



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Sistemas poliméricos nanoestructurados de péptidos inhibidores del HIV-1 derivados del GB virus C (GBV-C)

Martha Rocío Ariza Sáenz

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DEL'ALIMENTACIÓ  
DEPARTMAENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y FISICOQUÍMICA

SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOESTRUCTURADOS DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DEL HIV-1  
DERIVADOS DEL GB VIRUS C (GBV-C)

Memoria presentada por Martha Rocío Ariza Sáenz para optar al título de doctor  
por la Universidad de Barcelona

Directoras

Dra. Maria Luisa García  
Profesora Titular  
Dep. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica  
Y Físicoquímica, UB

Dra Isabel Haro Villar  
Investigador Cinético  
Dpt. Química Biomédica  
IQAC-CSIC

Tutora

Dra. Maria Luisa García  
Dep. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica  
Y Físicoquímica, UB

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1. GBVIRUS C.</b> .....	<b>9</b>
1.1.1. Estructura del GBV-C .....	9
1.1.2. Tropismo y replicación del GBV-C .....	10
1.1.3. Glicoproteínas de fusión.....	11
<b>1.2. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)</b> .....	<b>12</b>
1.2.1. Interacción VIH-células .....	12
1.2.2. Replicación del VIH-1 en el tracto genital.....	14
1.2.3. Interacción de GBV-C con VIH-1.....	15
<b>1.3. PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA FUSIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4. SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ACTIVOS</b> .....	<b>19</b>
1.4.1. Nanoparticulas.....	19
1.4.2. Polímeros utilizados en la fabricación de las NPs.....	20
1.4.2.1. Polímeros hidrolíticamente degradables .....	20
1.4.2.2. Poli-(orto ésteres) .....	22
1.4.2.3. Polímeros enzimáticamente degradables.....	23
1.4.3. Métodos utilizados en la fabricación de NPs .....	25
1.4.3.1. Evaporación del solvente.....	25
1.4.3.2. Salting-out .....	26
1.4.3.3. Nanoprecipitación .....	26
1.4.4. Caracterización de sistemas poliméricos nanoparticulados .....	27
1.4.4.1. Morfología.....	28
1.4.4.2. Tamaño y polidispersidad .....	28
1.4.4.3. Potencial-Zeta.....	29
1.4.5. Interacciones biofísico-químicas en la Nano-Biointerfase.....	30
1.4.6. NPs: Sistemas de transporte y liberación de péptidos terapéuticos.....	31
1.4.7. Aplicación de NPs poliméricas como sistemas de liberación de péptidos por diferentes vías .....	33
1.4.7.1. Vía oral .....	33
1.4.7.2. Vía parenteral .....	34
1.4.7.3. Vía pulmonar .....	35
1.4.7.4. Vía transdermal .....	35
1.4.7.5. Vía ocular .....	36
<b>1.5. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA MUCOSA VAGINAL</b> .....	<b>36</b>
1.5.1. La mucosa vaginal como vía de administración de fármacos .....	38
1.5.2. NPs como sistemas de liberación de Fármacos a través de la mucosa vaginal.....	40
1.5.3. Nps como sistemas de liberación vaginal para la prevención del VIH-1.....	42
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>

<b>2.1. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>45</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 REACTIVOS Y SOLVENTES .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPOS.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPPS) .....</b>	<b>51</b>
3.3.1. Acoplamiento y activación de los L-aminoácidos .....	53
3.3.2. Test de detección de grupos amino .....	54
3.3.2.1. Test de Kaiser o Ninhidrina .....	54
3.3.2.2. Test de Cloranilo.....	55
3.3.2.3. Test del TNBS.....	55
3.3.3. Desprotección del grupo $\alpha$ -amino .....	55
3.3.4. Derivatización de los péptidos con sondas fluorescentes .....	55
3.3.5. Desanclaje y desprotección.....	56
<b>3.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS.....</b>	<b>56</b>
3.4.1. Caracterización analítica de los péptidos por HPLC .....	56
3.4.2. Caracterización de los péptidos por UPLC/ES-MS .....	57
3.4.3. Caracterización de los Péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF .....	57
<b>3.5. DESALACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS.....</b>	<b>57</b>
3.5.1. Purificación de los péptidos en HPLC a escala semi-preparativa.....	57
3.5.2. Extracción en fase sólida .....	58
<b>3.6. DISEÑO DE LAS GC-PLGA-NPS .....</b>	<b>58</b>
3.6.1. Optimización de las GC-PLGA-NPs que contienen E1P47 .....	59
3.6.2. Encapsulación de P6-2, P6-2-FAM y E1P47-FAM en GC- PLGA-NPs.....	61
<b>3.7. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE P6-2 Y E1P47 .....</b>	<b>62</b>
3.7.1. Condiciones cromatográficas .....	64
3.7.2. Descripción de la espectrometría de masas .....	65
3.7.3. Preparación de las muestras .....	65
3.7.4. Linealidad y rango .....	66
3.7.5. Precisión y exactitud .....	66
3.7.6. Sensibilidad.....	67
<b>3.8. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LAS GC-PLGA-NPS .....</b>	<b>67</b>
3.8.1. Morfometría.....	67
3.8.2. Carga superficial .....	68
3.8.3. Caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión.....	68
3.8.4. Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE %) .....	69
3.8.5. Estudios de difracción de Rayos-X.....	69
3.8.6. Estudios de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) .....	70

