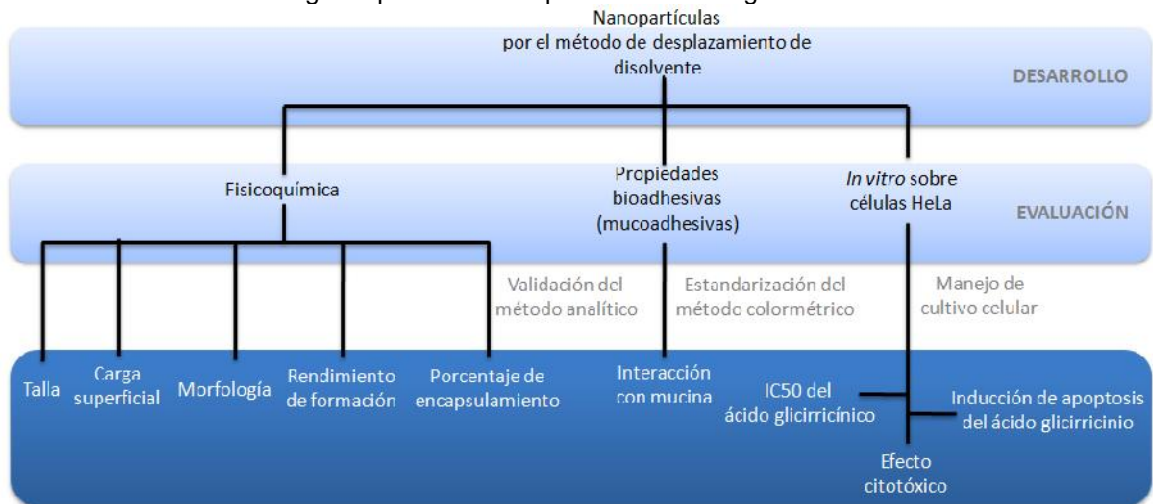


Figura 23. Estrategia para el desarrollo y evaluación de las NPs/PVM-MA/GA.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Preparación de las NPs/PVM-MA/GA

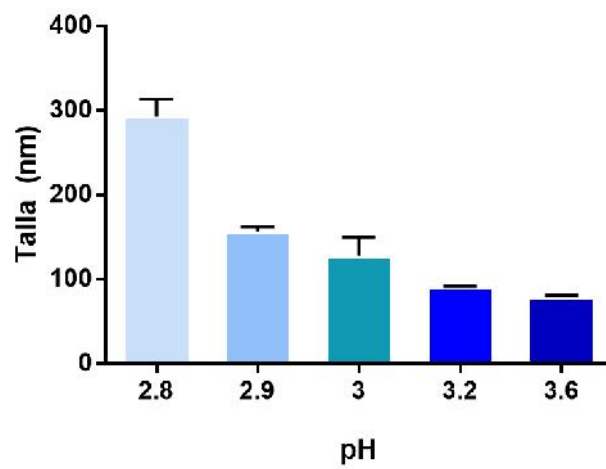
Arbós et al. (2002) propuso la formación de NPs/PVM-MA por el método de desplazamiento de disolvente, siendo el primero en proponer a dicho polímero para la formación de un sistema coloidal con potencial bioadhesivo. Debido a la facilidad en su preparación, el tipo de solventes utilizados, las características bioadhesivas del polímero empleado y flexibilidad para la incorporación de fármacos; este sistema representó las características idóneo para ser cargados de GA y ser usadas como un SLC en el tratamiento de LEI debido a infecciones por VPH.

Siguiendo el método ya propuesto, se encontró que para promover la inclusión del GA dentro de las matriz polimérica de las partículas el fármaco debía ser una molécula mucho más hidrofóbica para evitar su salida hacia la fase acuosa durante la desolvatación del polímero. Para modificar la partición del GA entre la fase orgánica y acuosa se decidió modificar el pH de esta última, aumentando de tal forma la hidrofobicidad de la molécula por cambio en su ionización.

En función del pH de la fase acuosa (mezcla alcohol:agua 1:1), se decidió elegir el pH adecuado para lograr el encapsulamiento del fármaco en las NPs, tomando en cuenta los pka's del GA (pka1 = 2.76, pka2 = 2.81 y pka3 = 4.71). Con base en lo anterior se determinó que el pH de trabajo en el cual la mayor cantidad de moléculas del GA se encontrarían en forma no ionizada, es decir su forma de mayor hidrofobicidad, sin afectar la estabilidad de las NPs, evitando su aglomeración y

	pH				
	2.8	2.9	3.0	3.2	3.6
Réplica 1	275.1	161.3	105.0	89.5	76.4
Réplica 2	315.0	149.8	149.3	91.3	80.8
Réplica 3	287.4	156.0	127.1	89.4	78.7

*ANOVA: F = 116.93 (F crítica = 3.47), Valor $P = 2.36 \times 10^{-8}$ ($P < 0.05$)



Con base en los resultados del ANOVA ($P < 0.05$) se concluyó que la talla de las NPs/PVM-MA se ve afectada por el pH de la fase acuosa empleada en el método de desplazamiento de disolvente.

Como se observa en la Figura 24, por arriba de un pH igual o mayor a 2.9 la talla de las NPs se encuentra por debajo de los 200 nm. Se sugiere que por debajo de 2.9 al formarse las NPs hay una disminución del potencial eléctrico tal que vence la fuerza de repulsión entre las partículas y empieza a dominar la fuerza de atracción, y aunado a la constante coalición entre las NPs dispersas debido al movimiento Browniano, ocasiona el aumento del tamaño de partícula por aglomeración [Guozhong, 2004.]; ya que a pH 2.8 se puede decir que la talla de las partículas se duplica (casi 300 nm).

A partir de los resultados obtenidos durante la optimización del procedimiento y con el fin de mantener la sencillez y facilidad del método de desplazamiento de disolvente se optó por evitar el uso de cualquier estabilizante para controlar el tamaño de partícula del sistema coloidal, y simplemente establecer un pH mayor a 2.9. De esta fue como se llegó al procedimiento para la preparación de NPs/PVM-MA/GA descrito con anterioridad.

Caracterización de las NPs/PVM-MA/GA

El sistema coloidal obtenido fue caracterizado obteniendo la talla, carga superficial, morfología, rendimiento de formación, eficiencia de encapsulamiento y realizando un análisis térmico. En la Tabla 6 se resumen los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica del sistema de liberación coloidal.

Tabla 6. Resumen de las características fisicoquímicas de las NPs/PVM-MA/GA

	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)	GA cargado ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ^a
NPs Etapa 1	155.7 \pm 5.8 nm	-39.7 \pm 3.5	6.83 \pm 0.54
NPs Etapa 2	176.3 \pm 18.7 nm	-44.8 \pm 3.6	15.07 \pm 0.86

Los datos presentados representan el promedio \pm DS ($n = 3$) de las pruebas realizadas.

a La cantidad de GA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de NPs) fue determinada por medio de HPTLC.

6.2.1 Talla de partícula

Mediante el uso de la técnica de dispersión de luz fue posible evaluar el tamaño de las NPs preparadas. Con el método propuesto para la formación de NPs/PVM-MA es posible obtener partículas con talla de 124 ± 3.6 nm con un índice de polidispersión (IP) de 0.117, correspondiente

a NPs/PVM-MA blanco (Tabla 7). En comparación con el método original el tamaño de partícula de las NPs obtenidas con el método propuesto es mayor, dicha diferencia puede estar relacionada con la acidificación de la fase acuosa al momento de su preparación.

La incorporación del GA en la etapa 1 del método provoca el aumento de la talla de las partículas hasta los 55.7 ± 5.8 nm, con un IP de 0.137. Por su parte, las NPs obtenidas en la etapa 2 también presentan un incremento en su talla hasta los 176.3 ± 18.7 nm, con un índice de IP de 0.109 (Tabla 7). La tendencia de incrementar su tamaño al encapsular o adsorber moléculas ya ha sido reportada con anterioridad [Arbós, 2003; Irache et al., 2005].

Tabla 7. Talla de las NPs/PVM-MA

	NPs/PVM blanco		NPs Etapa 1		NPs Etapa 2	
	Talla de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Talla de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Talla de partícula (nm)	Índice de polidispersión
Lote 1	127.6	0.125	161.3	0.106	197.3	0.041
Lote 2	124.1	0.098	149.8	0.119	169.9	0.139
Lote 3	120.4	0.129	156.0	0.185	161.6	0.148
Promedio	124.0	0.117	155.7	0.137	176.3	0.109
Desviación estándar	3.6	0.017	5.8	0.042	18.7	0.059

Tomando en cuenta el sitio de administración intencionado, la mucosa cervical, las NPs/PVM-MA-GA con tamaños por debajo de los 200 nm tendrían la posibilidad de difundir rápidamente por el *mucus* cervicovaginal hasta llegar al epitelio afectado [das Neves, Nunes, Machado y Sarmiento, 2014]; siendo su tamaño una ventaja en la localización de las NPs en el sitio de acción.

6.2.2 Carga eléctrica superficial

Debido a la hidrólisis del PVM-MA era de esperarse que la carga de las partículas al encontrarse suspendidas en agua ($\text{pH} \cong 7.2 - 7.4$) fuera negativa (pKa del polímero = 2.5) [Luzardo-Alvarez, 2006]; comprobado por el valor de la carga superficial de las NPs blanco -21.0 ± 2.2 mV. La incorporación de GA en la etapa 1 disminuye el valor del potencial zeta hasta -39.7 ± 3.5 mV (Tabla 8).

Este mismo efecto sucede cuando posteriormente el GA es absorbido en la etapa 2 del método, resultado en NPs con un potencial zeta -44.8 ± 3.6 mV (Tabla 8). En esta etapa, la disminución de la carga negativa de las NPs puede deberse a la contribución por parte del GA, ya que este

adquiere carga negativa en solución acuosa debido a la ionización de sus grupos hidroxilo y carboxilo (pK_a 's: 2.76, 2.81, 4.71).

Los resultados obtenidos concuerdan con aquellos reportados por Arbós et al. (2003), los cuales demostraron que la modificación de la superficie de las NPs/PVM-MA afecta las características superficiales de las partículas (potencial zeta), y que dicha modificación está en función del agente que esté interactuando en su superficie [Arbós et al., 2003]. Por lo tanto, dado la carga negativa del GA, es de esperarse una disminución en el potencial zeta de las NPs.

Tabla 8. Valores de potencial zeta de las NPs/PVM-MA

	Potencial Zeta (mV)		
	NPs/PVM-MA blanco	NPs Etapa 1	NPs Etapa 2
Lote 1	-21.7	-36.3	-48.9
	-23.0	-40.0	-45.6
	-22.5	-37.5	-46.4
Lote 2	-23.0	-36.6	-48.0
	-21.4	-36.6	-45.1
	-22.5	-39.2	-44.3
Lote 3	-17.1	-44.4	-46.5
	-19.6	-46	-41.4
	-18.1	-41.1	-37.2
Promedio	-21.0	-39.7	-44.8
Desviación estándar	2.2	3.5	3.6

6.2.3 Morfología

En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos de la observación microscópica de las NPs/PVM-MA obtenidas en las dos diferentes etapas del método (Figura 25 y Figura 26) mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido.

A partir de las micrografías obtenidas de las NPs etapa 1 y etapa 2 del método, se puede decir que estas se caracterizan por ser partículas individuales, en su mayoría de forma esférica con un tamaño por debajo de los 200 nm. Los resultados obtenidos permiten confirmar los resultados de la determinación de su tamaño por el método de dispersión de luz. Cabe señalar que en ninguna de las muestras observadas se presentan aglomerados, lo que podría ser indicativo de problemas en su estabilidad y complicaciones en la liberación del fármaco.

Se puede concluir que las NPs/PVM-MA/GA presentan una morfología característica que confirman su tamaño, reflejo de la estabilidad del sistema.

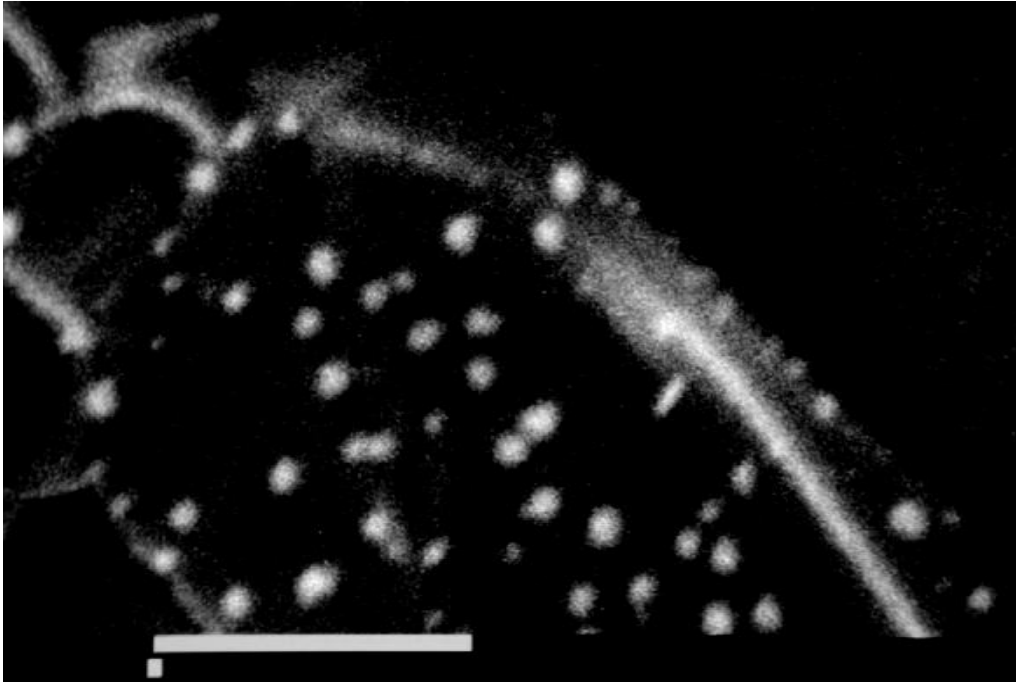


Figura 25. Micrografía de NPs Etapa 1 (10 000. Barra = 1 μm).

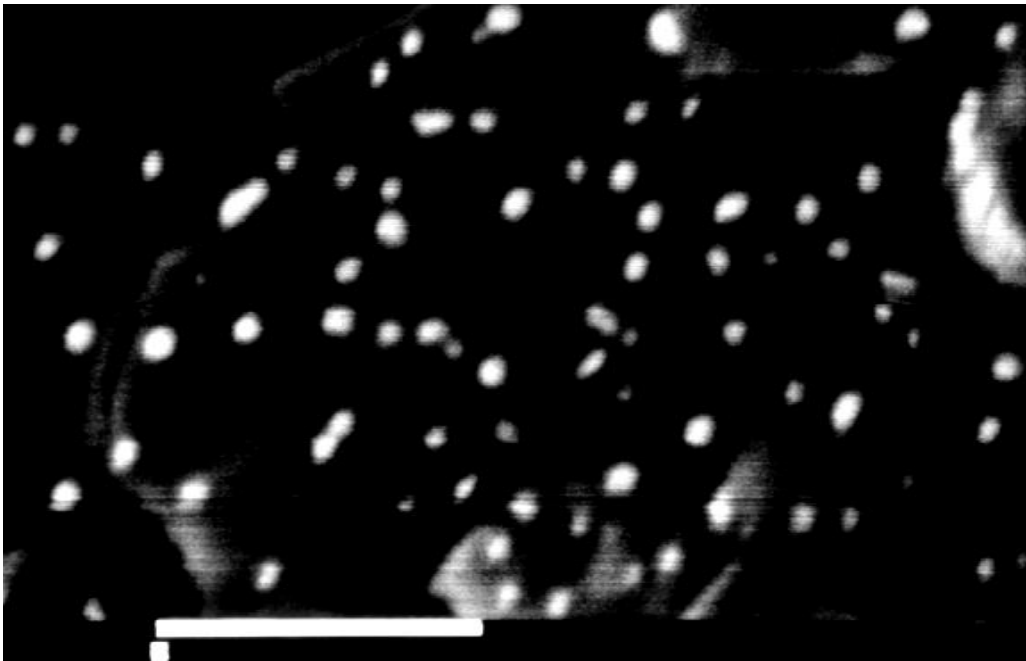


Figura 26. Micrografía de NPs Etapa 2 (10 000. Barra = 1 μm).