3.8.7. Estudios de estabilidad a corto plazo .....	70
3.8.8. Estudios de liberación in vitro .....	71
3.8.9. Análisis de aminoácidos .....	72
<b>3.9. ENSAYOS DE CAPTACIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....</b>	<b>73</b>
<b>3.10. ESTUDIOS EX VIVO E IN VIVO .....</b>	<b>75</b>
3.10.1. Estudios ex vivo de penetración y permeacion de NPsP6-2-FAM .....	76
3.10.2. Estudios in vivo de penetración y toxicidad de las NPsP6-2-FAM .....	77
3.10.3 Estudios de permeacion ex vivo e in vivo de NPsE1P47 .....	79
<b>3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....</b>	<b>80</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
<b>4.1. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS P6-2 Y E1P47.....</b>	<b>82</b>
<b>4.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>88</b>
4.2.1. Validación de HPLC UV-VIS para P6-2 .....	88
4.2.2. Validación de HPLC UV-VIS para E1P47 .....	89
4.2.3. Validación de HPLC ESI-MS/MS para P6-2 .....	91
4.2.4. Validación de HPLC ESI-MS/MS para E1P47 .....	92
<b>4.3. DISEÑO DE LAS GC-PLGA-NPS.....</b>	<b>94</b>
4.3.1. Diseño factorial .....	96
4.3.2. Caracterización fisicoquímica y morfológica las GC-PLGA-NPs.....	100
4.3.3. Análisis de aminoácidos de NPsP6-2 .....	105
4.3.4. Estudios in vitro.....	107
4.3.4.1 Estudios de liberación in vitro de NPsE1P47.....	107
4.3.4.2. Estudios de liberación in vitro de NPsP6-2.....	108
4.3.4.3. Estudios de captación celular .....	110
<b>4.4. ESTUDIOS EX VIVO .....</b>	<b>113</b>
4.4.1. Evaluación de la permeacion de NPsE1P47 y NPsP6-2 .....	113
4.4.2. Evaluación de la penetración de NPsP6-2-FAM.....	115
<b>4.5. ESTUDIOS IN VIVO .....</b>	<b>116</b>
4.5.1. Evaluación de la permeacion de NPsE1P47.....	117
4.5.2. Evaluación de la penetración de NPsP6-2-FAM.....	117
4.5.3. Evaluación de la toxicidad in vivo de las NPsP6-2-FAM.....	119
<b>6. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>120</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>130</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>132</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>148</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa Genético del GBV-C.....	10
Figura 2. Estructura de las proteínas de envoltura del GBV-C.....	12
Figura 3. Esquema de la exposición del FP y fusión viral a la membrana celular.....	14
Figura 4. Esquema de técnicas para la preparación de Nanopartículas poliméricas.....	26
Figura 5. Métodos convencionales utilizados en la fabricación de Nps poliméricas.....	27
Figura 6. Esquema del tejido vaginal escamosos estratificado no queratinizado.....	38
Figura 7. Esquema de la dinámica de la absorción de fármacos a través de la mucosa.....	40
Figura 8. Resinas NovaSyn® TGR y NovaSyn® TGA.....	52
Figura 9. Esquema del mecanismo de ionización por electrospray.....	63
Figura 10. Análisis por citometría de flujo de células vivas y células apoptóticas.....	74
Figura 11 (a) Espectro de masas de masas del péptido purificado, masa calculada: 2166 Da. (b) Espectro del HPLC analítico de P6-2.....	84
Figura 12. (a) Espectro de masas del péptido purificado, masa calculada: 2369 Da (b) Espectro del HPLC analítico de E1P47.....	85
Figura 13. Espectro de masas de P6-2-FAM, masa calculada 2522.06.....	86
Figura 14. Espectro de MALDI-TOF de E1P47-FAM.....	87
Figura 15. Esquema de la doble emulsión W/O/W.....	95
Figura 16. Estructura del GC.....	96
Figura 17 (a) Diagrama de Pareto de la EE. (b) Gráfica de superficie respuesta de EE.....	98
Figura 18. Gráfica de superficie respuesta de Z-Ave.....	99
Figura 19. Diagrama de rayos X. (a) NPSE1P47 y péptido (b) NPSE1P47 y sus componentes (PLGA, GC y E1P47).....	102
Figura 20. Espectros FTIR de GC-PLGA-NPs cargadas con E1P47.....	103
Figura 21. Micrografía de Transmisión electrónica de las NPSE1P47.....	104
Figura 22. Perfil de retrodispersión (BS) de las NPSE1P47.....	105
Figura 23. Cromatograma correspondiente a el análisis de aminoácidos de la NPSP6-2.....	106
Figura 24. Perfil de liberación de E1P47.....	107
Figura 25. Perfil de liberación de P6-2.....	109
Figura 26. Cinética de Captación de las NPSE1P47-FAM.....	111
Figura 27. Análisis de citometría de flujo de HeLa-env después del tratamiento con NPSE1P47-FAM.....	112
Figura 28. Perfil de permeacion de E1P47 no formulado y NPSE1P47.....	114
Figura 29. Imágenes de microscopía confocal de la mucosa vaginal de cerdo (ex vivo).....	116
Figura 30. Imágenes de microscopía confocal de mucosas vaginales de cerdo tratadas con NPSP6-2-FAM (estudio in vivo).....	118
Figura 31. Cortes histopatológicos de mucosas tratadas con NPSP6-2-FAM.....	119

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Teorías y mecanismos de mucoadhesión .....	42
Tabla 2. NPs cargadas con diferentes agentes anti-VIH .....	43
Tabla 3a. Reactivos y disolventes utilizados en la síntesis de los péptidos .....	48
Tabla 3b. Reactivos y productos utilizados para el desarrollo, optimización y caracterización de GC-PLGA-NPs .....	49
Tabla 4. Instrumentación y marca comercial .....	50
Tabla 5. Tratamiento de secado de la peptidil-resina.....	56
Tabla 6. Factores y niveles del diseño experimental.....	59
Tabla 7. Factores experimentales y de respuesta definidos por el diseño factorial compuesto rotatorio ( $2^3$ + starts) .....	60
Tabla 8. Cantidades de péptido utilizadas en el diseño de las diferentes formulaciones .....	62
Tabla 9. Protocolo de procesamiento de tejidos por histología convencional .....	79
Tabla 10. Estructura primaria de las secuencias peptídicas derivadas de la proteína E1 y E2 del GBV-C .....	82
Tabla 11. Caracterización de las secuencias peptídicas sintetizadas y sus respectivos derivatizados .....	86
Tabla 12. Regresión lineal de HPLC UV-VIS para P6-2.....	88
Tabla 13. Determinación de la precisión y exactitud de HPLC UV-VIS para P6-2 .....	89
Tabla 14. Regresión lineal de HPLC UV-VIS para E1P47.....	90
Tabla 15. Determinación de la Precisión y Exactitud de HPLC UV-VIS para E1P47 .....	90
Tabla 16. Regresión lineal de HPLC-ESI MS-MS para P6-2 .....	91
Tabla 17. Determinación de la Precisión y Exactitud de HPLC ESI-MS/MS para P6-2.....	92
Tabla 18. Regresión lineal de HPLC ESI-MS/MS para E1P47 .....	93
Tabla 19. Determinación de la Precisión y Exactitud de HPLC ESI-MS/MS E1P47 .....	93
Tabla 20. Resultados de Z-Ave, PI y EE para las GC-PLGA-NPs optimizadas cargadas con E1P47 y NPs producidas en los factores extremos .....	97
Tabla 21. Valores de p de los análisis de ANOVA .....	100
Tabla 22. Propiedades Fisicoquímicas y EE de las formulaciones .....	100
Tabla 23. Contenido de aminoácidos en la suspensión de NPsP6-2 .....	106
Tabla 24. Parámetros estadísticos de la cinética de liberación de P6-2 .....	110
Tabla 25. Valores de $P_{app}$ de NPsE1P47 y E1P47 permeado en la mucosa vaginal de cerdo.....	114
Tabla 26. Valores de $Q_r$ de E1P47 formulado y liberado de NPs (ex vivo) .....	115
Tabla 27. Valores de $Q_r$ de E1P47 formulado y liberado de NPs (in vivo).....	117



---

## Acrónimos y Abreviaturas

---

AA	Aminoácido
ACN	Acetonitrilo
ATR	Antirretroviral
ATP	Adenosina tri-fosfato
BME	2-mercaptoetanol
BS	Retrodispersión
DBU	1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-7-undeceno
DIEA	N,n-diisopropiletilamina
DHB	Ácido 2,5- dihidroxibenzoico
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMC	Diclorometano
DMEM	Medio Dubelco modificado
DMSO	Dimethyl sulfoxido
DP	Potencial de descomposición
DRAQ5	1,5-bis{[2-(di-methylamino) ethyl]amino}-4, 8-dihydroxyanthracene-9,10-dione
DTT	1,4, dithiothreitol
EC	Energía de colisión
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Eficiencia de encapsulación
EP	Potencial de entrada
FACS	Selector de células activadas por fluorescencia
FBS	Suero Fetal Bovino
FIA	Fase interna acuosa
Fmoc	9- fluorenilmetoxicarbonilo
FTIR	Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier
FP	Péptido de fusión
FS	Dispersión Frontal
GBC-V	Virus del GB-C
GC	Glicol Chitosan
GIT	Tracto gastrointestinal

---

---

HATU	Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo- [4,5-b]piridin-1-il-metilil]-N-metilmetanaminio
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
HR-1	Head-repeat
HR-2	Head repeat-2
NPs	Nanopartículas
OCT	Temperatura de corte óptima
MET	Microscopía electrónica de transmisión
PAA	Poli-ácido aspártico
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PEG	Polietilenglicol
PI	Polidispersión
PFA	Paraformaldehído
PGA	Poli-ácido glutámico
PLA	Ácido poli láctico
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
Py-BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)ofonio
PVA	Polivinilalcohol
RNA	Ácido ribonucleico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
SS	Dispersión lateral
TB	Azul de tripano
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
tBoc	Tert-butoxicarbonil
tBu	Ter-butil
TFA	Ácido trifluoroacético
TNBS	Ácido trinitrobenenosulfónico
Z-AVE	Tamaño promedio
ZP	Zeta potencial

---





# **1. INTRODUCCIÓN**





## **1.1. GB VIRUS C**

El GB virus C (GBV-C) es un virus RNA de una sola cadena que pertenece a la familia *Flaviviridae*. Este virus fue reportado por primera vez en 1995 por el grupo farmacéutico *Abbot Laboratories*. El virus fue inicialmente identificado en el suero de pacientes de África Occidental y fue denominado como GB en base a las similitudes existentes con los virus GB A y B (1,2). Paralelamente, investigadores del grupo Genlabs, reportaron la existencia del mismo virus en el plasma de pacientes con hepatitis crónica, en este caso, el virus fue denominado como virus de la hepatitis G. Sin embargo, análisis de la secuencia del genoma confirmaron que se trataba del mismo virus previamente definido por *Abbot Laboratories* (3).