6.1.2.4 Rendimiento de formación

El rendimiento de formación de las NPs/PVM-MA se obtiene a partir de la diferencia entre la cantidad de polímero inicial que se transforma en NPs. La cantidad de PVM-MA que se transforma en NPs se expresa en porcentaje (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimiento de formación de las NPs/PVM-MA

	Recobro de NPs en peso	Recobro de NPs en porcentaje
	mg	%
Lote 1	62.4	56.73
Lote 2	63.8	58.00
Lote 3	67.2	61.09
Lote 4	66.5	60.45
Lote 5	68.1	61.91
Lote 6	71.5	65.00
Promedio	66.58	60.53
Desviación Estándar	3.23	2.93

Considerando que se utilizan 110 mg de PVM-MA, el 60.53 ± 2.93 % de esta cantidad es transformado a NPs durante el método de desplazamiento de disolvente.

6.1.2.5 Eficiencia de encapsulamiento

Se determinó el porcentaje de encapsulación de GA en NPs/PVM-MA recuperando los sobrenadantes después de su purificación. La cantidad de GA en el sobrenadante se cuantificó por medio de la técnica de HPTLC, previa validación del método [Aguilar-Rosas, Alcalá-Alcalá, Llera Rojas y Ganem-Rondero, 2015]; y por diferencia con la cantidad inicial del fármaco se determinó la cantidad de GA en las NPs. La elección de la técnica de HPTLC fue con base en su rapidez (capacidad de realizar análisis simultáneos a un gran número de muestras), bajo costo (poco consumo de fase móvil) y no presentar problemas relacionados a la integridad de la fase estacionaria (fase estacionaria de un solo uso).

Los resultados obtenidos tanto para la encapsulación como la adsorción del fármaco, y la suma total, se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Determinación de la cantidad de GA cargado en las NPs/PVMA

	GA encapsulado	GA adsorbido	GA
	Etapa 1	Etapa 2	Total
	~g/mg	~g/mg	~g/mg
Promedio	6.83	8.24	15.07
Desviación Estándar	0.54	0.34	0.86

Como se puede observar la cantidad encapsulada de GA en las NPs/PVM-MA ($6.83 \pm 0.54 \mu\text{g/mg}$) es menor que la cantidad adsorbida ($8.24 \pm 0.34 \mu\text{g/mg}$), cuya suma hace un total de $15.07 \pm 0.86 \mu\text{g}$ de GA por cada mg de NPs.

La encapsulación del GA en las NPs/PVM-MA por el método de desplazamiento de disolvente se lleva a cabo al momento de la desolvatación del polímero y formación de las NPs, debido a la interacción entre las moléculas de fármaco y las moléculas del polímero [Bilati, Alléman y Doelker, 2005; Beck-Broichsitter et. al., 2010]. Al estar el GA en solución dentro de la fase acuosa (agua-etanol, 1:1, pH 2.9), el fármaco presenta dos de sus tres grupos carboxilo en forma no ionizada (molécula con carácter hidrofóbico); sin embargo a pesar de este carácter hidrofóbico, su alta solubilidad en la fase acuosa, no permite que la interacción (hidrofóbica) entre el fármaco polímero sea considerable como para incorporar en su totalidad al GA en el seno de las NPs al momento de su formación.

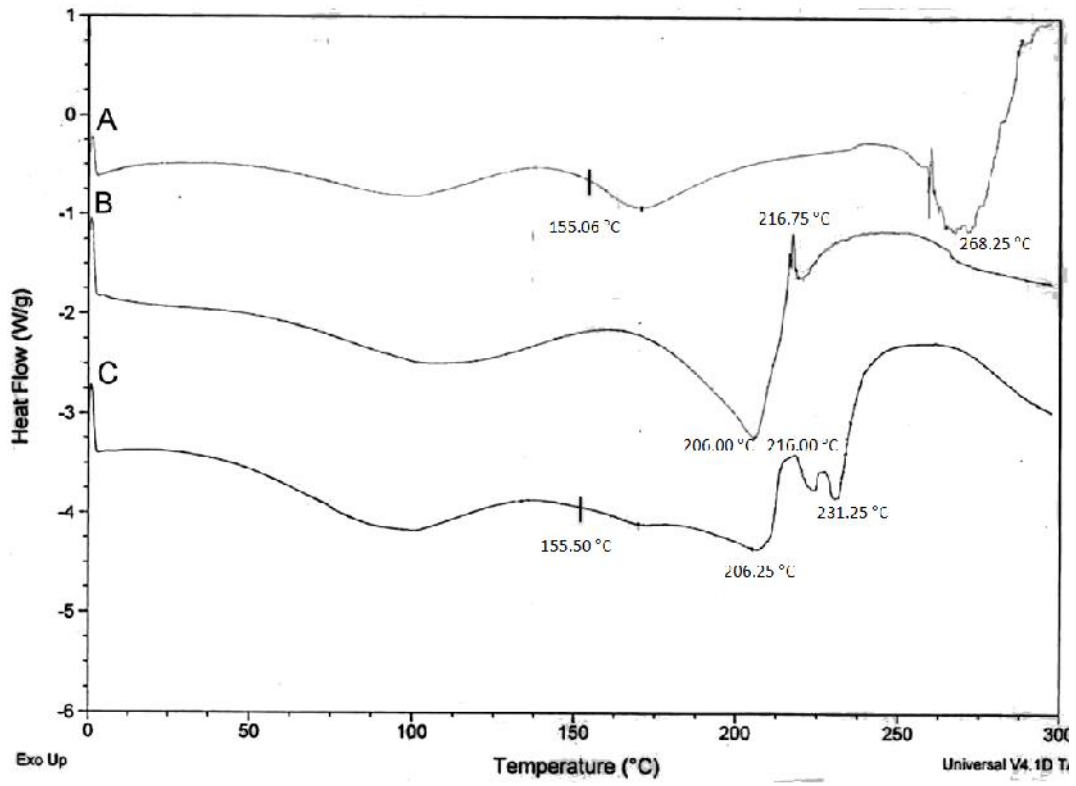
Con el fin de incrementar la carga del fármaco en las NPs, en la etapa 2 del método estas fueron incubadas en solución acuosa de GA para lograr adsorber el fármaco en su superficie. En solución acuosa, pH 5-7 (pH del agua destilada) el GA se encuentra ionizado (pK_a 2.76, 2.81 y 4.71) [Sun, Xie, Tian, Liu, 2007], lo que le permite interaccionar con los grupos carboxilo presentes en el PVM-MA después de su hidrólisis al contacto con el agua [Yoncheva, Lizarraga, Irache, 2005]. Por esta razón, es probable que el fármaco se esté adsorbiendo a la superficie de las NPs por medio de puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo e hidroxilo del GA con los grupos carboxilo del polímero. Esta suposición se sustenta con la disminución del potencial zeta de las NPs obtenidas en la etapa 2.

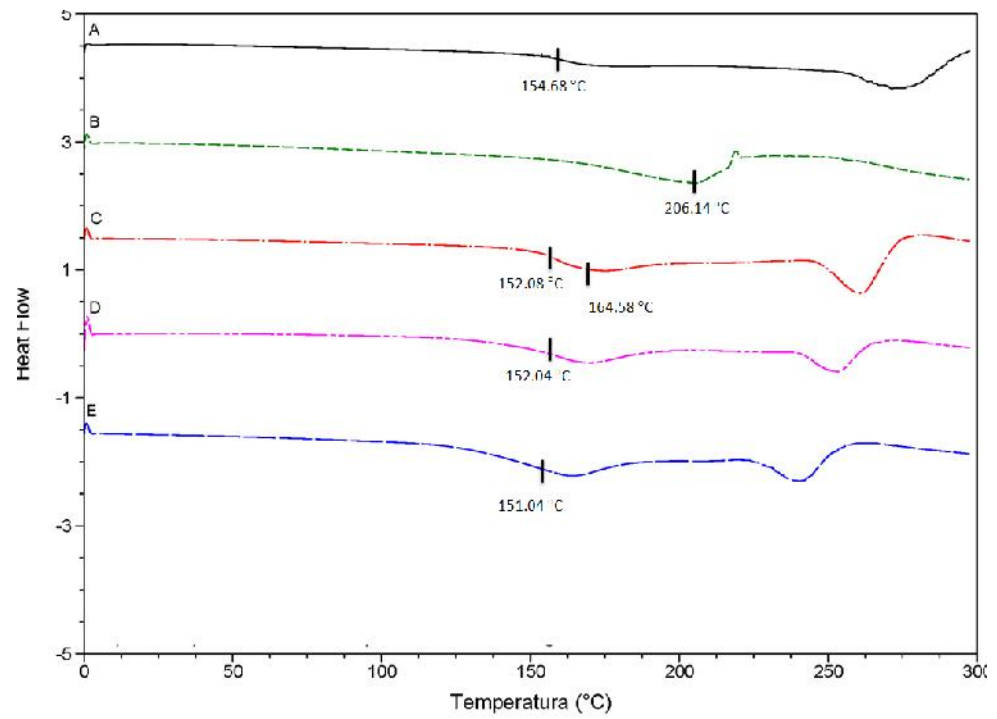
6.1.2.6 Análisis térmico

El análisis térmico de las NPs/PVM-MA/GA mediante la calorimetría diferencial de barrido se llevó a cabo para determinar el estado físico del GA en las NPs; primeramente, se presentan las curvas obtenidas del análisis de las materias primas en la Figura 27.

El PVM-MA presenta un perfil térmico (Figura 27, A) caracterizado por eventos endotérmicos específicos, primeramente se presenta una señal por debajo de los 100 °C debido a la evaporación de agua libre (humedad) y otros compuestos volátiles [Chung, Wu y Malawer, 1990]. A una temperatura de aproximadamente 155.6 °C se presenta un punto de inflexión de la curva correspondiente a la transición vítrea del polímero ($T_g = 152$ °C) y posteriormente por arriba de los 250 °C (268.25 °C) se presentan una endoterma pronunciada relacionada a su degradación; a esta temperatura en el análisis visual del calentamiento del polímero se observó formación de gas, muy probablemente CO_2 debido a reacciones de descomposición (descarboxilación, entre otras) por su degradación térmica [Chung, Wu y Malawer, 1990].

Por su parte el GA (Figura 27, B) presenta un perfil térmico caracterizado por un ligero evento endotérmico por debajo de los 100 °C debido a la evaporación de agua libre (humedad), a los 206.00 °C se presenta una señal amplia correspondiente a la temperatura de fusión (T_f) del fármaco y a los 216.75 °C la exoterma correspondiente a la degradación. Cabe recordar que el GA presenta en su molécula un disacárido de ácido glucurónico, porque es probable que el glucósido sea responsable del comportamiento térmico del fármaco, ya que al igual que otros azúcares, el GA no presenta endotermas angostas sino endotermas que ocurren durante un rango de temperatura amplio [Hurtta, Pitlänen y Knuutinen, 2004]. Además, al hacer el análisis visual durante el calentamiento de una muestra del GA, de la misma manera que los azúcares el fármaco cambia de color (de amarillo a café entre los 170 a 180 °C por su oxidación); lo cual solo puede suceder por descomposición del disacárido en la molécula del GA. De esta forma, la endoterma característica con su máximo a 206.00 °C es un evento que se presenta por la combinación de varios fenómenos (fusión y descomposición) que le suceden al fármaco al incrementar la temperatura.





el perfil de las NPs etapa 1 no se presenta el evento endotérmico característico del GA en su estado cristalino, por lo que se puede decir que este se encuentra molecularmente disperso en la matriz polimérica. De la misma manera, al analizar el perfil térmico obtenido por la muestra de NPs etapa 2 la Tg del polímero presentó un ligero desplazamiento (151.04 °C), y de la misma forma que las otras muestras de NPs, presenta una endoterma a 165 °C pero un poco más extendida, relacionada a la deshidratación del grupo anhídrido. En el perfil de las NPs etapa 2 a los 200 °C no se aprecia la señal correspondiente a fusión de GA, como ocurre cuando este se presenta en estado cristalino; lo cual permite saber que el fármaco adsorbido a la superficie de las NPs/PVM-MA, de la misma forma que en la matriz, se encuentra de manera molecular recubriendo la superficie de las NPs.

En resumen, después de la caracterización fisicoquímica de las NPs fabricadas se puede decir que a través del método de desplazamiento de disolvente es posible obtener de manera fácil, rápida y económica partículas esféricas de tamaño nanométrico cargadas de GA, el cual se presenta tanto molecularmente disperso en su matriz como adsorbido en su superficie. En función de las características de la NPs/PVM-MA/GA, especialmente por la talla y contenido de fármaco [Herrman y Wink, 2011], representan un buen candidato para ser utilizadas en el tratamiento de LEI debidas a infecciones del cérvix por VPH.

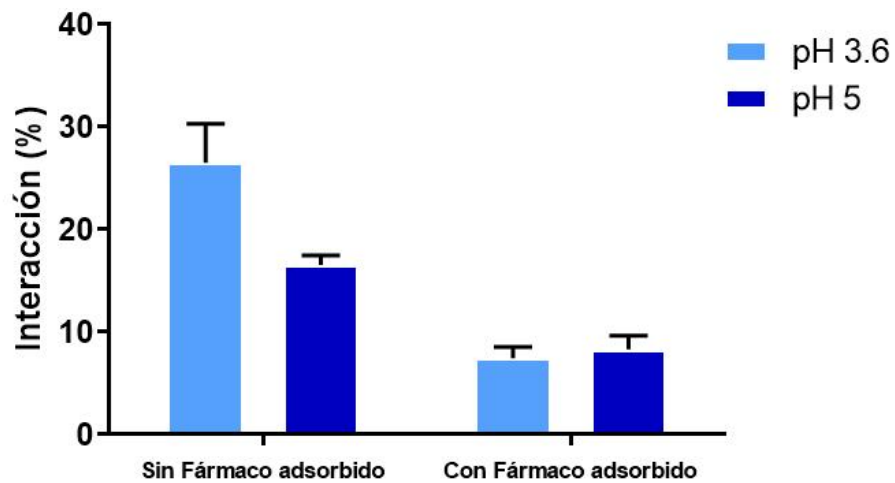
Estudio de bioadhesión de las NPs/PVM-MA/GA

La evaluación de la interacción *in vitro* entre las NPs/PVM-MA/GA con mucina gástrica de cerdo se llevó a cabo cuantificando la mucina sin interaccionar por un método de cuantificación de proteína total (Ensayo BCA). El estudio se llevó a cabo a diferentes pH's (3.6 y 5.0) con el fin de evaluar su impacto sobre la interacción adhesiva. También se evaluó el impacto del fármaco adsorbido a la superficie de las NPs en la interacción adhesiva.

Para este estudio se propuso un diseño de experimentos de dos factores (2^2) para estudiar el efecto tanto de la presencia de fármaco adsorbido en la superficie de las NPs y del pH del medio en el porcentaje de interacción mucina-NPs. En función de los porcentajes de interacción mucina-NPs obtenidos se realizó un ANOVA para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativa entre los resultados, donde valores de P menores que 0.05 ($P < 0.05$) fueron considerados estadísticamente significativos.

Los resultados obtenidos después de la evaluación *in vitro* de la interacción mucina NPs se muestran en la Tabla 11 y Figura 29, mientras que los resultados del análisis estadístico se presentan en la Tabla 12.

		pH	
		3.6	5.0
Fármaco	Sin fármaco adsorbido	26.51 ± 1.44 %	16.53 ± 0.89 %
	Con fármaco adsorbido	7.36 ± 1.2 %	8.31 ± 1.7 %



Factor	F *	Valor P **
Fármaco adsorbido	122.293	0.00000399
pH	13.275	0.00655
Interacción	19.48	0.00224

* F crítica = 5.31785

** Estadísticamente significativo, $P < 0.05$

2005]. Al incrementar el pH a un valor de 5.0, la formación de dichas uniones débiles (puentes de hidrógeno) disminuye debido a la ionización de los grupos carboxilo del polímero (Tabla 12) y la pérdida de la habilidad de la mucina de donar hidrógenos [Peppas y Huang, 2004; Petel et al., 2003]. Estos resultados indican que la retención de las NPs/PVM-MA en el cérvix puede variar por los cambios del pH normal de la cavidad vaginal.

Tabla 13. Fracción de las especies sin ionizar del PVM-MA (pka 2.5) a pH 3.6 y pH 5.0 a partir de $f(un) = 1 / (1 + 10^{pH-pka})$ [Cázares-Delgadillo et al., 2005]

pH	Fracción sin ionizar
3.6 ± 0.1	0.074
5.0 ± 0.1	0.00

El otro parámetro evaluado que afecta la interacción entre las moléculas de mucina y las NPs/PVM-MA/GA fue la presencia de fármaco adsorbido a su superficie ya que una menor interacción fue observada (Figura 29); es decir, la presencia de GA en la superficie de las NPs/PVM-MA obstruye su interacción con las moléculas de mucina. Este mismo comportamiento fue descrito por Yoncheva et al. (2005), en donde los autores encontraron que NPs/PVM-MA recubiertas con polietilenglicol (PEG) interaccionan menos con mucina de cerdo debido a un efecto estérico de hidratación provocado por las cadenas de PEG. No obstante esta baja interacción adhesiva que se da no se ve afectada por cambios en el pH (Figura 29).

En general, el sistema presentó una bajo potencial bioadhesivo, en función de su interacción con las moléculas de mucina, con o sin fármaco adsorbido a su superficie, lo cual se debe a la repulsión electrostática entre las moléculas de mucina y las NPs/PVM-MA (-21.0 ± 2.2 mV), ya que entre un pH de 2.8 a 7 la mucina se comporta como un polielectrolito aniónico [Duchene, Tocuchar, Peppas, 1988].

A partir de los resultados obtenidos se puede decir que la pérdida de los residuos “activos” en las moléculas del PVM-MA que forman a las NPs, ya sea por incremento del pH o por su previa interacción con las moléculas del fármaco, provoca la disminución sus propiedades mucoadhesivas; no obstante esta disminución no es total (Figura 29). Se cree que la formación de uniones débiles (puentes de hidrogeno) no es el único mecanismo mucoadhesión de las NPs/PVM-MA, sino también intervienen interacciones hidrofóbicas [Peppas y Huang, 2004; Yoncheva, Lizarraga, e Irache, 2005]. Otro factor que debe considerarse es la forma en que el material polimérico se presenta, ya que al evaluar la bioadhesión del PVM-MA en solución acuosa no presentó interacción alguna (datos no mostrados). Por tanto, se sugiere que el polímero al presentarse en forma de esferas sólidas de tamaño nanométrico (NPs) incrementa el potencial adhesivo del material, tal cual fue reportado por Irache (2005).

No obstante del bajo porcentaje de interacción entre las NPs/PVM-MA con la mucina (menos del 105 %), la mucoadhesión del sistema tiene el potencial de incrementar si se considera que su tamaño (nanométrico) les puede permitir atascarse entre las grietas y pliegues de las irregularidades topográficas (microscópicas y microscópicas) de la mucosa y retrasar su aclaramiento al estar sujetas a un menor estrés de desalojo y solamente pequeñas interacciones adhesivas las mantendrá en su lugar [Ahuja, Khar, Ali, 1997]. Además es deseable que la interacción entre las NPs y el *mucus* no sea demasiado alta ya que podrían quedar atrapadas por las mucinas del *mucus* impidiéndoles alcanzar el epitelio [das Neves, Nunes, Machado y Sarmento, 2014]. De esta forma, se sugiere que la interacción de las NPs/PVM-MA/GA con la mucina al no ser tan alta permitiría por un lado, no ser eliminadas por la cavidad vaginal, mientras que por otro lado podrían migrar fácilmente hacia el epitelio cervical.

En conclusión, los resultados obtenidos al evaluar las características bioadhesivas de las NPs/PVM-MA/GA son muy prometedores, ya que al parecer presentan el balance adecuado para ser utilizadas para la localización de GA en el tratamiento de LEI debidas a infecciones por VPH.

Evaluación in vitro del efecto de las NPs/PVM-MA/GA sobre un cultivo de células HeLa

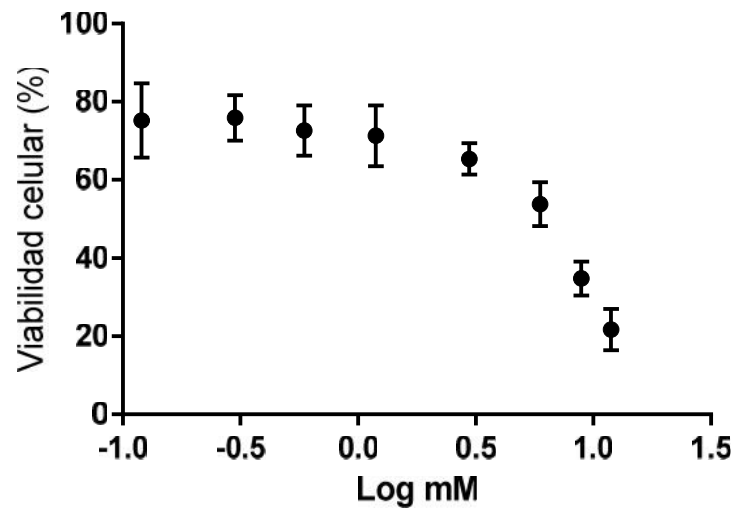
6.4.1 Resultados de la prueba de citotoxicidad y determinación de la concentración mínima inhibitoria (IC₅₀) de GA por medio de la prueba de MTT

La evaluación de la citotoxicidad se realizó por medio de la prueba del MTT evaluando diferentes concentraciones de GA (0.12 – 11.89 mM) durante 24 h y así poder obtener la curva de viabilidad celular en función de la concentración del fármaco, a partir de la cual se determinó la IC₅₀ del GA (Tabla 14).

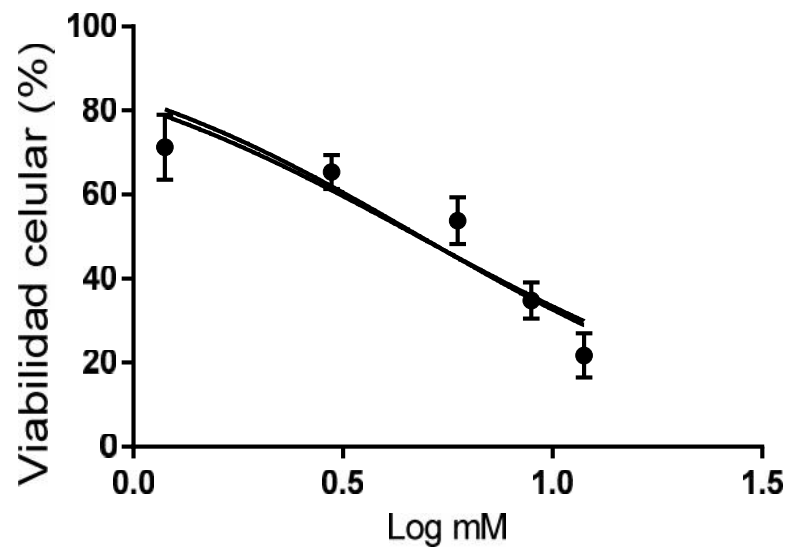
Tabla 14. Resultados de la evaluación de la citotoxicidad del GA sobre células HeLa (prueba del MTT)

GA [mM]	Viabilidad celular (%)					
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6
0.12	73.425	62.622	92.211	74.051	72.798	75.930
0.30	72.798	78.591	79.530	84.227	71.233	68.728
0.59	77.652	64.501	77.495	72.798	78.278	64.971
1.19	73.894	78.278	76.869	67.945	73.581	57.143
2.97	66.693	66.223	60.223	60.744	69.667	68.728

GA [mM]	Viabilidad celular (%)					
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6
5.94	46.027	55.264	56.047	62.309	54.012	49.315
8.91	35.382	30.685	31.311	31.468	39.139	40.705
11.89	13.933	20.196	22.231	18.943	26.614	28.493



LogIC50	0.6851
IC50	4.843
Erro estándar	
LogIC50	0.03121
95% Intervalo de confianza	
Log IC50	0.6213 to 0.7490
IC50	4.181 to 5.610
Grados de libertad	29
R ²	0.8101



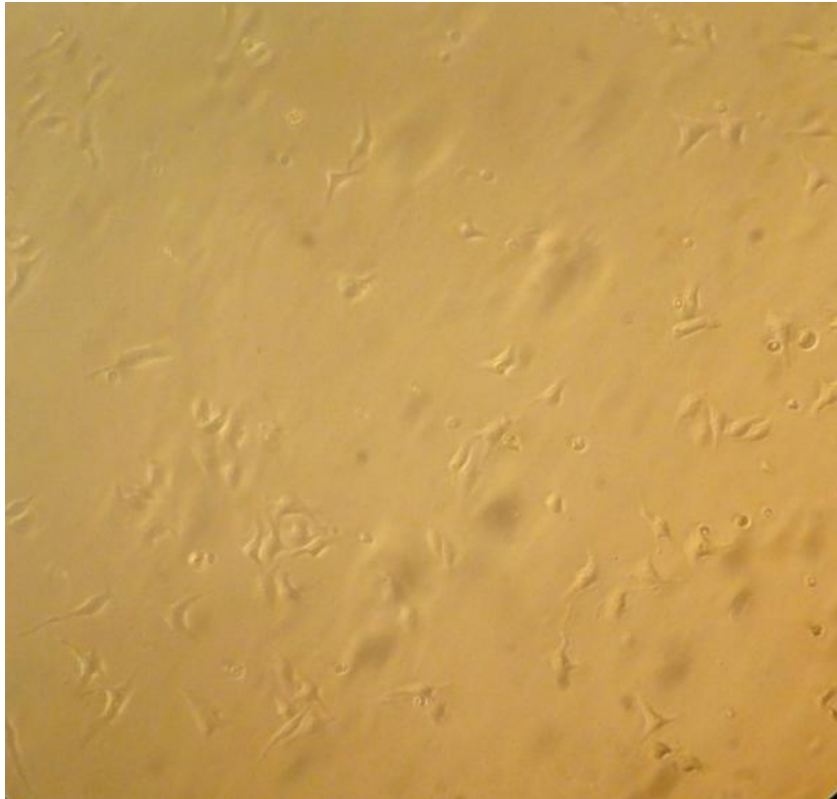
Comparados contra un control negativo (Figura 32) los cultivos celulares expuestos a concentraciones menores de GA que la IC_{50} no muestran grandes cambios morfológicos, ya que en estos se puede observar una monocapa confluyente con células individuales de morfología típica (Figura 33). Por el contrario, los cambios sobre la morfología del cultivo celular por el tratamiento con GA por arriba de la IC_{50} son abruptos, provocando la ruptura y desprendimiento de la monocapa celular y un cambio evidente de la morfología celular, perdiendo su forma elongada y ligeramente triangular, mostrándose de forma redonda, colapsada e individual. Estos efectos se ven más acentuados al aumentar la concentración (Figura 34).

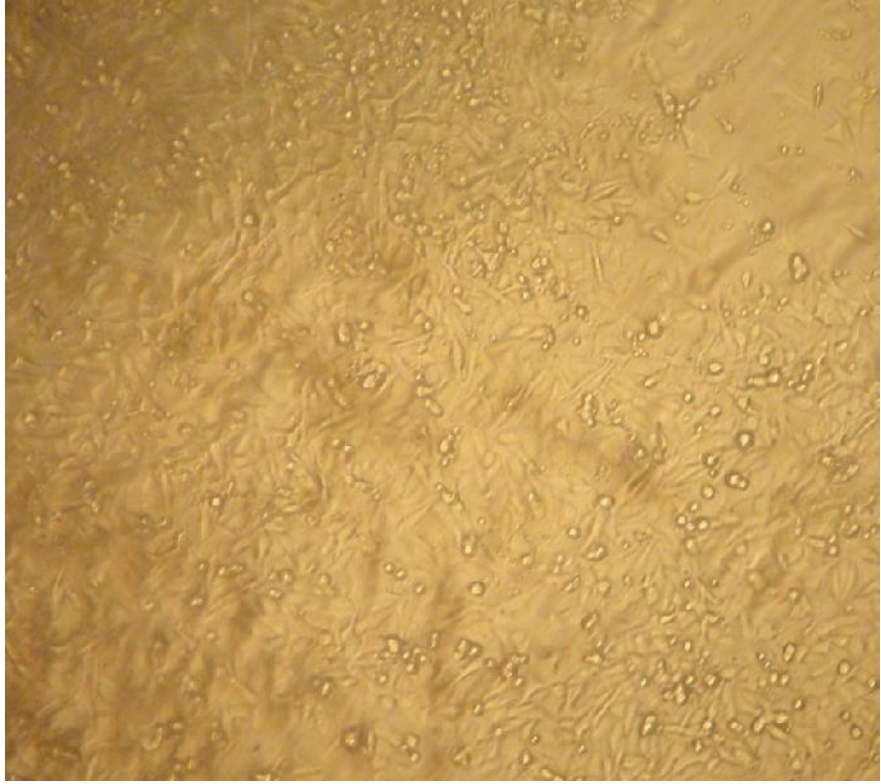
Con base a los resultados obtenidos es inminente que los daños más graves provocados por el GA se encuentran entre la concentración 2.97 mM y 5.94 mM, comportamiento que concuerda con la curva dosis-respuesta obtenida, intervalo en el que se encuentra la IC_{50} obtenida experimental (4.843 mM).

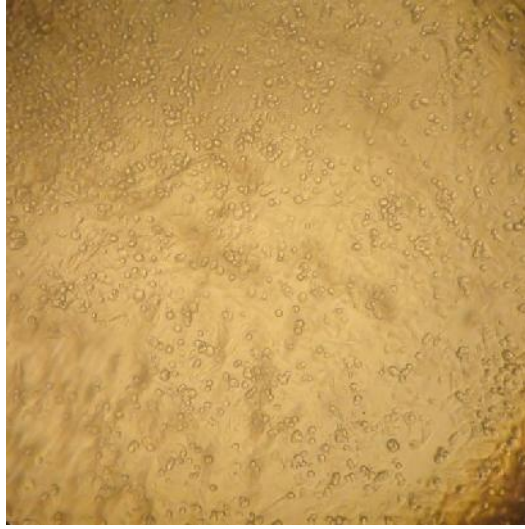
Aunque el resultado de la IC_{50} obtenido en este estudio es 100 veces mayor que aquellos reportados con anterioridad por otros autores (Tabla 16), los cuales se encuentran en el rango de los 423.2 – 673.6 μ M y 311.8 – 313.4 μ g/mL, la validez del resultado obtenido se fundamenta en el conocimiento de que el GA ejerce su efecto citotóxico a altas concentraciones [Thirugnanam, Xu, Ramaswamy y Gnanasekar, 2008], mientras que a bajas concentraciones tiene un efecto protector [Lin, 2003]. Además, el efecto citotóxico del GA y sus derivados ha sido evaluado en otros tipos celulares, tanto células carcinogénicas como células infectadas por virus (células de linfoma primario efusivo transformadas por Herpesvirus del Sarcoma de Kaposi e infección terminal latente en linfocitos B, células de cáncer de próstata, células de cáncer gástrico KATO III, células de leucemia promielocítica humana HL-60, células de hepatoma humano, y células tumorales de útero (SiHa)) [Nassiri, y Hosseinzadeh, 2008; Hibasami, Iwase, Yoshioka y Takahashi, 2005 y 2006; Lee, 2008; Thirugnanam, Xu, Ramaswamy y Gnanasekar, 2008], reportando la IC_{50} en el rango milimolar [Lin et al.; 2008; Thirugnanam, Xu, Ramaswamy y Gnanasekar, 2008]. No obstante, debe considerarse que la relación dosis-respuesta es específica para cada modelo celular.