La infección por GBV-C es de distribución mundial; su prevalencia es mayor en países en vía de desarrollo que en los países desarrollados. En los países en vía de desarrollo, aproximadamente un 20% de los donantes de sangre son portadores del virus, mientras que en los países desarrollados solo un 4% de los donantes de sangre, son positivos para GBV-C. Así como en la infección por el virus de la Hepatitis C (HCV), los individuos portadores de GBV-C no presentan síntomas clínicos o enfermedad, independientemente que estos sean individuos inmunocomprometidos o sanos (4).

El GBV-C es un virus linfotrópico, que se transmite por contacto sexual, de madre a hijo (transmisión vertical) y por contacto con sangre contaminada. Como consecuencia, tiene una alta prevalencia en individuos con otras enfermedades de transmisión sexual o parenteral. Se ha descrito que aproximadamente el 20% de los pacientes con hepatitis C (HCV) y el 40% de pacientes VIH positivos, están co-infectados con el GBV-C (5).

### **1.1.1. Estructura del GBV-C**

El genoma del GBV-C está representado por una única cadena de RNA con polaridad positiva. Su organización genómica es similar a la del HCV, los genes estructurales están localizados en la región 5' y los no estructurales en la región 3' (Figura 1). La región no traducida (UTR) está al final de 5' y sirve como un sitio interno de embarcación ribosomal, la cual asegura la traducción de una región codificante de RNA. El RNA del GBV-C codifica para dos proteínas estructurales (E1 y E2). La estructura completa de la nucleocapside viral está aún por determinar ya que la región genómica que codifica para las proteínas nucleares no se ha identificado aún (6).

El GBV-C está compuesto además por cinco proteínas estructurales: NS2, NS3, NS4b, NS5a, NS5b. Estas proteínas desarrollan funciones de proteasas, helicasas RNA-dependiente y RNA-polimerasa (7).



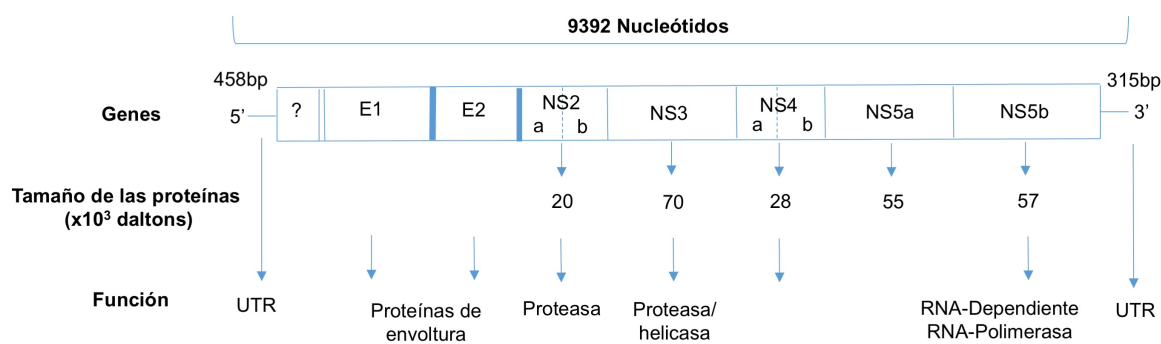


Figura 1. Mapa Genético del GBV-C. Se identifican los genes, el tamaño de las proteínas y los sitios de escisión. Región terminal no traducida (UTR), genes de envoltura E1 y E2. Genes no estructurales: NS2a, NS2b a NS4a, NS4b. Regiones a y b del gen NS5. (Modificado de Sathar et,al) (8)

## 1.1.2. Tropismo y replicación del GBV-C

La organización genómica como por su homología en la secuencia de amino ácidos (2,9). Sin embargo, en estudios posteriores no se encontró relación del GBV-C con enfermedad hepática crónica o con cualquier otra patología humana (10). En un estudio multicentrico, realizado para determinar la prevalencia de GBV-C en pacientes con HCV crónica, se concluyó, que dicho virus tenía un impacto leve, casi nulo, en la actividad de la enfermedad hepática de estos individuos (11). Sin embargo algunos autores (11,12), describieron una asociación entre GBV-C y la hepatitis fulminante, de igual manera otros sugirieron que el hígado era el tejido de replicación primaria del virus (13). No obstante, posteriores investigaciones aportaron resultados muy contradictorios que sugerían que las células de origen hematopoyético eran el sitio primario de replicación del virus (14). Con el fin de identificar claramente el sitio de replicación, se llevaron a cabo varios estudios para definir el hepatotropismo y/o el linfotropismo del GBV-C (15). Los resultados obtenidos de estas investigaciones sugirieron que en una pequeña proporción de individuos infectados, puede haber una replicación en hígado o en células mononucleares circulantes, pero ninguno de los dos representó el sitio primario de replicación del GBV-C. En un estudio *in vitro* realizado con células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se observó una replicación activa del GBV-C lo que permitió concluir que el GBV-C es un virus linfotrópico y que su replicación primaria se produce en el bazo, y en la médula ósea (16,17)

Aunque se sabe muy poco acerca de la entrada del GBV-C a las células, algunos estudios sugieren que los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) son utilizados por el virus para la entrada(18). Dado que los LDLr están presentes en casi todas las células, no se descarta que la entrada del virus a las células sea a través

de una asociación virus-lípido y/o por absorción de microvesículas que involucren LDLr entre otros componentes celulares (19).

Otro potencial mecanismo de entrada del virus puede involucrar vesículas con propiedades de exosomas que contengan el RNA-GBV-C. Los exosomas son microvesículas de origen endocítico utilizadas tanto por células como por virus para transmitir RNAs y proteínas a las células. Chivero *et al* (20,21), demostraron en un estudio *in vitro*, que microvesículas que contenían el RNA viral, tenían la capacidad de liberar el RNA en PBMC no infectadas con la posterior replicación del virus dentro de las células.

### 1.1.3. Glicoproteínas de fusión

Los virus con envoltura pueden entrar a la célula por dos vías: (a) mediante la fusión a la membrana plasmática mediada por receptores ó (b) por endocitosis, tras la unión a los receptores, el virus es endocitado y posteriormente se fusiona con la membrana plasmática. La diferencia entre las dos vías de entrada radica en que la entrada mediada por receptores, implica la evolución de la estructura de la envoltura viral a un mecanismo de fusión, mientras que en el mecanismo de endocitosis, la entrada del virus, está sujeto a factores adicionales como un pH ácido, condiciones reductoras y clivaje enzimático en los compartimentos celulares vesiculares. Independientemente de los diferentes mecanismos, todas las proteínas de fusión sufren cambios conformacionales tras la unión con los receptores. El cambio conformacional inicial en la proteína de fusión conduce a la exposición del dominio del péptido de fusión (FP), que se inserta en la bicapa lipídica de la célula diana. Antes del cambio conformacional el FP se expone para evitar las uniones inespecíficas en las bicapas lipídicas (22).