Tabla 16. Comparación de las IC_{50} de GA reportadas

Referencia	Densidad Celular x 10 ⁴ células/pozo	Duración del tratamiento h	Evaluación de la viabilidad celular	IC_{50}
Herrmann y Wink, 2011	2	24	MTT (570 nm)	311.8 – 313.4 μ g/mL
Zhao, Ji, Mao, 2012	5	48	MTT (no se indica)	423.2 – 673.6 μ M
Experimental	2.5 – 3	24	MTT (490 nm)	4.181 mM - 5.610 mM







En conclusión, los resultados obtenidos después de la experimentación con células HeLa muestran que el GA presenta un efecto citotóxico que se refleja en los daños morfológicos provocados a las células, el cual está en función de la concentración del fármaco. La IC_{50} resultante del GA sobre células HeLa se encuentra entre 4.181 mM a 5.610 mM bajo las condiciones de estudio.

6.4.2 Resultados del estudio de la inducción de la apoptosis por parte del GA sobre células HeLa utilizando la tinción de Anexina V-Yoduro de propidio

Aunque se ha demostrado la inducción de la apoptosis por parte del GA en modelos celulares diferente a HeLa, como en células de linfoma primario efusivo transformadas por Herpesvirus del Sarcoma de Kaposi e infección terminal latente en linfocitos B, entre otros [Badam, 1997; Herrmann y Wink 2011; Nassiri, y Hosseinzadeh, 2008], así como varios de sus derivados sobre varias líneas celulares cancerígenas [Logashenko et al., 2011]; aún no está definido de manera contundente el mecanismo de acción por el cual ejerce el efecto citotóxico sobre esta línea celular en específico. Por lo tanto, después de la determinación de la IC_{50} , se procedió a estudiar la manera en la que este compuesto ejerce su efecto citotóxico en células HeLa, mediante la evaluación de la inducción de la apoptosis, utilizando la tinción con Anexina V y la observación de los cambios morfológicos a través del microscopio de fluorescencia. A continuación se presentan las imágenes más representativas correspondientes a cada una de las condiciones evaluadas (control positivo, control negativo e IC_{50}).

Al analizar los cultivos sometidos al tratamiento con GA IC_{50} se pueden observar claramente los cambios morfológicos ocasionados por el fármaco (Figura 35). En las imágenes presentadas en la Figura 35 se ven células individuales, con pérdida de las interacciones intercelulares y de la morfología típica de las células HeLa, presentándose como células redondas y pequeñas en las que no se distingue el citosol. La principal característica de estas células es una intensa fluorescencia de color verde (Anexina V:FITC) ya sea en toda la célula o tan solo en su periferia, la cual varía en intensidad y grado. La presencia de AnexinaV:FITC solo puede explicarse por la interacción entre este con la fosfatidilserina que se encuentra en el exterior de la membrana plasmática. La presencia en el exterior de la membrana celular de fosfatidilserina es indicativo de que en dichas células hubo translocación del fosfolípido, muy probablemente debido a un proceso apoptótico en curso. Otra señal de que las células están en apoptosis, además de la translocación de la fosfatidilserina, que se refleja con la señal intensa del yoduro de propidio (Ip) (amarillo-naranja) en el interior de la célula, reflejo de que han perdido la permeabilidad de la membrana celular. Entre otra de las características relevante en las células que se presentan en la Figura 35 es la presencia de protuberancias a lo largo de su periferia, las cuales varían en número y tamaño.

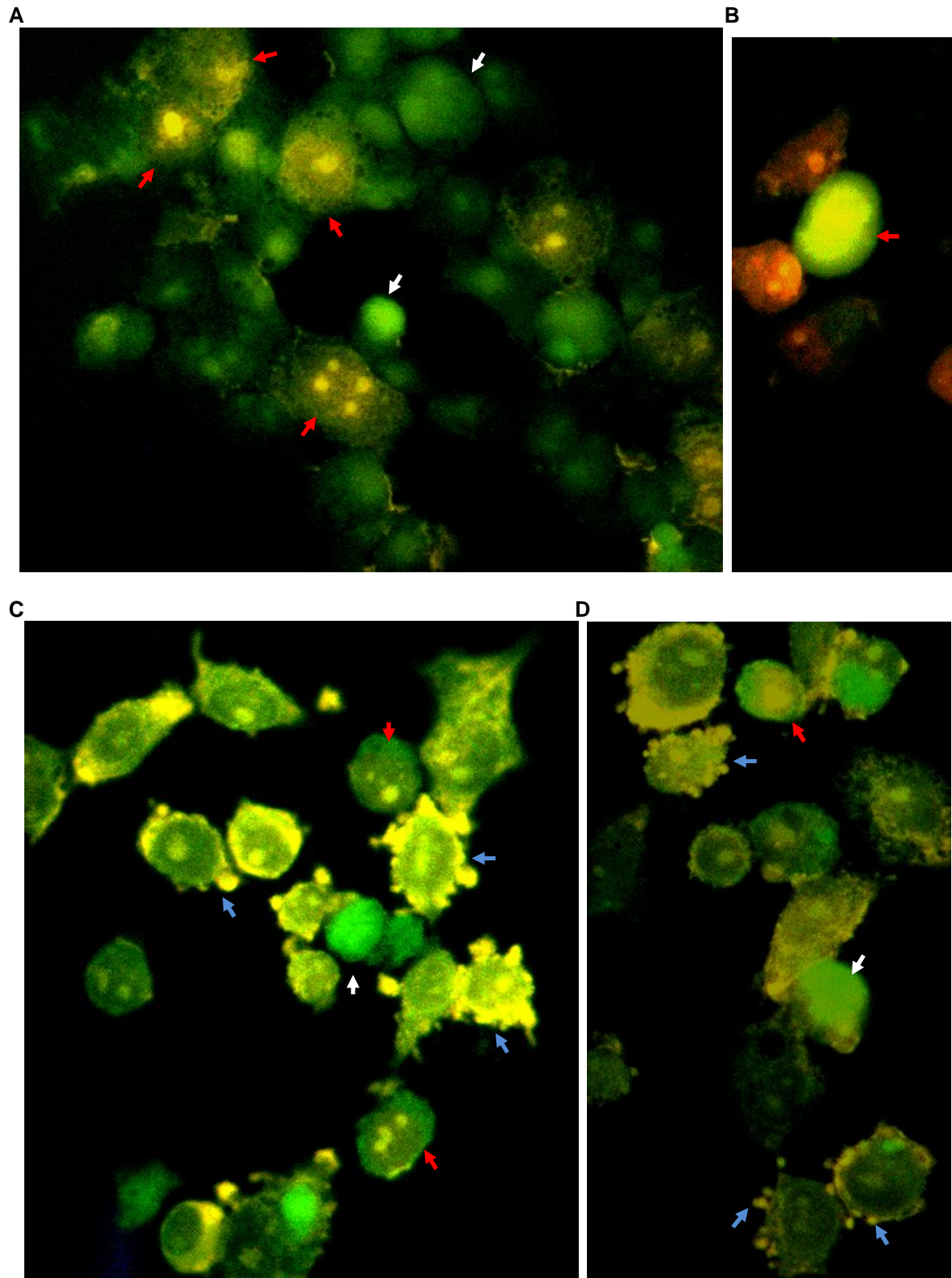


Figura 35. Observación morfológica de células HeLa tratadas con GA (IC_{50}) usando la tinción Anexina V (verde) – ioduro de propidio (amarillo-anaranjado) mediante microscopía de fluorescencia (40 x). A) Cultivo 1, B) Cultivo 2, C) Cultivo 3, D) Cultivo 4. Flecha blanca: apoptosis temprana, Flecha roja: apoptosis intermedia. Flecha azul: apoptosis intermedia-tardía.

Las observaciones de los cultivos tratados con GA IC₅₀ son comparables con aquellos obtenidos por cultivo tratado con doxorubicina IC₅₀, [Mizutani et al., 2005] (Figura 36). En la Figura 36 se muestran células individuales, redondas, pequeñas y muy contraídas, en las cuales se identifican ambos marcajes, tanto con Anexina V: FITC como de yoduro de propidio debido a un inminente proceso apoptótico. En contraste, el control negativo expuesto únicamente al medio de cultivo, que se presenta en la Figura 37, no presenta algún tipo de fluorescencia debida a Anexina V: FICT o Ip.

La apoptosis es un término utilizado para describir el proceso activo autónomo celular en donde vías especializadas de señalización son activadas con el fin de matar a la célula y organizar su eliminación. La muerte celular por apoptosis en general presenta un patrón similar en diferente tipo de células, relativo a los cambios morfológicos que suceden. Durante la apoptosis celular pueden distinguirse varias etapas, separándose en aquellas etapas que sirven de inicio para la activación de las vías de señalización intracelular de los eventos que son críticos para la implementación de la muerte celular y aquellos que, aunque son muy utilizados como indicadores de apoptosis, en realidad no son esenciales para la muerte celular (e.g. cambios en el núcleo celular) aunque son eventos relacionados a una muerte celular inminente [Häcker, 2000]. Los resultados obtenidos concuerdan con las características morfológicas celulares que ocurren durante el proceso apoptótico. [Elmore, 2007; Häcker, 2000]. Aunque no se identificaron cambios morfológicos como condensación de la cromatina del núcleo a lo largo de la periferia nuclear que suceden en etapas tempranas del proceso apoptótico, en las figuras mostradas anteriormente si es posible demostrar los estragos de esta etapa temprana de la apoptosis por medio de la presencia de células individuales con ausencia de interacciones intercelulares (Figura 35, flecha blanca), tal cual sucede en las células que aún forman parte de un tejido y que, al entrar en un proceso apoptótico, comienzan a separarse de sus alrededores y romper las uniones con la matriz extracelular [Häcker, 2000].

Como ejemplo de las etapas intermedias de la apoptosis fue posible identificar la translocación de los residuos de fosfatidilserina hacia el exterior de la membrana celular y pérdida de la permeabilidad membranal con el marcaje fluorescente seleccionado (Anexina V :FICT – yoduro de propidio) (Figura 35, flecha roja). Las células al continuar el proceso apoptótico al que ya han entrado, comienzan a presentar una serie de protuberancias en los bordes de la célula y la condensación completa del núcleo que se segrega en varios fragmentos; mientras que los organelos se encuentran intactos. Aunque debido al marcaje utilizado (Anexina V y yoduro de propidio) no es posible observar las condiciones de los organelos en las células Hela tratadas con GA IC₅₀, si fue posible observar la presencia de las protuberancias en diferente cantidad y tamaño en los bordes de las células (Figura 35, flecha azul), las cuales son precursoras para la formación de los llamados cuerpos apoptóticos en los que la célula se desintegra. La formación de dichos cuerpos apoptóticos se da en las etapas tardías de la apoptosis [Elmore, 2007].

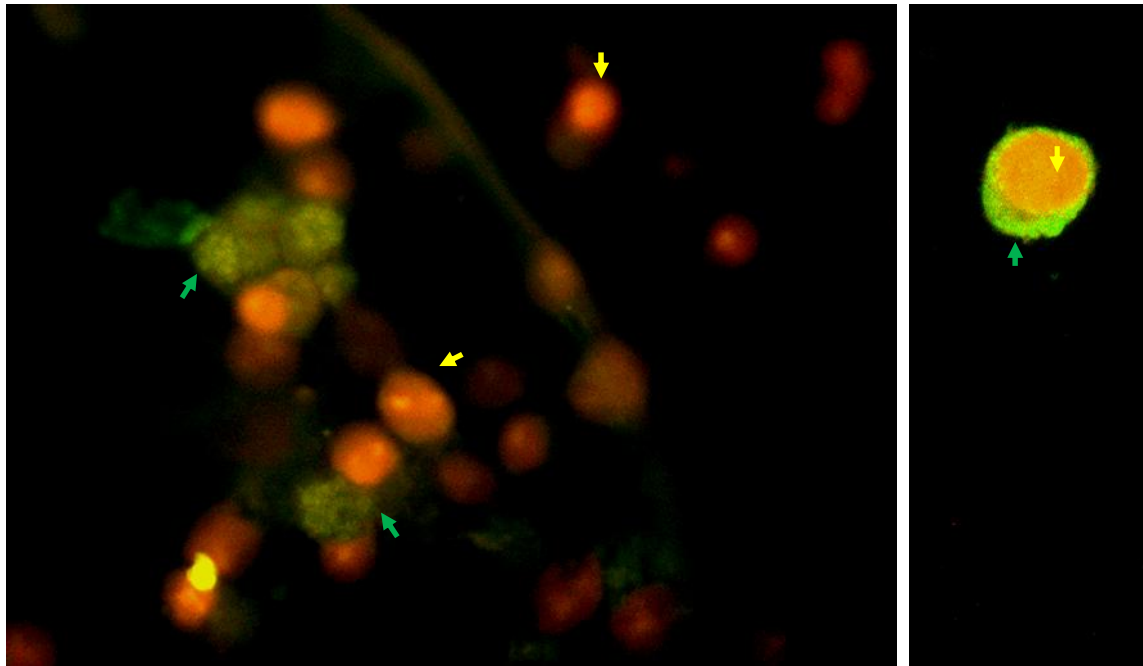


Figura 36. Observación morfológica de células HeLa usando la tinción Anexina V (flecha verde) – ioduro de propidio (flecha amarilla) por microscopía de fluorescencia (40 x). Control positivo: Doxorubicina IC₅₀.

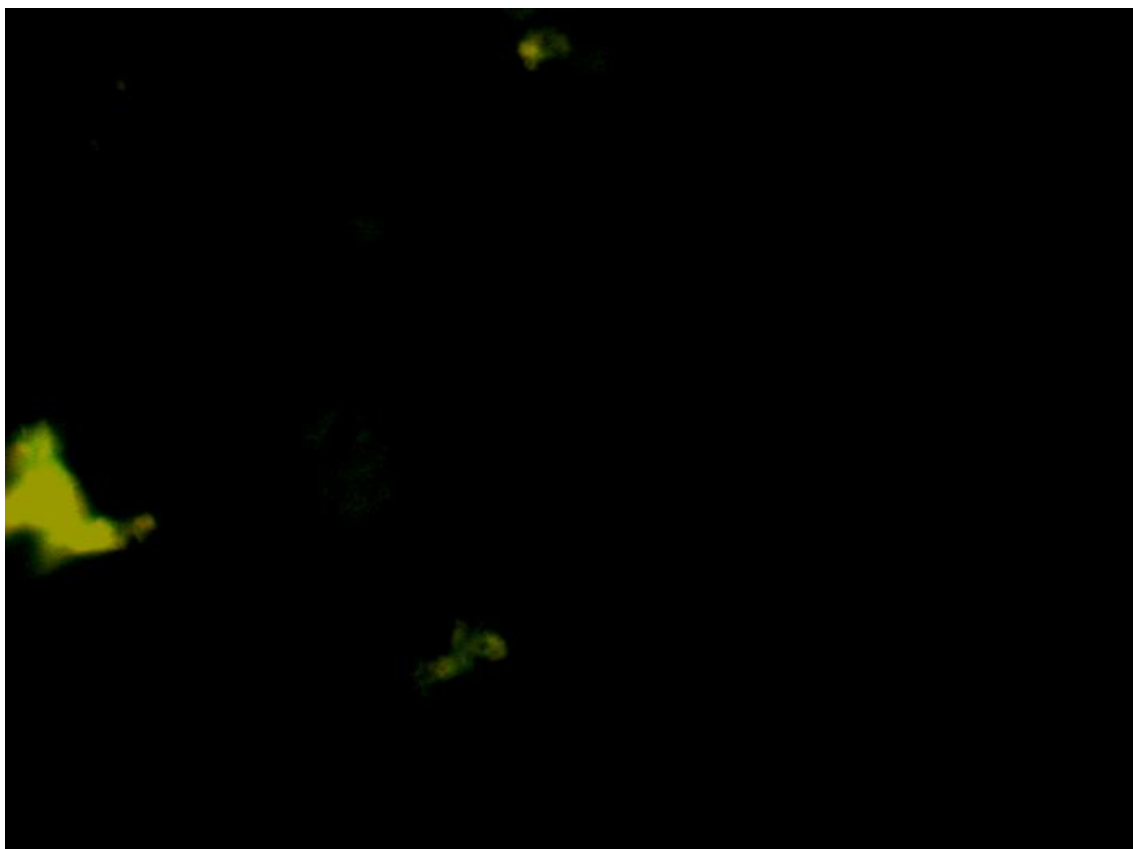


Figura 37. Observación morfológica de células HeLa usando la tinción Anexina V (verde) – ioduro de propidio (amarillo-anaranjado) por microscopía de fluorescencia (40 x). Control negativo.

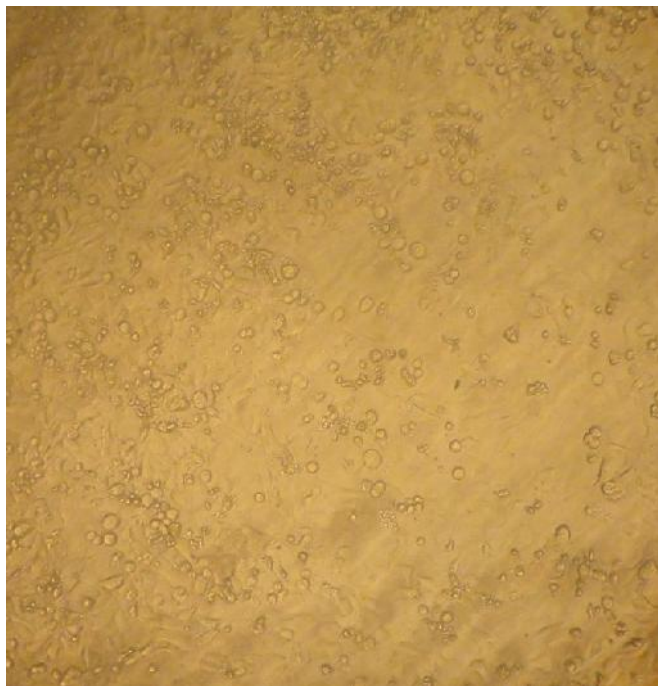
En ninguna de las imágenes de los cultivos celulares tratados con GA IC₅₀ fue posible observar la desintegración celular en forma de cuerpos apoptóticos [Häcker, 2000].

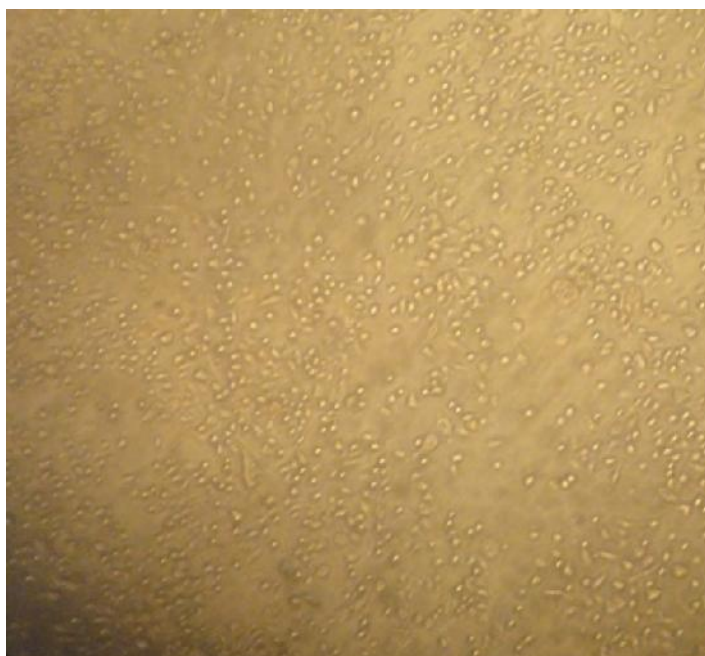
Aunque se detectó la presencia de células necróticas en los cultivos tratados con GA (Figura 35, cultivo B), en general, se puede decir que la muerte celular observada de la mayoría de las células observadas fue mediante un proceso apoptótico.

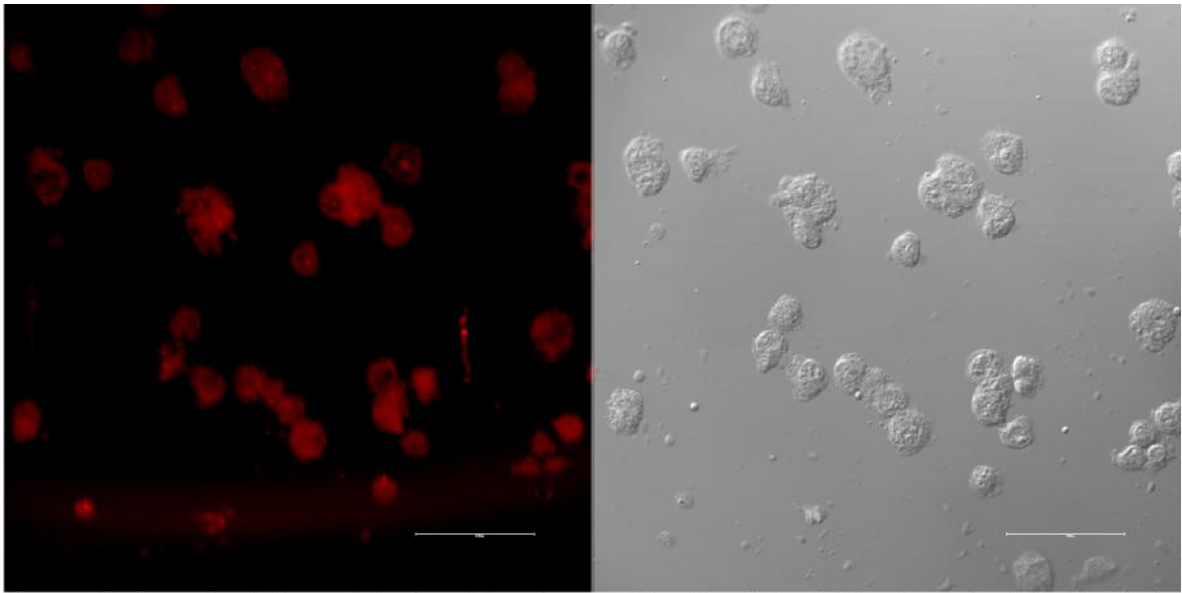
La forma en que el GA induce la apoptosis no está determinada actualmente, en diversas líneas celulares se han reportado estudios que tratan de elucidar su mecanismo de acción. Por un lado Thirugnanam, Xu, Ramaswamy y Gnanasekar (2009) sugieren que el GA dispara una vía apoptótica independiente de la activación de las caspasas en células de cáncer prostático, como la vía apoptótica independiente de caspasas activada por el factor de inducción de apoptosis (AIF por sus siglas en inglés, Apoptosis-inducing factor) al ser translocado al núcleo celular, posterior a su liberación por parte de la mitocondria en disparidad al citocromo C, induce la condensación de la cromática y fragmentación del ADN. Bajo este mismo concepto, Cheuh et al. (2012) sugieren que el GA induce la apoptosis en células de leucemia de ratón WEHI-3 por vías apoptótica independientes de las caspasas resultando en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species) y estrés del retículo endoplasmático por la vía de señalización dependiente de la mitocondria. No obstante estos autores también señalan a la vía de las caspasas 3 como otra posible vía de señalización del GA por la cual induce la apoptosis de células de leucemia de ratón WEI-3 [Cheuh et al., 2012]. También hay que considerar la capacidad del GA de inhibir la vía de señalización del factor de transcripción NF-κB [Salminen et al., 2008], y por tanto la inhibición de la transcripción de varios miembros de la familia de inhibidores de la apoptosis; no obstante la participación de este último en las terapias anticarcinogénicas y la progresión del cáncer es complicada [Parrondo, 2010].

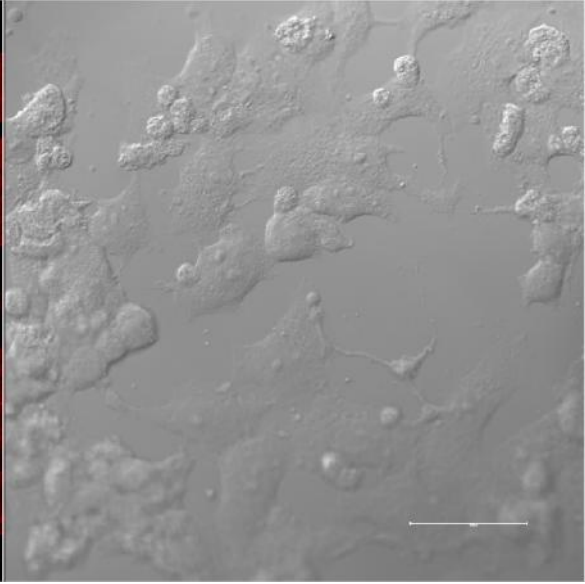
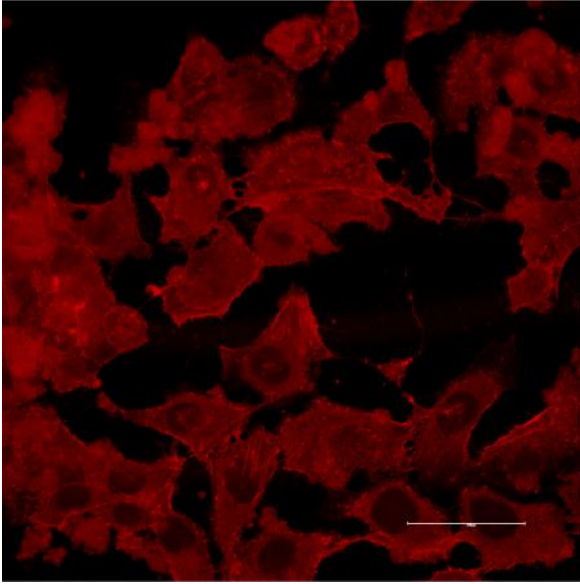
El efecto apoptótico del GA puede que esté relacionado a la estructura de su aglicona, el ácido glicirretínico, el cual al ser evaluado junto con el GA en pruebas de citotoxicidad ha resultado ser más tóxico que el compuesto parental [Lin et al., 2008]. Varios autores han reportado el efecto apoptótico en una gran variedad de células [Hibasami, Iwase, Yoshioka y Takahashi, 2005 y 2006; Lee, 2008; Thirugnanam, Xu, Ramaswamy y Gnanasekar, 2008], así como han logrado aumentar o disminuir su capacidad apoptótica y citotoxicidad al realizar modificaciones a lo largo de la estructura molecular del anillo triterpénico del ácido glicirretínico [Liu et al., 2007; Logashenko et al., 2011].

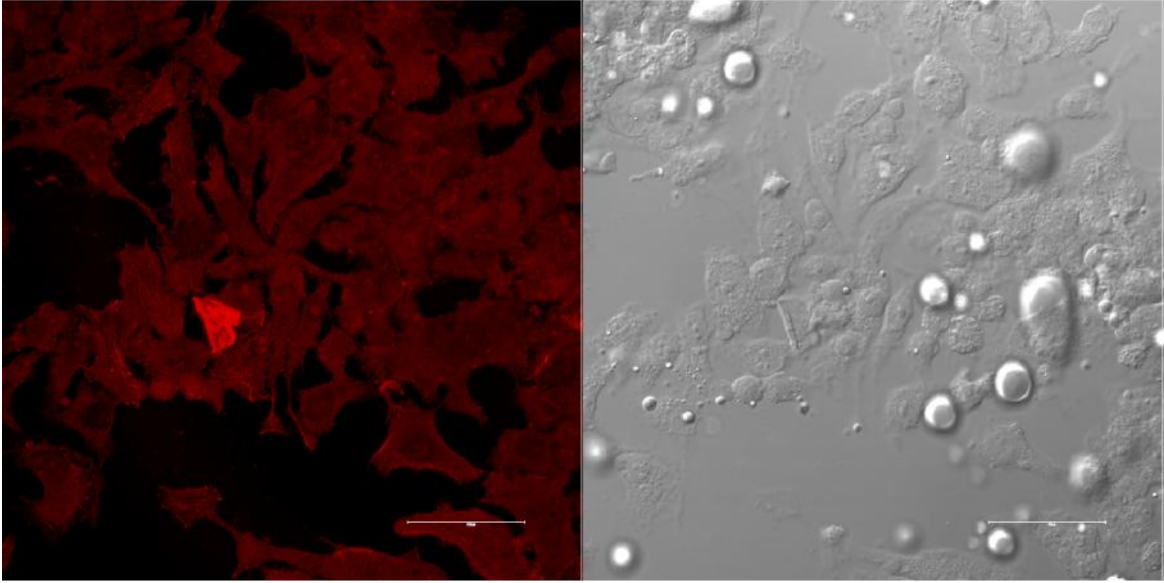
Con los resultados obtenidos podemos decir que el GA a una concentración de 4.843 mM (IC₅₀) en un tratamiento de 24 h. provoca la inducción de la apoptosis en un cultivo de células HeLa, que hasta donde la tinción de Anexina V: FITC permite, es irreversible; es decir, las células se encuentran en diversos estadios de un proceso apoptótico inminente. Sin embargo, hay que tener







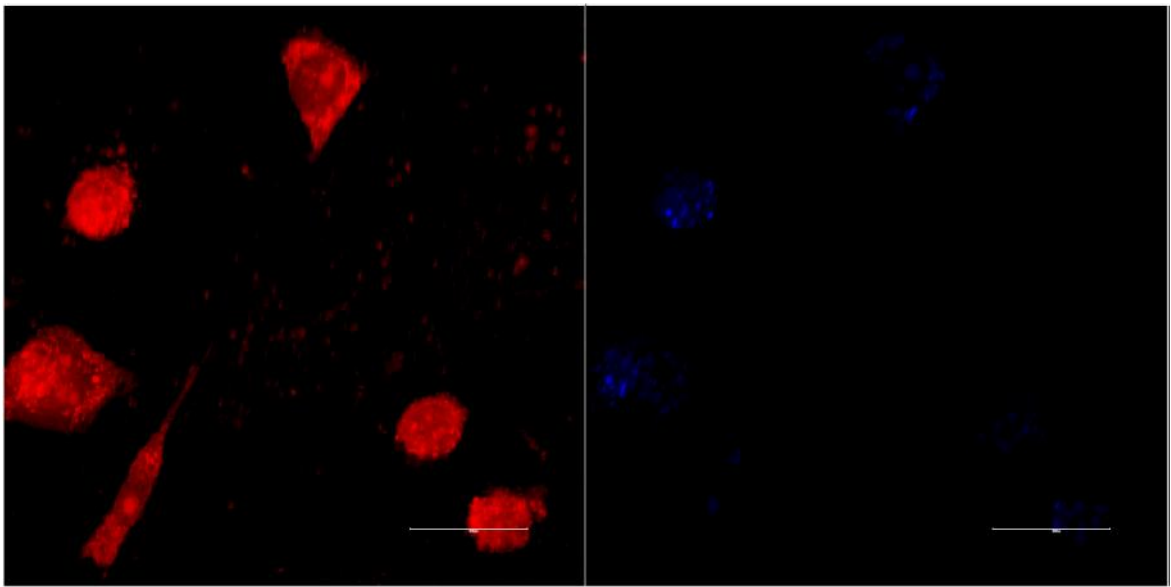
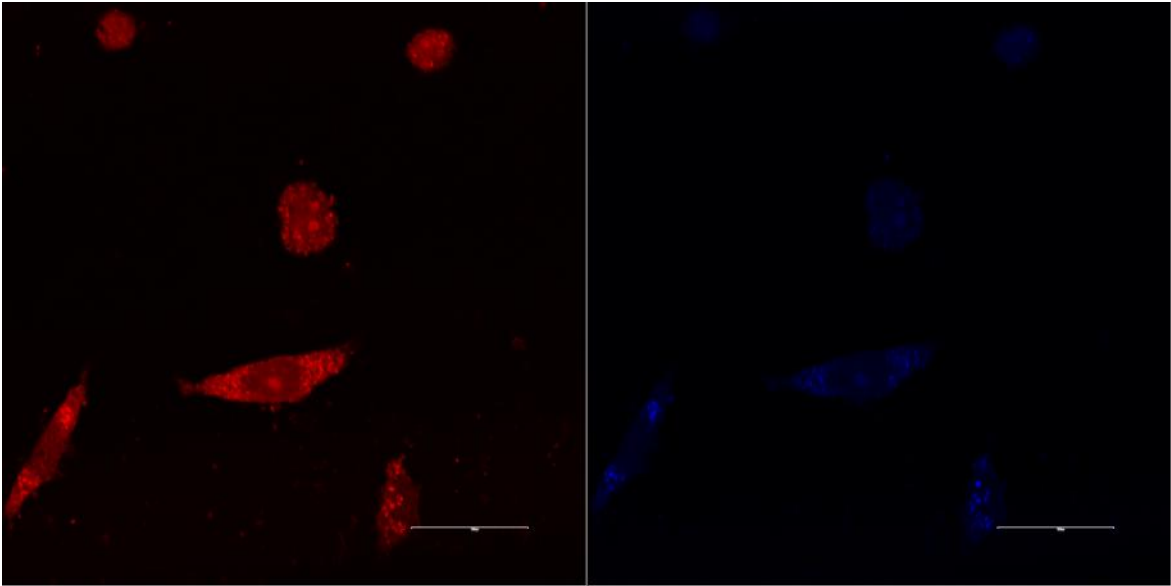




triangulares), en donde se distingue claramente el citoplasma debido al marcaje con rodamina faloidina (Figura 44 A). Para hacer visible el marcaje de las NPs/PVM-MA/RN la imagen fue corregida eliminando la fluorescencia de la rodamina-faloidina considerando su longitud de onda de excitación y emisión (Excitación/Emisión: 538/575 nm), y así en la Figura 44 B se muestra la imagen corregida en donde solo se observa el marcaje correspondiente al rojo nilo (excitación/emisión: 550/750 nm), el cual claramente se nota en forma de puntos localizados dentro de la célula, específicamente en el citosol. Este mismo comportamiento fue obtenido en el cultivo de células HeLa tratado con NPs/PVM-MA/GA + NPs/PVM-MA/RN (Figura 45); de la misma forma en la Figura 45 A se muestra las células con la morfología característica debido al efecto citotóxico del las NPs/PVM-MA/GA (células redondas, pequeñas y contraídas) con marcaje difuso en su interior; mientras que al corregir la imagen y dejar solamente el marcaje correspondiente a NPs/PVM-MA/RN (Figura 45, B) se observa la marcación fluorescente debida al rojo nilo encapsulado en las NPs se encuentra en el interior de las células.