Las proteínas de fusión están actualmente clasificadas como I y II. Las proteínas de fusión de tipo I son aquellas que contienen un FP en el extremo N-terminal, mientras que las de tipo II, el FP está interno. El FP es el dominio en las proteínas de fusión que se inserta en la membrana de la célula diana, tras el cambio conformacional para luego fusionar las membranas celular y viral (23).

Las proteínas de envoltura del GBV-C son proteínas de fusión tipo II. Este tipo de proteínas no se escinden proteolíticamente. Estas proteínas contienen tres dominios beta, conectados a dominios transmembrana a través de una región alfa helicoidal y un FP interno (24). (Figura 2).

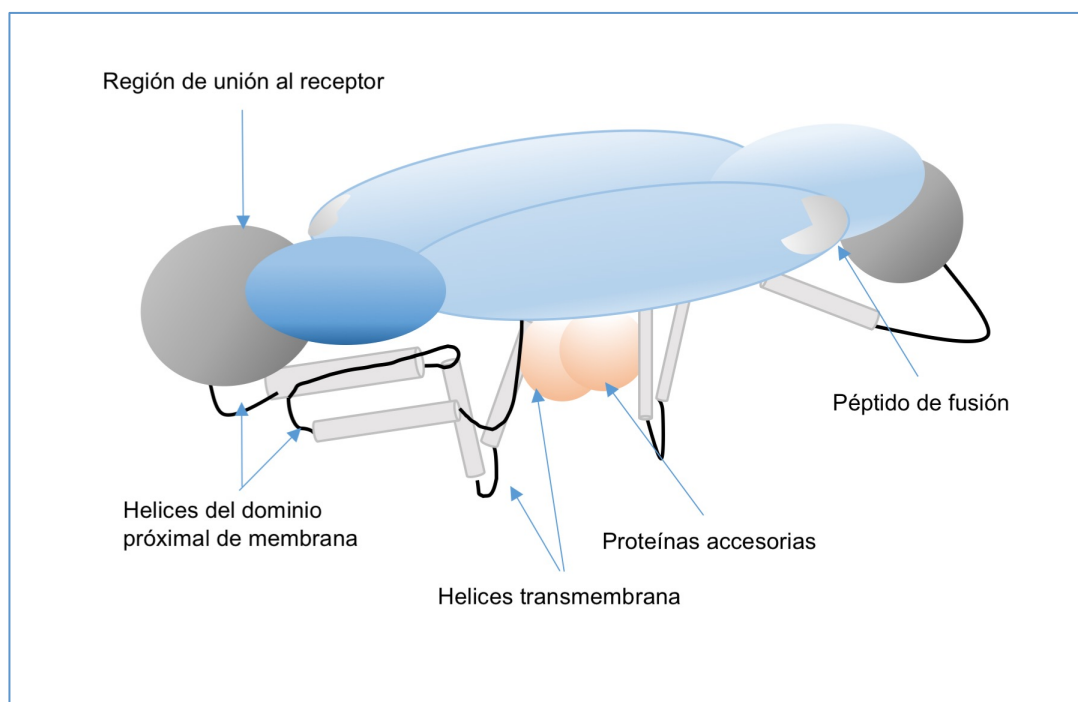


Figura 2. Estructura de las proteínas de envoltura del GBV-C (*modificado de Chojnacki et, al*) (23)

## 1.2. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un virus RNA que pertenece a la familia de los *lentivirus*, de los virus citopáticos. El VIH tiene un especial tropismo por las células que llevan el antígeno de superficie CD4 que incluyen los linfocitos T ayudadores (25).

El VIH constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial. Las poblaciones más vulnerables son las mujeres y los niños. En África subsahariana, por ejemplo, la mayoría de las mujeres VIH-positivas están en edad reproductiva y se estima que un 1.5 millones de estas mujeres quedarán en embarazo. Aproximadamente el 45% de las mujeres infectadas, transmiten el virus a sus hijos a través de la leche materna y sólo un 31% de los niños infectados reciben el tratamiento antirretroviral (ATR) (26). Por estas razones, es necesario el desarrollo de estrategias terapéuticas que sean seguras y efectivas en prevenir la transmisión del VIH.

### 1.2.1. Interacción VIH-células

La entrada del VIH a la célula diana es la primera fase de la replicación viral. Inicialmente, los viriones se unen a la célula a través de la proteína de envoltura. La unión puede ser inespecífica, a través de los proteoglicanos heparan sulfato en la superficie de la célula (27), o puede más específica ya sea, entre la proteína de envoltura y la integrina  $\alpha 4\beta 7$  o entre la proteína de envoltura y receptores con patrón de reconocimiento como DC-SIGN,

en las células dendríticas. La unión de la proteína de envoltura a la célula conlleva una unión estrecha con receptores antigénicos de membrana CD4 y correceptores que ayudan a incrementar la eficiencia en la infección (28).

El segundo paso de la entrada del virus a la célula y el primero en la infección, es la unión de la proteína de envoltura del VIH con los receptores antigénicos CD4 en la célula huésped. La proteína de envoltura está compuesta por dos subunidades, un trímero altamente glicosilado, denominado gp120 y un heterodímero denominado gp41. La subunidad gp120 contiene cinco dominios relativamente conservados (C1-C5) y cinco bucles variables (V1-V5), las regiones variables V1 a V4, están compuestas de un bucle formado por uniones disulfuro en su base. Los bucles variables se encuentran principalmente en la superficie de gp120 y son fundamentales en la evasión de la respuesta inmune y en la unión a los correceptores, particularmente el bucle V3. La subunidad gp120 interactúa con los receptores CD4, tras esta unión se producen reordenaciones estructurales en V1, V2 y posteriormente en V3. La unión de CD4 a gp120, lleva a la formación de una hoja beta de cuatro hilos, que comprende un par de hojas beta de doble hilo. El tercer paso en la entrada del virus a la célula es la unión a los correceptores. Las cepas de VIH pueden ser clasificadas dependiendo del tipo de correceptor al que se unen. Por ejemplo, los viriones que se unen a los receptores de quimocina CCR5, son denominados R5 VIH, aquellos que usan CXCR4 son denominados X4 VIH y los viriones que pueden usar ambos son R5X4 VIH (29).

El cuarto paso de la entrada del virus es el movimiento de la partícula viral al sitio donde se producirá la fusión. El VIH como muchos otros retrovirus “navegan” a lo largo de la superficie celular, moviéndose desde los sitios distales, donde se produce la unión, hasta las regiones proximales de la célula, donde puede ocurrir la entrada del virus (30).

El quinto y último paso de la entrada viral es la fusión mediada por la proteína de envoltura. La unión a los correceptores, provoca la exposición de una región altamente conservada de naturaleza hidrofóbica en gp41, esta región es conocida como el péptido de fusión (FP) el cual se inserta en la membrana de la célula diana. El FP se encuentra en el extremo N-terminal de gp41, a continuación se encuentran las regiones repetidas HR-1 (“heptad-repeat 1”) y HR-2 (“heptad-repeat 2”). Tras la unión de gp120 a su correspondiente receptor, la glicoproteína gp41 sufre un cambio estructural (prehorquilla intermedia) y el FP queda expuesto y se inserta en la membrana de la célula huésped. Una vez se da la inserción del FP en la membrana de la célula huésped, el FP

se pliega en una región bisagra, la HR-1 se pliega en tres hélices sobre las tres hélices formadas por HR-2 y posteriormente se forma un haz de 6 hélices (horquilla trimérica, 6HB).

Puesto que el dominio HR-1 está en estrecha proximidad con la membrana de la célula y el dominio HR-2 está próximo a la membrana viral, la formación de 6HB es la fuerza motriz que atrae las dos membranas opuestas, dando lugar a la formación del poro de fusión (Figura 3) (31).