Al comparan las imágenes de la Figura 44 y Figura 45, se puede decir que NPs/PVM-MA tienen la capacidad de cruzar membrana celular en un cultivo de células HeLa y liberar su contenido. Hasta el momento no ha sido reportada esta capacidad de traspasar una barrera como la membrana celular por parte de las NPs/PVM-MA, sin embargo la capacidad de internalización de las NPs puede atribuirse a superficie su tan característica. Las células HeLa fueron cultivadas en medio DMEM:F12 con 10 % de suero de ternera neonato, el cual contiene diversas proteína tales como hormonas, factores de crecimiento, lípidos, proteínas de transporte (de unión), cofactores enzimáticos y factores de unión [Langdon, 2004]; por lo tanto al momento de que las NPs PVM-MA entraron en contacto con el medio de cultivo, por la presencia de sus grupos “activos”, es probable que se hayan establecido interacciones entre la superficie y las proteínas del suero, resultando en el recubrimiento de la NPs/PVM-MA por las proteínas del plasma. De esta forma, las NPs/PVM-MA podrían ser internalizadas por endocitosis celular, ya sea por endocitosis mediada por clatrina o mediada por caveolas (endocitosis mediada por receptores) [Oh y Park, 2014].

Otros factores que deben considerarse y que pueden estar relacionados con la endocitosis de las NPs/PVM-M son su tamaño, forma y propiedades de superficie. Con respecto al tamaño de las NPs, se ha visto que en NPs de poliestireno la internalización es más eficiente cuando estas tiene una talla de 100 nm en células humanas de adenocarcinoma del colon; también NPs poliméricas de carga negativa con diámetros alrededor de los 100 nm presentan una fagocitosis más eficiente por parte de los macrófagos. No obstante, es sabido que la internalización de NPs dentro de las células depende del material del que estén hechas, así como la línea celular en las que se evalúe su internalización [Oh y Park, 2014]. Es importante mencionar que ciertas células neoplásicas han exhibido presentar una actividad endocítica mejorada [Leroux, Doelker, Gurny, 1996].



CAPÍTULO 5

Aunque los resultados mostrados parecen contundentes, debe comprobarse con otras estrategias la capacidad de las NPs/PVM-MA de traspasar la barrera biológica.

Como conclusión de este estudio se puede decir que las NPs/PVM-MA/GA tienen la capacidad de inducir una respuesta citotóxica comparable con aquella del GA (IC_{50}) después de que el fármaco es descargado directamente en el interior de las células carcinogénicas. El efecto citotóxico causado por las NPs/PVM-MA/GA se cree es por medio de la apoptosis, comprobado en esta ocasión con el desarreglo de los fibras de actina.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

Las NPs/PVM-MA fueron preparadas con base a la técnica de nanoprecipitación ya establecida, la cual fue modificada y optimizada determinando las condiciones de pH de la fase acuosa a partir de un diseño experimental. Se estableció un pH de 2.9 como el óptimo para poder obtener un sistema estable y de tamaño de partícula adecuado en el que se pudiera encapsular la mayor cantidad posible de GA. Las NPs/PVM-MA/GA obtenidas con el método de desplazamiento de disolvente desarrollado se describen como partículas de forma esférica individuales de una talla con valor de 176.3 ± 18.7 nm, con una superficie de carga eléctrica negativa que presenta un potencial zeta con valor de -44.8 ± 3.6 y un contenido de GA de 15.07 ± 0.86 μg por cada mg de polímero, considerando un rendimiento de formación de las NPs de 60.53 ± 2.93 %. El GA dentro de las NPs/PVM-MA se encuentra por una parte molecularmente disperso en el seno de la estructura polimérica de las partículas (6.83 ± 0.54 $\mu\text{g}/\text{mg}$); y en mayor proporción (8.24 ± 0.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$) adsorbido en la superficie de las NPs por medio de la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos activos del PVM-MA y los grupos carboxilo e hidroxilo presentes en la molécula de GA. Cabe mencionar que la determinación de la cantidad de GA fue obtenida por medio de la técnica de HPTLC, a partir de un método analítico desarrollado para tal propósito.

Con el fin de evaluar la capacidad de las NPs/PVM-MA/GA de localizar en el sitio de acción la liberación y efecto del fármaco, se realizó el estudio de bioadhesión por medio de la determinación de la interacción entre las NPs desarrolladas y moléculas de mucina, moléculas presentes en el *mucus* responsables de las interacciones mucoadhesivas de las superficies mucosas. Las condiciones de estudio fueron establecidas tratando de estudiar las características más relevantes

del medio que pudieran afectar de manera significativa la interacción bioadhesiva como es el valor del pH del medio; además de evaluar de la presencia de GA adsorbido a la superficie de las NPs. Del diseño experimental se obtuvo que tanto el pH como la presencia del fármaco en la superficie de las NPs afectan la interacción entre la mucina y las NPs desarrolladas. Un cambio de pH de 3.6 ± 0.1 a 5.0 ± 0.1 afecta la capacidad de los grupos carboxilo del PVM-MA de actuar como grupos aceptores de hidrógeno y formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo (grupos donador de hidrógenos) de los oligosacáridos presentes en las moléculas de mucina, ya que los primeros se ionizan, reduciendo la interacción del 26.51 % al 16.53 %. Por otro lado, la adsorción del GA bloquea los grupos carboxilo de la superficie de las NPs impidiendo la formación de las interacciones adhesivas (menor del 10 %). No obstante, se cree que las NPs desarrolladas tiene la interacción mucoadhesiva necesaria como para no ser eliminadas tan rápidamente de la mucosa cervical y tener la capacidad de migrar hacia el epitelio cervical.

La evaluación farmacológica realizada al GA permitió conocer el efecto citotóxico del fármaco sobre células HeLa, determinando la IC_{50} del fármaco (4.843 mM), y posteriormente indagar un poco más sobre el mecanismo de acción por el cual ocasiona el efecto citotóxico, haciendo uso de microscopía de fluorescencia y un marcador fluorescente para determinar la translocación de la fosfatidilserina de la membrana plasmática, y así concluir que la citotoxicidad del GA es mediante la inducción de la apoptosis. A partir de estos resultados se pudo evaluar y comparar el efecto de las NPs/PVM-MA/GA sobre los cultivos celulares. La evaluación con el marcaje del citoesqueleto de las células HeLa permitió determinar los daños provocados por el tratamiento con NPs/PVM-MA/GA, evidenciando cambios en la organización de este, el cual es comparable con aquel provocado por el GA IC_{50} . De este modo, al incorporar el GA en las NPs/PVM-MA es posible disminuir la cantidad de activo necesario para lograr un mismo efecto terapéutico. Por otro lado, al hacer el marcaje fluorescente de las NPs/PVM-MA se pudo observar que estas tienen la capacidad de cruzar membrana celular y liberar su contenido en el interior de la célula. Hasta donde tenemos conocimiento, es la primera vez que se reporta la capacidad de las NPs/PVM-MA de franquear la membrana celular. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con GA mejora al incorporar el fármaco en las NPs/PVM-MA ya que podrían estar liberando el principio activo en el interior de la célula.

A partir de los resultados generados en este trabajo de investigación se puede concluir que las NPs/PVM-MA/GA ofrecen un control espacial sobre la liberación del fármaco debido a las interacciones que establece con la mucosa cervical (interacción bioadhesiva) y la capacidad que mostraron las NPs de internalizarse en las células infectadas por VPH; características que permitirán retardar la eliminación del sistema de liberación y prolongar su tiempo de residencia, lo cual resultaría en la mejora del tratamiento de las lesiones precancerosas del cuello del útero debido a infecciones por el virus de VPH.

Perspectivas

- Determinar qué otros factores pueden influir en la encapsulación del GA con el fin de mejorar la tasa de encapsulación en NPs/PVM-MA.
- Evaluar otros factores que influyan en la estabilidad de las NPs/PVM-MA, e.g. uso de surfactantes.
- Determinar la cinética de liberación del GA a partir de NPs/PVM-MA.
- Evaluar la mucoadhesión de las NPs/PVM-MA/GA haciendo uso de tejido vaginal y determinar el tiempo de residencia considerando otros factores, tomando en cuenta las condiciones *in vivo*.
- Evaluar el efecto citotóxico de las NPs/PVM-MA/GA con otros métodos de detección de la apoptosis, e.g. activación/actividad de las caspasas por medio de citometría de flujo.
- Evaluar la NPs/PVM-MA/GA sobre células CaSki (conteniendo el genoma integrado del VPH tipo 16), C-33 (carcinoma, p53+; pRB+) y células cervicales sanas para determinar si actúan de manera selectiva en células positivas a VPH.
- Hacer uso de otros marcadores celulares de contraste para mejorar la visualización de las NPs/PVM-MA por medio de microscopía confocal; así como evaluar la internalización sobre otro tipo de células carcinogénicas.

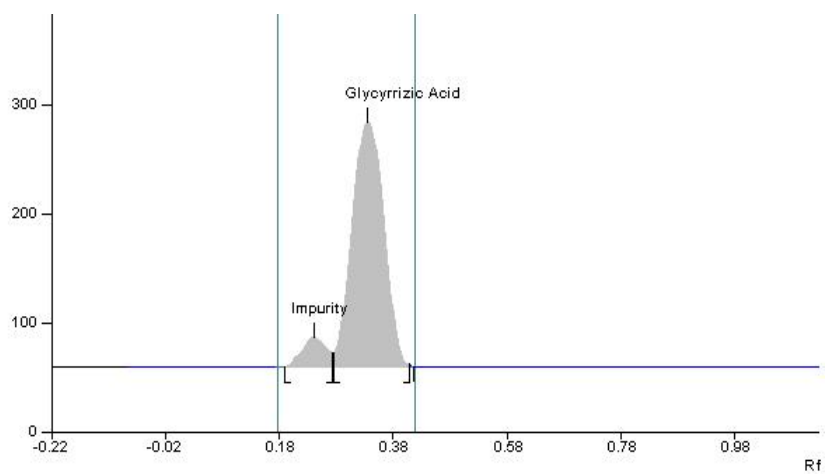
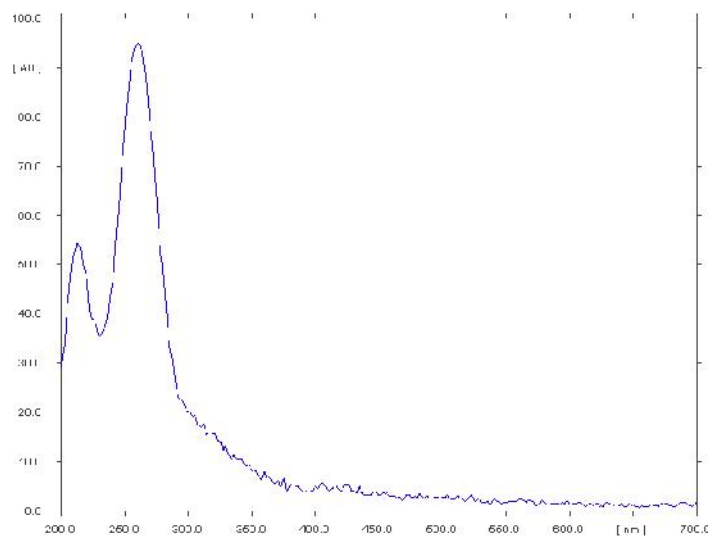
Evaluar la internalización de las NPs/PVM-MA utilizando inhibidores de las principales vías endocíticas (mediada por clatrin o caveolas) y el mecanismo de endocitosis.

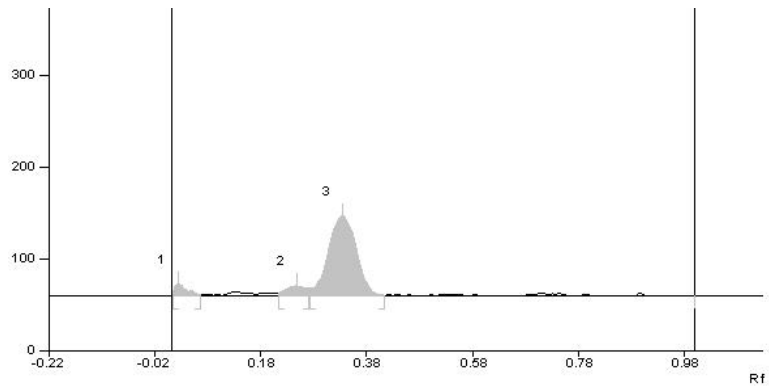
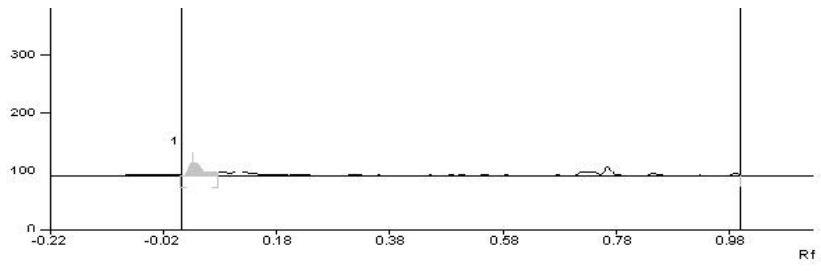
ANEXO 1