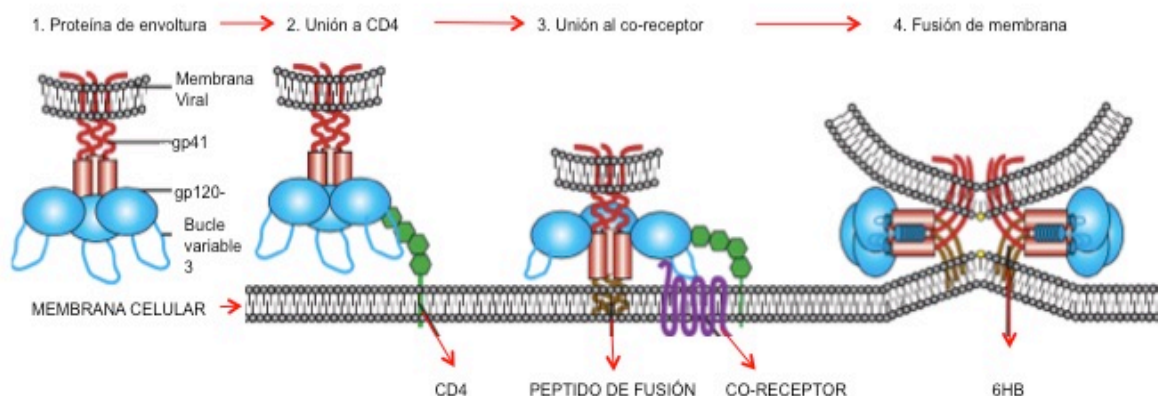


Figura 3. Esquema de la exposición del FP y fusión viral a la membrana celular. (Tomado de Wilen et,al) (28)

### 1.2.2. Replicación del VIH-1 en el tracto genital

El desarrollo de nuevas estrategias efectivas que inhiban la replicación del VIH y que eviten la expansión del virus, han sido diseñadas desde el entendimiento de los factores que influyen la capacidad del virus para atravesar las barreras mucosas.

Se cree, que los virones del VIH ó las células infectadas atraviesan el epitelio poco después de la exposición sexual, una vez dentro de la mucosa, los virus entran en contacto con las células dendríticas (CD) tipo Langerhans, pero no se replica en ellas y no son productivamente infectadas por el virus (32). Sin embargo, estas células secretan citoquinas y quimocinas como el interferón tipo I (INF-I) y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 $\beta$ ), provocando una respuesta inmune innata. Las primeras células que son infectadas son las células T CD4<sup>+</sup> intraepiteliales que se encuentran en reposo, las cuales representan el mayor porcentaje de células diana dentro de la lámina propia (33). Una vez se ha establecido la infección en la mucosa y submucosa, el VIH-1 se extiende a los órganos linfoides regionales y distantes, incluyendo el tejido linfóide asociado al intestino, en donde el virus se expande exponencialmente, desencadenando una “tormenta” de citoquinas que precede al primer pico de la viremia (34).

Desde el punto de vista del huésped, los principales factores que pueden ayudar a el establecimiento de una infección productiva incluyen la barrera mucosa y las secreciones que lo protegen (35), la disponibilidad de células diana (36), la activación de la repuesta inmune innata (37), la inflamación genital y la alteración de la microbiota genital (38). La infección a través de mucosas sanas es ineficiente y asociada al efecto “cuello de botella poblacional” en el cual, la población viral se reduce y la variabilidad genética es mucho menor, con lo cual se provoca un ineficacia biológica (39). De hecho, un 60-80% de las infecciones de las mucosas es provocado por un solo virus transmisor que es el responsable de la infección clínica productiva. En base a estos hallazgos, se genera la pregunta de si el proceso de transmisión representa un suceso estocástico, en el que cada virus competente para la replicación, tiene la misma posibilidad de establecer una nueva infección, ó si por el contrario, el efecto cuello de botella, selecciona los virus con propiedades biológicas particulares que los predisponen a establecer nuevas infecciones de una manera más eficiente (40). En base a esta última premisa, se ha podido establecer que los virus transmitidos presentan un tropismo por receptores de quimocina CCR5, que infectan células T CD4<sup>+</sup> pero no macrófagos. Estos virus comparten algunas propiedades genéticas como bucles variables más cortos y menos sitios de glucosilación entre otras propiedades víricas. Los virus altamente glucosilados, también pueden tener una menor probabilidad de ser transmitidos si están unidos por lecitinas del fluido de transmisión, lo que disminuye la posibilidad de migración del virus a través del mismo (41,42).

Aunque la información acerca de las propiedades fenotípicas de los virus transmitidos aún es escasa, en un estudio realizado por Parrish et al (43), en el cual fueron generados clones moleculares infecciosos a partir de un virus transmisor y clones de virus obtenidos de pacientes crónicos y subtipos B y C del virus, comparando las propiedades fenotípicas de las diferentes poblaciones virales durante las primeras fases de la infección por VIH-1. Los resultados obtenidos demostraron que el virus transmisor tenía un mayor contenido de proteínas de envoltura, lo que representa una mayor probabilidad de que el virus se fusione con la célula diana en la mucosa genital. Además, también se demostró que el virus transmisor era altamente infectivo y presentaban una mayor resistencia a IFN-I.

### 1.2.3. Interacción de GBV-C con VIH-1

Desde hace más de dos décadas, los beneficios de la co-infección con virus del GBV-C en individuos VIH positivos ha sido documentada por varios autores. Los primeros estudios fueron reportados en 1998 por Toyoda et al (44), en el que pacientes co-infectados con GBV-C presentaban niveles bajos de RNA-VIH. Estudios posteriores pusieron de relieve que la co-infección con el GBV-C incrementaba el número de células T CD4<sup>+</sup>

asociado a una disminución en la progresión a SIDA (45). Estos hallazgos fueron confirmados con posteriores estudios en los cuales se constató una relación inversa entre el GBV-C y la carga viral del VIH-1, sugiriendo una inhibición de la replicación del VIH por el GBV-C (46). Además, se ha demostrado que los niveles de RNA del GBV-C son más altos en pacientes con tratamiento antirretroviral que en pacientes sin tratamiento antirretroviral, lo que sugiere una correlación recíproca entre el GBV-C y la dinámica viral del VIH-1 (47). Aunque, en algunos ensayos clínicos no se pudo corroborar los beneficios de la co-infección con GBV-C en individuos seropositivos, los resultados pueden estar relacionados con el periodo de la infección por el VIH, es decir, si se trata de una infección reciente o una infección avanzada. Xiang et al (46), observaron una tasa de supervivencia elevada en pacientes co-infectados con GBV-C con una infección avanzada por VIH y con un número de células  $CD4^+ < 200/l$ . En un estudio multicentrico se demostró que en pacientes con infección reciente por VIH-1 (12–18 meses) co-infectados con GBV-C, la supervivencia no se prolongó, mientras que una viremia persistente por GBV-C en individuos con infección crónica (por encima de los seis años de la seroconversión), fue asociada con una prolongada supervivencia (48).

El mecanismo molecular exacto mediante el cual el GBV-C interactúa con el VIH-1 e inhibe su replicación no está completamente claro, pero se ha visto que la inhibición de la entrada del VIH-1 a las células y la replicación está relacionada con la presencia de las proteínas estructurales y no estructurales del GBV-C. Por ejemplo, la expresión de la fosfoproteína NS5A en una línea celular de linfocitos T  $CD4^+$  mostró una inhibición de la replicación del VIH-1 (49). En este estudio, se sugirió que la expresión de NS5A podía promover la disminución en la expresión de CXCR4, debido a la liberación del ligando natural (SDF-1), lo que explicaría la inhibición de la replicación del VIH-1. Este hallazgo ha sido reforzado con posteriores estudios en los cuales PMCB infectadas con GBV-C inducen un aumento de la expresión del RNA mensajero de SDF-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y su alta secreción en los sobrenadantes de los cultivos, dio lugar a una disminución de la expresión en la superficie celular de CCR5 (50).