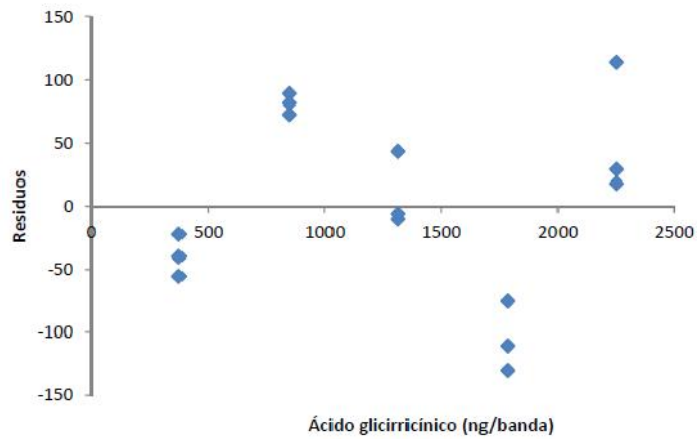
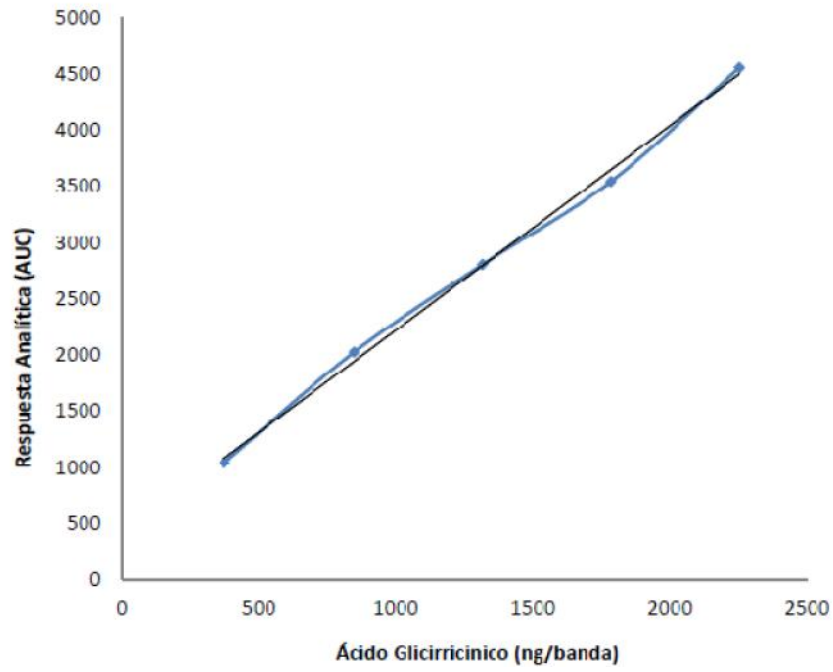
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GA EN NPS/PVM-MA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE HPTLC

En el desarrollo de NPs/PVM-MA/GA, una de las características más importantes es poder determinar el porcentaje de encapsulación de fármaco, para lo cual se propuso el uso de la técnica cromatográfica de HPTLC. La técnica analítica de HPTLC fue elegida porque representa una técnica flexible y versátil que cumple con los requisitos de desempeño requeridos para la cuantificación de fármacos dentro del análisis farmacéutico, en particular para la cuantificación de un analito presente en una matriz compleja (matrices poliméricas). Con base en el tipo de método analítico en estudio, los parámetros de exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango fueron evaluados. Los resultados obtenidos de la validación del método analítico se muestran a continuación:

Especificidad: Se obtuvo el cromatograma de un blanco de reactivos y de la solución estándar de GA, la respuesta analítica obtenida en cada caso fue comparada. La solución de referencia de GA obtuvo una λ_{max} (longitud de onda máxima) de 260 nm (Figura I), por tanto, los cromatogramas de la solución estándar del GA y una solución conteniendo un blanco de reactivos (solución de PVM-MA hidrolizado) fueron obtenidos a esta longitud de onda.







42.64; con un CV por debajo del 2% (nivel 1: 0.79 %, nivel 2: 1.31 % y nivel 3: 1.22%) para cada uno de los niveles evaluados.

Exactitud: Se determinó la respuesta analítica (AUC) de muestras analíticas en un intervalo de concentraciones de 26.3 a 350.3 ng/banda de GA y se relacionó su respuesta analítica a la relación señal-ruido con respecto a una muestra de la solución blanco (90 AUC). La cantidad de GA inmediatamente posterior a aquella que genera una respuesta igual a 3 veces el ruido con respecto a la muestra blanco es de 99.605 ng/banda, siendo esta la concentración mínima de GA que puede ser detectada.

Límite de cuantificación: Se determinó la respuesta analítica (AUC) de muestras analíticas en un intervalo de concentraciones de 26.3 a 350.3 ng/banda de GA y se relacionó su respuesta analítica a la relación señal-ruido con respecto a una muestra de la solución blanco (90 AUC). La cantidad de GA inmediatamente posterior a aquella que genera una respuesta igual a 10 veces el ruido con respecto a la muestra blanco es de 292.0 ng/banda, definiéndose como la concentración mínima de GA que puede ser cuantificada con precisión y exactitud.

Rango: El rango fue obtenido a partir de la linealidad, confirmando que a través del método analítico es posible determinar GA, en un rango de 374 – 2253 ng/banda, en un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión.

Los resultados obtenidos de la evaluación experimental de los parámetros de desempeño cumplen con los criterios de aceptación establecidos; por tanto se concluye que el método analítico para la cuantificación del contenido de GA en NPs/PVM-MA por la técnica de HPTLC está validado.

ANEXO 2

MATERIALES, EQUIPOS Y SOFTWARE

Materiales

- Acetato de etilo (Reactivos Analíticos, México)
- Acetona (Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Ácido acético glacial (J.T. Baker, México)
- Ácido cítrico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Ácido clorhídrico (HCl, Productos Químicos Monterrey, México)
- Agua desionizada GA (Milli-Q[®], Millipore, E.U.A.)
- Alcohol polivinílico, Mowiol[®] 4-88 (PVAL, Glomarza, México)
- Azul de tripano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Clorhidrato de Doxorrubicina, 98.0 -102.0 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Cloruro de sodio
- Dimetilsulfóxido, 99.9 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Etanol (Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Faloidina rodamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Formaldehido (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Fosfato de potasio dibásico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Fosfato de potasio monobásico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Fosfato disódico anhidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Kit Anexina V : FITC (AbD Serotec, Puchheim, Alemania)

- Kit de Ácido Bicinconínico para determinación de proteína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Kit de ensayo de Anexina V : FITC (AbD Serotec, Puchheim, Alemania)
- Línea Celular: HeLa (Carcinoma de cérvix humano, In Vitro, S.A., México)
- Medio Eagle Modificado por Dulbecco/F-12 (1:1), con L-Glutamina, con piruvato de sodio y con bicarbonato de sodio estéril (In Vitro, S.A., México)
- Metanol (Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Metanol HPLC (J.T. Baker, México)
- Mezcla de penicilina – estreptomina 10,000 U/μg/mL en solución salina NaCl al 0.85% estéril (In Vitro, S.A., México)
- Paraformaldehído (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Poli (vinil metil éter-anhídrido maleico), Gantrez[®] AN-109, (PVM-MA, ISP, E.U.A.)
- Rojo nilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Sal de amonio del Ácido Glicirricínico al 95 % (GA, Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich, E.U.A.)
- Suero de Ternera Neonato estéril (In Vitro, S.A.)
- Tripsina – Verseno (0.25 %: 0.1 %) en solución salina de fosfatos sin calcio ni magnesio estéril (In Vitro, S.A., México)
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)

EQUIPOS

- Balanza analítica (Boeco[®] BBC 32, Alemania)
- Balanza microanalítica (Mettler[®], Suiza)
- Calorímetro diferencial de barrido (TA Instruments[®] DSC Q 10, E.U.A)
- Cámara de cultivo tisular de 16 pozos estériles (Lab-Tek, Nunc Inc, Illinois, EUA)
- Cámara para microscopio de fluorescencia (Evolution VF Coled Color, Medical Cybernetis)
- Campana para recubrimiento con oro (JFC-1100, JEOL, Japón)
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen[®] EBA 12, Alemania)
- Charolas de aluminio no herméticas (TA Instruments, E.U.A.)
- Contador submicrónico de partículas (Coulter[®] N4 Plus; E.U.A.)
- Densitómetro (CAMAG[®] TLC Scanner 3, CAMAG, Muttenz, Suiza)
- Espectrofotómetro UV-Vis (Varian[®] Cary IE 95031003; Australia)
- Incubadora (Blue M Electric Company Modelo 200 A, Illinois, EUA)
- Incubadora (Riossa, Modelo EC No. 181932, Estado de México, México)
- Lector de ELISA Multiskan EX (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA)

- Microscopía de fluorescencia (Axios kop 40, Carl Zeiss Microscopy, LLC, Nueva York, E.U.A)
- Microscopio confocal
- Microscopio electrónico de barrido (JEOL® JMS-25SII, Japón)
- Microscopio invertido de contraste de fase (Leider, Ludwigsburg, Alemania)
- Muestreador automático para HPTLC (CAMAG® Automatic TLC Sampler III Version 2.12 Software, CAMAG, Muttenz, Suiza)
- Parrilla con agitación magnética (Cimarec®, Thermoline, E.U.A.)
- pH metro (Corning® 430; Inglaterra)
- Placa de 96 micropozos estériles (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca)
- Placas de aluminio (5x10cm) recubiertas con gel de sílice 60 (0,20 mm de espesor) con indicador de fluorescencia UV 254 nm (MACHEREY-NAGEL Inc. DC-Fertigfolien ALUGRAM® SIL G/UV, Alemania)
- Rotaevaporador (Laborota® Heidolph 4000, Alemania)
- Ultracentrífuga (Beckman® Optima LE 80K, EUA)
- Vórtex (Mixer, modelo M167715, E.U.A.)
- Zetasizer (Malvern Instruments® NSZEN 3600, Reino Unido)

SOFTWARE

- CAMAG® Automatic TLC Sampler III Version 2.12 Software, CAMAG, Muttenz, Suiza
- Q Capture Pro 7 Software, QImaging, Surrey, Canadá
- GraphPad Prism®, GraphPad Software, Inc., California, E.U.A

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Rosas, I, Alcalá-Alcalá, S., Llera Rojas, V y Ganem-Rondero, A., 2015.** Preparation and characterization of mucoadhesive nanoparticles of poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) containing glycyrrhizic acid intended for vaginal administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41 (10), pp. 1632-1639.
- Ahuja, A., Khar, R.K., Ali, J., 1997.** Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23 (5), 489-515.
- Amagaya, S. et al., 1984.** Comparative studies of the stereoisomers of glycyrrhetic acid on anti-inflammatory activities. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*. 7 (12), pp. 923-928.
- Andrews, G.P., Lavery, T.P., Jones D.S., 2009.** Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3). pp. 505-518.
- Andrianifahanana, Moniaux y Batra, 2006.** Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cáncer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1765 (2), pp. 189-222.
- Arbós, P. et al., Instituto Científico y Tecnológico de Navarra, S.A., 2004.** Fabricación de nanopartículas a base del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico para la administración de fármacos de naturaleza hidrofílica, en particular de bases púricas y pirimidínicas. España. Pat. 2 178 961
- Arbós, P. et al., 2002.** Gantrez[®] AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticles conjugates. *Journal of Controlled Release*, 88 (3), pp. 321-330.
- Arbós, P. et al., 2003.** Influence of the surface characteristics of PVM/MA nanoparticles on their bioadhesive properties. *Journal of Controlled Release*, 89 (1), pp. 19-30
- Augustin, J.M., Kuzina, V., Andersen, S.B., Bak, S., 2011.** Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6), pp. 435-457.
- Baba y Shigeta, 1987.** Antiviral activity of glycyrrhizin against varicela-zoster virus in vitro. *Antiviral Research*, 7 (2), pp. 99-107.
- Badam, L., 1997.** In vitro antiiral activity of indigenous glycyrrhizin, licorice and glycyrrhizic acid (Sigma) on Japanese encephalitis virus. *The Journal of Communicable Diseases*, 29 (2), pp. 91-99.
- Balbatina, Jr., L.A. et. al., 2010.** Synthesis and antiviral activity of 18 α -glycyrrhizic acid and its esters. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 44 (6), pp. 299-302.
- Bansil y Turner 2006.** Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11 (2-3), pp. 164-170.
- Beck-Broichsitter, M. et. al., 2010.** Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the "ouzo" región" upon drug loading. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41 (2), pp. 244-253.
- Beija, M. et al., 2012.** Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. *Trends in Biotechnology*, 30 (9), pp. 485-496
- Bernad-Bernad M.J., Ganem-Rondero, A., Melgoza-Contreras, L.M., Quintanar-Guerrero, D., 2003.** Sistemas de Liberación Controlada de Activos Farmacéuticos. Asociación Farmacéutica Mexicana A.C. pp. 8-11.
- Bilati, U., Allémann, E., Doelker, E., 2005.** Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24 (1), pp. 67-75.

- Bodor, N. y Buchwald, P., 2001.** Drug targeting by retrometabolic design: Soft drugs and chemical delivery systems. En: H. Schreier, ed. 2001. *Drug Targeting Technology: Physical, Chemical and Biological Methods*. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 163.
- Burgess, D.J., 2007.** Colloids and colloid drug delivery system. . En: J. Swarbrick, ed. 2007. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3ra ed. Nueva York :Informa Healthcare USA Inc., pp. 642 – 645.
- Carrillo-Pacheco, A., Hernández-Valencia, M., Hernández-Quijano, T., Zárate, A., 2012.** Terapéutica en infección por virus del papiloma humano. *Ginecología y Obstetricia de México*, 80 (11), pp. 712-719.
- Cázares-Delgado, J., et. al., 2005.** Skin permeation enhancement by sucrose esters: A pH- dependent phenomenon. *International Journal of Pharmaceutics*, 297 (1-2), pp. 204 – 212.
- Cheuh, F-S. et al., 2012.** Glycyrrhizic acid induces apoptosis in WEHI-3 mouse leukemia cells through the caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Oncology Reports*, 28 (6), pp. 2069-1076.
- Chung, K.H., Wu, C.S. y Malawer, E.G., 1990.** Glass transition temperatura of poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) (PMVEMA) and poly (methyl vnyl ether-co-maleic acid) (PMVEMAC) and the kinetics of dehydration of PMVEMAC by termal analysis. *J Appl Polym Sci*, 41 (3-4), pp. 793-803.
- Cinatl et al., 2003.** Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet*, 361 (9374), pp. 2045-2046.
- Costa, P. y Sousa Lobo J. M., 2001.** Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 (2), pp. 123-133.
- Couvreur, P., Couarraze, G., Devissaguet, J-P., Puisieux, F., 1996.** Nanoparticles: preparation and characterization. En: S. Benita, ed. 1996. *Microencapsulation: Methods and Industrial applications*. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 183-211.
- Curreli, F., Friedman-Kien, A.E., Flore, O., 2005.** Glycyrrhizic acid alters Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency, triggering p53 mediated apoptosis in transformed B lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (3), pp. 642-652.
- Dai, J.H. et. al., 2001.** Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophages. *Immunology*, 103 (2), pp. 235-243.
- das Neves, J., Nunes, R., Machado, A. y Sarmiento, B., 2014.** Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Diciembre 27, pp. pii: S0169-409X(14)00309-3.
- Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L., Chowdhurt, P., 2010.** Kinetic Modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 67 (3), pp. 217-223.
- Davis, E.A., Morris, D.J., 1991.** Medicinal Uses of Licorice Through the Millennia: the Good and Plenty of It. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 78 (1-2), pp. 1-6.
- Desouza, M., Gunning, P.W. y Stehn,J.R., 2012.** The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. *Bioarchitecture*, 1;2 (3), pp. 75-87.
- Domínguez Gómez, J., Daniel Simón, R., Abreu Daniel, A., Zelenkova, H., 2012.** Effectiveness of Glycyrrhizinic acid (Glizigen) and an Immunostimulant (Viusid) to treat anogenital warts. *International Scholarly Research Network*, 20120, 6 pages.
- Dragustinovis, R.E. et. al., 2007.** La aplicación del ácido glicirricínico en formulación con un gel termorreversible; en cérvix uterino con infección por virus del papiloma humano disminuye la carga viral: reporte de casos. En; *Revista de Salud Pública y Nutrición*, 2ndo. *Congreso de nacional de química médica*. Querétaro, México 2-8 Septiembre 2006. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Duchene, D., Touchar, F., Peppas, N.A., 1988.** Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 14 (2-3), 283-318.
- Elmore, S., 2007.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35 (4), pp. 495-516.
- Fenwick, G.R., Lutomski, J., Nieman, C., 1990.** Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L. – Composition, Uses and Analysis. *Food Chemistry*, 30 (2), pp. 119-143.
- Fiore, C. et al., 2005.** A History of the Therapeutic Use of Liquorice in Europe. *Journal of Ethnopharmacology*, 99 (3), pp. 317-324.
- Francis, G. et al., 2002.** The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88 (6), pp. 587-605.
- Fu y Kao, 2010.** Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7 (4), pp. 429-444.