Por otro lado, se ha demostrado una disminución de la expresión de  $CD4^+/CD38^+$ ,  $CD8^+/CD38^+$  y  $CXCR5/CD38^+$  en linfocitos T de pacientes VIH-1, co-infectados con el GBV-C (51).

La inhibición de la entrada del VIH a las células mediada por las proteínas de envoltura del GBV-C, ha sido el mecanismo más estudiado por varios grupos que postulan que las proteínas de envoltura E1 y E2 del GBV-C modulan la progresión a enfermedad a VIH (52–54). Se ha sugerido que E1 y E2 tienen una alta afinidad por el VIH-1, bloqueando su entrada a la célula. Se ha demostrado que estas proteínas intervienen directamente con el

péptido de fusión en el VIH-1, modificando su conformación. Esto indica una alteración de la interacción del péptido de fusión del VIH con la membrana de la célula diana, inhibiendo la fusión a la membrana celular (55).

### 1.3. PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA FUSIÓN

Una interesante estrategia terapéutica frente al VIH es la inhibición de la fusión /entrada del virus en la célula huésped. El conocimiento acerca de este proceso, ha proporcionado las herramientas para el desarrollo de péptidos inhibidores dirigidos a las diferentes fases de la fusión/entrada del VIH. Las principales moléculas diana susceptibles de ser intervenidas por los péptidos inhibidores son las proteínas gp41 y gp120 en el VIH y en la célula huésped, los receptores CD4, CCR5 y CXCR4.

Aunque el mecanismo de fusión del VIH-1 ha sido utilizado en el desarrollo de terapias antivirales, el virus ha desarrollado resistencia a los fármacos que bloquean la unión a CCR5. Esto pone de manifiesto la necesidad de nuevos inhibidores.

En los años 1993 y 2003, fueron descubiertos dos péptidos, el SJ-2176 y el T-20 (56,57,58) respectivamente. Estas dos moléculas son derivadas de la región HR-2 del VIH. Estos dos péptidos inhiben la fusión del VIH a las membranas mediante la interacción con la región HR-1, interfiriendo con la formación de la **horquilla trimérica** 6HB, en concentraciones del orden nanomolar (58). T20 o Enfuvirtide® inhibe la fusión del VIH a las células, reduciendo la carga viral en pacientes infectados a niveles indetectables y se ha convertido en una terapia favorable en pacientes a quienes le ha fallado la terapia con los inhibidores de la transcriptasa inversa y proteasa (59). Sin embargo, la aplicación clínica de T-20 se ha visto limitada por factores inherentes a los péptidos como son la baja biodisponibilidad del péptido, los altos costos de producción y la aparición de cepas resistentes (60).

Después de la aparición de T-20, surgió una segunda generación de inhibidores de la fusión con el fin de aumentar la efectividad y estabilidad de T-20. Entre los más destacados está el T-1249 ó Tifuvirtide® y el Sifurtide (SFT). T-1249 se une a la región que se sobrelapa con el sitio de unión para Enfuvirtide en HR-1 y es activo contra el VIH-1, VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia en simios. Aunque T-1249 ha demostrado ser más eficaz que T-20, sólo alcanzó la fase clínica II y fue retirado por la complejidad en su formulación (61).

SFT fue diseñado en base a la estructura tridimensional de gp41. El péptido deriva de la secuencia HR-1 de gp41 del subtipo E del VIH-1. SFT tiene una alta potencia y una vida-media larga (26 horas), con lo cual la administración en humanos es menos frecuente. SFT ha demostrado ser 6 veces más eficaz en inhibir la fusión de las membranas celulares y virales que T-20. Además, ha demostrado ser más potente en infecciones



generadas por aislados primarios del VIH-1 de múltiples genotipos con fenotipos X5 y R4. El mecanismo de acción es diferente de T-20 y altamente efectivo contra cepas resistentes a T-20 (62,63).

VIRIP es otro péptido inhibidor de la fusión, que a diferencia de los ya mencionados, es un derivado de  $\alpha$ 1-antitripsina, un inhibidor de las serinas proteasas más abundantes de la circulación sanguínea. Análisis funcionales y estructurales demostraron que VIRIP inhibe la entrada por unión específica la FP en gp41, previniendo su inserción en la célula huésped. VIRIP ha demostrado ser altamente activo frente a cepas resistentes a los actuales fármacos antirretrovirales incluyendo inhibidores de la fusión (64).

En vista de los efectos beneficiosos de la viremia de GBV-C en paciente VIH positivos y los recientes hallazgos de los efectos inhibidores de las dos proteínas de envoltura del GBV-C en la replicación del VIH, se ha sugerido la utilización de péptidos derivados de las proteína de envoltura E1 y E2 del GBV-C como una estrategia terapéutica para la inhibición de la fusión del VIH y expansión del virus.

El grupo de Eissmann han sintetizado péptidos derivados de la región N-terminal de la proteína de envoltura E2 del GBV-C. Varias regiones del extremo amino de la proteína fueron probadas con diferentes cepas del VIH-1, con el fin de evaluar y comparar la actividad anti-VIH de los péptidos. Los resultados demostraron que la secuencia que representa la región que va desde el aminoácido 45 al aminoácido 64 en el N-terminal de E2 es altamente efectiva en inhibir la fusión del VIH a la membrana celular (65). Aunque el mecanismo de inhibición no está completamente definido se cree que E2 interfiere específicamente con la formación del complejo gp41/gp120. En otros estudios realizados por, la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédica de Péptidos (USIBAP) del IQAC-CSIC en Barcelona, se ha demostrado que ciertos dominios de la proteína E2 interfieren con el péptido de fusión en gp41 e inhiben la fusión del VIH a las células (55,66).

Además de estudiar y caracterizar péptidos inhibidores de la fusión derivados de la proteína de envoltura E2 del GBV-C, se están estudiando y evaluando la actividad anti-VIH de diferentes secuencias peptídicas derivadas de la proteína de envoltura E1 del GBV-C. En esta línea, recientemente se definió, caracterizó y evaluó la actividad inhibidora de la fusión de un potente péptido, correspondiente al dominio (139-156) de la proteína E1, denominado E1P47. La efectividad de este péptido fue evaluada en diferentes cepas del VIH, obteniendo resultados similares entre los diferentes tipos de virus del VIH. El mecanismo de inhibición sugiere que E1P47 interacciona con el FP de una forma similar a la de otros inhibidores de la fusión que han sido preclínicamente evaluados como putativos microbicidas (67).

### 1.4. SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ACTIVOS

Los sistemas de liberación de fármacos son dispositivos que permiten la administración de un fármaco en el organismo y mejora su eficacia y seguridad, controlando el tiempo de liberación.

Los fármacos pueden ser liberados a través de diferentes vías: oral, parenteral, transdermal, transmucosal, nasal, colorectal, pulmonar, cardiovascular y al sistema nervioso central (68)

#### 1.4.1. Nanoparticulas

Las Nanoparticulas (NPs) se definen son sistemas dispersos de partículas sólidas con un tamaño en el rango de 10 a 1000 nm en el cual, el fármaco esta disuelto y encapsulado, atrapado o unido a la matriz de las NPs. Dependiendo del método de preparación las NPs pueden ser nanocapsulas ó nanoesferas. Las nanocapsulas son sistemas en el cual el fármaco está confinado a una cavidad rodeada por una única película de polímero, mientras que las nanoesferas son sistemas con una matriz en la que el fármaco esta físicamente y uniformemente disperso.

Factores como el tamaño de partícula, las propiedades fisicoquímicas, la carga superficial y la liberación del agente activo, son fundamentales para que las NPs puedan llegar al sitio específico de acción con una eficacia terapéutica óptima y una dosis controlada (69).

Las NPs tienen mayores ventajas sobre otros sistemas de liberación, por ejemplo, las NPs aumentan la estabilidad del fármaco y las propiedades de liberación controlada son útiles como régimen de dosificación.

Las ventajas del uso de las NPs como sistemas de liberación de fármacos, respecto a la fabricación, el tamaño y las características de superficie, es que las NPs pueden ser fácilmente manipuladas para transportar el fármaco tanto de forma pasiva como activa a el órgano ó tejido blanco.

Las NPs controlan y mantienen la liberación del fármaco durante el transporte y en el sitio de localización, distribuyendo el fármaco dentro del órgano diana para mejorar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios. Los mecanismos de degradación de las NPs durante la liberación, pueden ser controlados mediante la selección de los constituyentes de la matriz.

La superficie de las NPs puede ser modificada mediante la unión de ligandos que las dirijan al sitio de acción específico. Así mismo, las NPs pueden ser diseñadas para ser usadas en las diferentes vías de administración (70).

### 1.4.2. Polímeros utilizados en la fabricación de las NPs

En la actualidad, se están utilizando tanto polímeros sintéticos como naturales, en el desarrollo de sistemas de liberación controlada. Dependiendo el tipo de degradación de los polímeros, éstos pueden clasificarse en polímeros hidrolíticamente degradables o polímeros enzimáticamente degradables.

Los biomateriales o sistemas de liberación hechos con polímeros sintéticos son biológicamente inertes, tienen propiedades más predecibles y una uniformidad de lote a lote; además tienen la ventaja de poseer perfiles que se pueden adaptar a aplicaciones específicas.

Los polímeros de origen natural que fueron los primeros en ser utilizados clínicamente, poseen ventajas como bioactividad y elevada susceptibilidad a la degradación proteolítica desencadenada por las células, sin embargo presentan una fuerte respuesta inmunogénica, su purificación es dispendiosa y además pueden ser transmisores de enfermedad.

A continuación se describen las características físicas y químicas de los principales polímeros utilizados como vehículos en la fabricación de sistemas de liberación controlada.

#### *1.4.2.1. Polímeros hidrolíticamente degradables*

Los polímeros hidrolíticamente degradables tienen grupos funcionales como ésteres, ortoésteres, anhídridos, carbonatos, amidas, uretanos y urea entre otros, que son susceptibles a la hidrólisis (71).

##### ➤ *Poli ( $\alpha$ -ésteres)*

Son polímeros termoplásticos con enlaces ésteres alifáticos en su esqueleto. Entre los más investigados están los poli  $\alpha$ -hidroxiácidos, que incluyen el ácido poli-glicólico y la forma estereoisomérica del ácido poli-láctico (72).

El poliglicólico, es un polímero altamente cristalino (45-55 % cristalinidad), por lo que es muy resistente y muy poco soluble en solventes orgánicos, su temperatura de transición vítrea varía entre 35-40 °C y tiene un punto de fusión superior a 200 °C. Debido a la facilidad para formar fibras, este polímero es utilizado en la fabricación de suturas reabsorbibles .

Los poliglicólicos se degradan en masa, mediante escisión no específica del esqueleto éster, que pierde su masa en un máximo de 2 meses y es hidrolizado completamente en un máximo de 6 a 12 meses. En el organismo, los

poliglicolicos son descompuestos en glicina que puede ser excretada por orina o convertida en dióxido de carbono y agua en el ciclo del ácido cítrico.

Los poliláctidos son moléculas quirales que existen en dos formas activas, L-láctico y D-láctico, (entre estos dos monómeros el L-láctico ocurre naturalmente). La polimerización de estos monómeros lleva a la formación de polímeros semi-cristalinos.

Así como el poliglicólico, el poli (L-láctico) (PLA) es un polímero (~ 37% cristalinidad), con una temperatura de transición vítrea entre 60-65 °C y una temperatura de fusión de aproximadamente 175 °C. El PLA es un polímero de degradación lenta, con una buena resistencia a la tracción, por lo que se ha utilizado en el desarrollo de dispositivos de fijación ortopédica (73).

El PLLA tiene un perfil de degradación muy bajo que depende del grado de cristalinidad así como de la porosidad de la matriz. Los polilácticos se degradan en masa mediante un mecanismo de escisión aleatoria de su esqueleto éster. El ácido láctico es su principal producto de degradación y en el cuerpo humano es metabolizado en agua y dióxido de carbono en el ciclo del ácido cítrico(74).

El poliéster PLGA es un copolímero de ácido poli láctico (PLA) y ácido poliglicólico. Las formas enantioméricas del PLA son poli-D- ácido láctico y poli-L-ácido láctico y PLGA es un acrónimo para poli-L-D-ácido láctico-co-glicólico, donde las formas del ácido láctico D y L están en igual proporción. El PLGA, es el copolímero más utilizado en el desarrollo de sistemas de liberación controlada como las NPs y puede ser procesado en casi cualquier forma y tamaño; además se pueden encapsular moléculas de cualquier tamaño, es soluble en una amplia gama de solventes orgánicos incluyendo los solventes clorinados, tetrahidrofluorano, metil acetato y acetona. En agua el PLGA es biodegradado por hidrólisis de las uniones éster. En cuanto a su hidrofobicidad, la presencia de grupos metilo en PLA lo hacen mas hidrofóbico que PGA, por lo tanto los copolímeros de PLGA ricos en láctico son menos hidrofílicos, adsorben menos agua y se degradan más lentamente. Debido a la hidrólisis del PLGA, los parámetros que se consideran invariables en una formulación sólida pueden cambiar con el tiempo, tales como la temperatura de transición vítrea, el porcentaje de humedad y el peso molecular. El cambio de estas propiedades en la liberación desde una matriz de PLGA influyen la tasa de liberación y degradación de las moléculas incorporadas. En cuanto a las propiedades físicas del PLGA, estas dependen de múltiples factores tales como son el peso molecular inicial, la relación masa de ácido glicólico y láctico, el tamaño del dispositivo y exposición al agua. La fuerza mecánica del PLGA se ve afectada por sus propiedades físicas tales como peso molecular e índice de polidispersidad. Estas propiedades hacen que

el PLGA pueda ser formulado como un dispositivo de liberación de fármacos y se pueda controlar la tasa de degradación así como la hidrólisis. La fuerza mecánica, la capacidad de hidratarse, hidrolizarse y la tasa de biodegradación de el polímero, está directamente influenciada por el grado de cristalinidad, que a su vez depende de la relación molar de los monómeros que componen la cadena del copolímero. El PLA cuando se copolimeriza con el PGA reduce el grado de cristalinidad de PLGA, resultando en un aumento de la tasa de hidratación e hidrólisis. Así, que una alta tasa de PGA es susceptible a un incremento en la tasa de degradación (75,76).

### 1.4.2.2. *Poli-(orto ésteres)*

Estos polímeros fueron desarrollados por la corporación ALZA (Alzamer<sup>®</sup>) debido a la necesidad de polímeros que se degradaran desde la superficie, diseñados específicamente para la liberación de fármacos. Aunque la principal característica de estos polímeros es que las uniones orto son hidrolíticamente lábiles, el polímero es lo suficientemente hidrófobo para que la erosión en un medio acuoso sea muy lenta.

Los poli-orto-ésteres además de sufrir la degradación desde la superficie, permiten el control de la tasa de degradación así como la sensibilidad al pH y la temperatura de transición vítrea, pueden ser controladas mediante la adición de glicoles.