- Gandhi et al., 2004.** Radioprotection of DNA by glycyrrhizic acid through scavenging free radicals. *Journal of Radiation Research*, 45 (3), pp. 461-468.
- Glicksman, M., 1963.** Utilization of Synthetic Gums in the Food Industry. En: C.O. Chichester, E.M. Mrak y G.F. Stewart, eds. 1963. *Advances in Food Research*, Volumen 12. Londres : Academic Press Inc., pp. 346-349.
- Groen, J. et al., 1951.** Effect of glycyrrhizic acid on the electrolyte metabolism in Addison's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 31 (1), pp. 87-91.
- Guozhong, C., 2004.** Nanostructures and Nanomaterials. Synthesis, Properties and Applications. Imperial College Press. Londres, 2004. pp. 15-50.
- Häcker, G., 2000.** The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research*, 301 (1), pp. 5-17.
- Haskell, R.J., 2006.** Physical characterization of nanoparticles. En: R.B. Gupta y U.B. Kompella, eds. 2006. *Nanoparticles Technology for Drug Delivery*. New York: Taylor & Francis Group, LLC. pp. 103-120.
- Hayashi, H. et al., 2001.** Cloning and characterization of a cDNA encoding β -amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27 (7), pp. 1086-1092.
- Hayashi, H. et al., 2004.** Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in glycyrrhiza glabra. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27 (7), pp. 1086-1092
- Hernández-Valencia, M. et. al., 2011.** Clinical response to glycyrrhizic acid in genital infection due to human papillomavirus and low-grade squamous intraepithelial lesión. *Clinics and Practice*, 1 (4), pp. 200-202.
- Herrmann, F. y Wink, M., 2011.** Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes. *Phytomedicine*, 18 (13), pp. 1191-1196.
- Hibasami, H., Iwase, H., Yoshioka, K. y Takahashi, H., 2005.** Glycyrrhizin induces apoptosis in human stomach cancer KATO III and human promyelotic leukemia HL-60 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 16 (2), pp. 233-236.
- Hibasami, H., Iwase, H., Yoshioka, K. y Takahashi, H., 2006.** Glycyrrhetic acid (a metabolic substance and aglycon of glycyrrhizin) induces apoptosis in human hepatoma, promyelotic leukemia and stomach cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 17 (2), pp. 233-236.
- Hidalgo Martínez, A.C., 2006.** El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Revista Biomédica*, 17 (1), pp. 81-84.
- Hoffman, A.S., 2008.** The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 132 (3), pp. 153-163.
- Hostettman, K., Marston, A., 1995.** Saponins. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 1-3, 239, 245-247.
- Hurtta, M., Pitlänen I. y Knuutinen, J., 2004.** Melting behaviour of D-sucrose, D-glucose and D-fructose. *Carbohydrate Research*, 339 (13), pp. 2267-2273.
- Irache, J.M., et. al., 2005.** Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules*, 10 (1), pp. 126-145.
- Khan, R. et al., 2013.** Glycyrrhizic acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis an apoptosis in the colon of wistar rats. *PLoS One*, 8 (2), e56020
- Koide, M., Ukawa, J., Tagaki, W., Tamagaki, S., 1997.** Hydrolysis of nonionic ester surfactants facilitated by potassium β -glycyrrhizinate: implication of catalytic functions played by the carboxyl groups. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74 (1), pp. 49-54.
- Kondo, M. et al., 1986.** Physicochemical properties and applications of α - and β - glycyrrhizins, natural surface active agents in licorice root extract. *Journal of the Society of Cosmetic Chemist*. 37 (3), pp.(177-186)
- Konoshima y Takasaki, 2002.** Cancer-chemopreventive effect of natural sweetener and related compounds. *Pure and Applied Chemistry*, 74 (7), pp. 1309-1316.
- Korichneva, I y Hämmerling, U, 1999.** F-actin as a functional target for retro-retinoids: a potential role in anhydroretinol-triggered cell death. *Journal of Cell Science*, 122 (Pt 15), pp. 2521-2528.
- Kreuter, J., 1994a.** Preface. En: J. Kreuter, ed. 2004. *Colloidal Drug Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker, Inc., p. iii-iv
- Kreuter, J., 1994b.** Nanoparticles. En: J. Kreuter, ed. 2004. *Colloidal Drug Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 219-342.
- Kreuter, J., 2007.** Nanoparticles – a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331 (1), pp. 1-10.

- Lacaille-Dubois, M.A. y Wagner, H., 1996.** A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, 2 (4), pp. 363-386.
- Langdon, S.P., 2004.** Basic Principles of Cancer Cells. En: S.P. Langdon, ed. 2004. *Methods in Molecular Medicine, Vol 88: Cancer Cell Culture Methods and Protocols*. Totowa : Humana Press Inc., pp. 3-15, 25.
- Lazcano-Ponce, E. et. al., 2008.** Decreasing cervical cancer mortality in Mexico: effect of papanicolaou coverage, birthrate, and the importance of diagnostic validity of cytology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17 (10). pp. 2808-2817.
- Lee, C.S. et al., 2008.** 18 β -Glycyrrhetic acid induces apoptotic cell death in SiHa cells and exhibits a synergistic effect against antibiotic anti-cancer drug toxicity. *Life Sciences*, 83 (13-14), pp. 481-489.
- Leroux, J-C., Doelker, E., Gurny, R., 1996.** The use of drug-loaded nanoparticles in cancer chemotherapy. En: S. Benita, ed. 1996. *Microencapsulation: Methods and Industrial applications*. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 183-211.
- Lewis, M.J., 2004.** *Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe*. Washington, D.C.: OPS (Organización Panamericana de la Salud). Disponible en: <<http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/nc/pcc-cc-sit-data.htm>> [Citado: 20 de Enero 2013].
- Li, V.H.K., Robinson, J.R., Lee, V.H.L., 1987.** Influence of Drug Properties and Routes of Drug Administration on the Design of Sustained and Controlled Release of Systems. En: J.R. Robinson, V.H.L. Lee, eds. 1987. *Controlled Drug Delivery Fundamentals and Applications*, 2nda ed. Nueva York : Marcel Dekker, Inc., pp. 3-61.
- Liao, W.C., Lin, Y., Chang, T., Huang, W., 2012.** Identification of Two Licorice Species, *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra*, based on separation and identification of their bioactive components. *Food Chemistry*, 132 (4). pp. 2188-2193.
- Lin, J-C. et al., 2008.** Inhibitory effects of some derivatives of glycyrrhizic acid against Epstein-Barr virus infection: Structure-activity relationships. *Antiviral Research*, 79 (1), pp. 6-11
- Lin, Jung-Chung, 2003.** Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro. *Antiviral Research*, 50 (1), pp. 41-47.
- Liu, D. et al., 2007.** The synthesis of 18 β -glycyrrhetic acid derivatives which have increased antiproliferative and apoptotic effects in leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15 (16), pp. 5432-5439.
- Logashenko, E.B. et al., 2011.** Synthesis and pro-apoptotic activity of novel glycyrrhetic acid derivatives. *ChemBioChem*, 12 (5), pp. 784-794.
- Luzardo-Alvarez, A. et. al., 2006.** Effect of formulation variables on the prediction of release from microparticles with experimental design. *Journal of Applied Polymer Science*, 102 (5), pp. 4546-4553
- Mainardes et al., 2006.** Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 42 (4), pp. 523 -530.
- Man, S. et al., 2010.** Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, 81 (7), pp. 703-714.
- McCredie et al., 2008.** Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *The Lancet. Oncology*, 9 (5), pp. 425-434.
- Mishra, B., Patel, B.B., Tiwari, S., 2010.** Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6 (1), pp. 9 -24.
- Mizutani, H. et. al., 2005.** Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sciences*, 76 (13), pp. 1439-1453
- Moscicki, A., Schiffman, M., Kjaer, S., Villa, L.L., 2006.** Chapter 5. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, 24 (S2), S3/42-S3/51.
- Naahidi, S. et al., 2013.** Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 166 (2), pp. 182-194.
- Nassiri, M. y Hosseinzadeh, H., 2008.** Review oh pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*, 22 (6), pp. 709-724.
- National Library of Medicine's TOXNET system, 2012.** Hazardous Substances Data Bank (HSDB) [online] Disponible en: <<http://toxnet.nlm.nih.gov>> [Citado: 27 de Agosto 2012]

Nishino H., Kitagawa, K. e Iwashima, A., 1984. Antitumor-promoting activity of glycyrrhetic acid in mouse skin tumor formation induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene plus teleocidin. *Carcinogenesis*, 5 (11), pp. 1529-530.

Niu, G., Xie, Y., Lou, J., Liu, H., 2005. Isolation and purification of glycyrrhizic acid with solvent extraction. *Separation and Purification Technology*, 44 (3), pp. 189-196.

Nomura, T., Fukai, T., Akiyama, T., 2002. Chemistry of Phenolic Compounds of Licorice (*Glycyrrhiza* species) and their estrogenic and cytotoxic activities. *Pure and Applied Chemistry*, 74 (7), pp. 1199-1206.

Oh, N. Park, J-H., 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9 (Suppl I), pp. 51-63.

Ohuchi, K., Kamada, Y., Levine, L., Tsurufuji, S., 1981. Glycyrrhizin inhibits prostaglandin E2 production by activated peritoneal macrophages from rats. *Prostaglandins and Medicine*, 7 (5), pp. 457-463.

Parrondo, R. et al., 2010. NF- κ B activation enhances cell death by antimitotic drugs in human prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 9 (9), pp. 182

Parveen, S., Misra, R. y Sahoo, S.K., 2012. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8 (2), pp. 147-166.

Pashley, R. M. y Karaman, M.E., 2004. Applied Colloid and Surface Chemistry. West Sussex:John Wiley & Sons Ltd., pp. 1 – 12.

Peppas, 2013. Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (1), pp. 5-9.

Peppas, N.A. y Huang, Y., 2004. Nanoscale technology of mucoadhesive interactions, 56 (11), pp. 1675-1687.

Peppas, N.A., Little, M.D., Huang, Y., 2000. Bioadhesive Controlled Release Systems. En: Wise, D.L., 2000. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. Nueva York : Marcel Dekker., pp. 255 – 269.

Petel, M.M. et al., 2003. Mucin/poly(acrylic acid) interactions: a spectroscopic investigation of mucoadhesion. *Biomacromolecules*, 4 (5), pp. 1184-1190.

Pillai, O. y Panchagnula, S., 2001. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5 (4), 447–451.

Pompei et al., 1979. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature*, 281 (5733), pp. 689-690.

Quintanar-Guerrero, Allemann, Fessi y Doelker, 1998. Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23 (12), pp. 1113-1128.

Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J. y Veiga, F., 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2(1), pp. 8-21.

Rodríguez, I.C., Cerezo, A., Salem, I.I., 2000. Sistemas de liberación bioadhesivos. *Ars Pharmaceutica*, 41 (1), pp. 115-128.

Rouseel, P. et al, 1988. The complexity of mucins. *Biochemie*, 70 (11), pp. 1471-1482.

Rowe, R.C., Sheske, P.J. y Quinn, M.E., 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients, Ed. 6ta. Londres : Pharmaceutical Press, pp. 534-535.

Ruiz, MCR. et al., 2009. Efficient synthesis of glycyrrhetic acid glycoside/glucuronide derivatives using silver zeolite as promoter. *Carbohydrate Research*, 344 (9), pp. 1063 – 1071.

Salminen, A. et. al., 2008. Terpenoids: natural inhibitors of NK- κ B signalling with anti-inflammatory and anticancer potential, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (19), pp. 2979-2999.

Sato et al., 1996. Therapeutic basis of glycyrrhizin on chronic hepatitis B. *Antiviral Research*, 30 (2-3), pp. 171-177.

Schreier, H., 2001. Preface. En: H. Schreier, ed. 2001. *Drug Targeting Technology: Physical, Chemical and Biological Methods*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Scientific Committee on Food, 2003. Opinion of the scientific committee on food on glycyrrhizic acid and its ammonium salt. [online] Bruselas: European Commission Health & Consumer Protection Directorate – General. Disponible en: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out186_en.pdf> [Citado: 28 de Agosto 2012]

Secretaría de Salud, 2007. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino.

- Secretaría de Salud, 2010.** *Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Cérvicouterino*. México: CENETEC.
- Shargorodskaya, A.V. et al., 2013.** Experience in using a glycyrrhizic acid preparation in Young women with persistent papillomavirus infection, *The Obstetrics and Gynecology*, 2, pp. 119-123.
- Shibata, S., 2000.** A Drug Over the Millennia: Pharmacognosy, Chemistry, and Pharmacology of Licorice. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 120 (10), pp. 849-862.
- Shinada, M. et. al., 1986.** Enhancement of interferon- γ production in glycyrrhizin-treated human peripheral lymphocytes in response to concanavalin A and to surface antigen of hepatitis B virus. *Proceedings of the society of experimental biology and medicine*, 181 (2), pp. 205-210.
- Smart, J.D., 2005.** The basics and underlying mechanism of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (11), pp. 1556-1568.
- Sparg, S.G., Light, M.E y van Stade, J., 2004.** Biological activities and distributio of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94 (2-3), pp. 219-243.
- Steenbergen, R.D.M. et al., 2005.** HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *Journal of Clinical Virology*, 32 (supplement 1), pp. S25-S33.
- Sun, C., Xie, Y., Tian, Q., Liu, H., 2007.** Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 305 (1-3), pp. 42-47.
- Sung, M.W., Li, P.C.H., 2004.** Chemical analysis of ray, dry-roasted, and honey-roasted licorice by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*,
- Takahara, Watanabe y Shiraki, 1994.** Effects of glycyrrhizin on hepatitis B surface antigen: a biochemical and morphological study. *Journal of Hepatology*, 21 (4), pp. 601-609.
- The United States Pharmacopeial Convention, 2008.** The United States Pharmacopeia 31-National Formulary 26 and its Supplements.
- Thirugnanam, S., Xu, L., Ramaswamy, y Gnanasekar, M., 2008.** Glycyrrhizin induce apoptosis in prostate cancer cell lines DU-145 and LNCaP. *Oncology Reports*, 20 (6), pp. 1387-1392.
- Van Rossum T.G.J. et. al., 1998.** Review article: glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 12 (3), pp. 199-205.
- WHO Media Center, 2011.** *Sexually transmitted infections*. [online] WHO (World Health Organization). Disponible en: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>> [Citado: 20 de Enero 2013].
- WHO, 2010.** *Strengthening cervical cancer prevention and control. Report of the GAVI-UNFPA-WHO meeting*. December 2009. [online] Geneva: WHO. Disponible en: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/cancers/rhr_10_13/en/index.html> [Citado: 20 de Enero 2013].
- WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre), 2010** *Human Papillomavirus and Related Cancers in México. Summary Report 2010*. Disponible en: <<http://www.who.int/hpvcentre>> [Citado: 20 de Enero 2013].
- Wolkerstorfer, A., Kurz, H., Bachhofner, N. y Szolar, O.H.J., 2009.** Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Research*, 83 (2), pp. 171-178.
- Yi, H., Nakashima, I., Isobe K., 1996.** Enhancement of nitric oxide production from activated macrophages by glycyrrhizin. *The American Journal of Chinese Medicine*, 24 (3-4), pp. 271-278.
- Yin, Y. et al., 2006.** Preparation and evaluation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin. *Journal of Controlled Release*, 116 (3), pp. 337-345.
- Yoncheva, K., Lizarraga, E., Irache, J.M., 2005.** Pegylated nanoparticles base on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(5), pp. 411-419.
- Zhang, H. et al., 2009.** Purification of flavonoids and triterpene saponins from the licorice extract using preparative HPTLC under RP and HILIC mode. *Journal of Separation Science*, 32 (4), pp. 526-535.
- Zhang, Q. Ye, M., 2009.** Chemical Analysis of the Chinese herbal Medicine Gan-Cao (licorice). *Journal of Chromatography A*, 1216 (11), pp. 1954-1969.
- Zhao, MX., Ji, LN. y Mao, ZW., 2012.** B-cyclodextrin/Glycyrrhizic acid functionalized quantum dots selectively enter hepatic cells and induce apoptosis. *Chemistry – A European Journal*, 18 (6), pp. 1650-1658.