La tasa de liberación de estos polímeros es controlada por la tasa de hidrólisis del polímero, a través del uso de excipientes ácidos y básicos (77).

#### ➤ *Poli-(anhídridos)*

Los poli-(anhídridos), son los polímeros mas lábiles hidrolíticamente debido a que tienen uniones anhídridas alifáticas en su esqueleto. La labilidad hidrolítica y la hidrofobicidad, hacen que el polímero en un medio acuoso sufra una verdadera degradación desde la superficie, impidiendo que el agua penetre en la matriz.

Los poli-(anhídridos) son polímeros que fueron aprobados por la FDA en 1996 como un vehículo de liberación de fármacos, seguido por evaluaciones *in vitro* e *in vivo* (78).

#### ➤ *Poli-fosfoésteres*

La principal propiedad de estos polímeros sintéticos biodegradables, es la excelente biocompatibilidad con biomacromoléculas como son por ejemplo los ácidos nucleicos.

Los poli-fosfoésteres se degradan bajo condiciones fisiológicas debido a el clivaje enzimático de las uniones fosfato de su estructura. Los productos finales de la degradación de estos polímeros son fosfatos, alcoholes y glicoles.

La flexibilidad sintética de estos polímeros los hace atractivos para el desarrollo de copolímeros con otros monómeros; es el caso, por ejemplo de DL-láctico para formar el poli(láctico-co-etil-fosfato). Estos copolímeros tienen un perfil de degradación en dos fases, el cual es atribuido a la hidrólisis de los fosfatos versus la hidrólisis de los grupos funcionales del láctico.

Estos polímeros han sido utilizados ampliamente en la liberación de agentes quimioterapéuticos tales como el paclitaxel. La formulación de microesferas hechas con este polímeros se encuentra en fase II de los ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer de ovario y pulmón (79).

### ***1.4.2.3. Polímeros enzimáticamente degradables***

#### ➤ *Poli-aminoácidos sintéticos*

El poli (L-ácido glutámico) (L-PGA), es un polímero compuesto de residuos de ácido glutámico unidos a través de enlaces amida. Este polímero es altamente susceptible a degradación por enzimas lisosomales. Los productos finales de la degradación del L-PGA son monómeros de ácido L-glutámico. Adicionalmente, a pH fisiológico el L-PGA está fuertemente cargado y debido a esta propiedad se considera como el único vehículo para genes/plásmidos.

El poli-ácido aspártico (PAA), es un polímero iónico altamente soluble en agua con un alto contenido de carboxilato mucho más alto que el del L-PGA. Al igual que el L-PGA, el PAA sufre biodegradación por enzimas lisosomales. Han sido desarrollados varios bloques de copolímeros con el ácido aspártico y otros polímeros biodegradables formando nanoestructuras micelares como vehículos inteligentes de administración de fármacos (74).

#### ➤ *Polisacáridos*

Los polisacáridos son macromoléculas formadas por muchas unidades de monosacáridos unidas entre sí por enlaces glucosídicos. Entre los más estudiados se encuentran los polisacáridos de origen humano como el ácido hialurónico y el condrotin sulfato, también están los polisacáridos de origen no humano como el chitin y el Chitosano. Este último polímero ha sido aprobado por la FDA como un aditivo en los alimentos, ya que no presenta ningún efecto tóxico después de su administración en humanos.

El Chitosan (CH) es un polisacárido lineal que consiste de enlaces  $\beta$  (1-4) glucosamina con grupos N-acetilglucosamina localizados aleatoriamente, dependiendo del grado de deacetilación del polímero. El CH, es un derivado de la quitina, un polímero completamente acetilado que forma el exoesqueleto de los artrópodos.

La degradación del CH se debe a la lisozima y tiene lugar a través de la hidrólisis de los residuos acetilados. La tasa de degradación de CH depende del grado de acetilación y cristalinidad del polímero. Las formas altamente acetiladas tienen una baja tasa de degradación y puede tardar varios meses *in vivo*.

Por otro lado, las modificaciones químicas del CH pueden afectar de manera significativa la solubilidad del polímero y a su degradación. Como una importante característica, la solubilidad del CH se ve afectada por muchos parámetros como el grado de deacetilación, el pH, el tipo de ácido y el peso molecular. El CH se puede disolver en ácidos acuosos diluidos y dimetilsulfoxido. Cuando el pH del medio es más bajo que el pKa del CH (6,3 – 6,7) el CH es soluble en agua, pero si el pH excede el valor de pKa, el CH es completamente insoluble. Adicionalmente, la distribución de grupos acetilo puede afectar la interacción entre moléculas y así influenciar la solubilidad del CH. Además, el CH de bajo peso molecular tienen mejor solubilidad que el de alto peso molecular.

Desde el punto de vista biológico el CH ha sido ampliamente utilizado en diversos estudios de permeación gracias a sus propiedades mucoadhesivas. El fluido que cubre las mucosas epiteliales está compuesto principalmente de agua, enzimas y electrolitos. La interacción entre los polímeros y el fluido mucoso pueden aumentar el tiempo de residencia y mejorar la mucoadhesividad. El CH es un polímero catiónico que puede interactuar con los motivos aniónicos del fluido mucoso. La carga del CH está determinada por el número de grupos amino en la cadena polimérica que pueden incrementar las interacciones con el mismo. Las propiedades de potenciador de penetración del CH, no sólo está relacionada con la capacidad mucoadhesiva del polímero sino que además tiene la capacidad de abrir las uniones estrechas entre células Caco-2.

La degradación del CH se ve afectada por el grado de deacetilación y el peso molecular, cuando estos dos factores son bajos, la degradación se incrementa, mientras que un alto grado de cristalinidad y una distribución homogénea de grupos acetilo disminuyen la tasa de degradación (76).

### 1.4.3. Métodos utilizados en la fabricación de NPs

Las propiedades de las NPs son optimizadas dependiendo de la aplicación. Dos técnicas se emplean principalmente para la preparación de NPs: (1) por dispersión de polímeros preformados y (2) por polimerización de monómeros. Dentro de cada técnica, existen diferentes métodos de preparación. En la figura 5 se muestran los métodos convencionales para la preparación de las nanopartículas poliméricas (NPs).

#### 1.4.3.1. Evaporación del solvente

Este fue el primer método desarrollado para la preparación de NPs poliméricas. En este método el polímero se disuelve en un solvente orgánico. Inicialmente, se emplearon diclorometano y cloroformo, pero debido a su toxicidad, hoy en día éstos han sido remplazados por solventes con mejor perfil toxicológico como el acetato de etilo. Una vez disuelto el polímero en el solvente orgánico, la emulsión formada entre solvente y polímero se convierte en una suspensión de NPs de la cual se evapora el solvente a través de la fase continua de la emulsión (80).

La evaporación del solvente es el método más utilizado para preparar NPs poliméricas. En los métodos convencionales, dos estrategias principales están siendo usadas para la formación de emulsiones, las emulsiones simples (*oil-in-water*) o emulsiones dobles como (*water/oil/water*) (Figura 4). Estos métodos utilizan homogenización con alta velocidad o ultrasonificación, seguido por la evaporación del solvente; esto se puede realizar por agitación magnética continua o bajo presión reducida. Las NPs pueden ser colectadas por ultracentrifugación y lavadas con agua destilada para remover los excesos de surfactantes o aditivos (81).

En un estudio realizado sobre la influencia de ciertos parámetros experimentales tales como el porcentaje de surfactante se concluyó que una concentración elevada de surfactante (3 % w/v ó mayor) asegura un buen proceso de emulsificación y un tamaño de partícula pequeño (82).

En otro estudio, se evaluó la influencia de la técnica de emulsión sobre las características de las NPs. En la emulsión por sonicación, la intensidad y el tiempo han sido los principales factores que determinan el tamaño de partícula, así como la distribución de la población de las Nps (83).



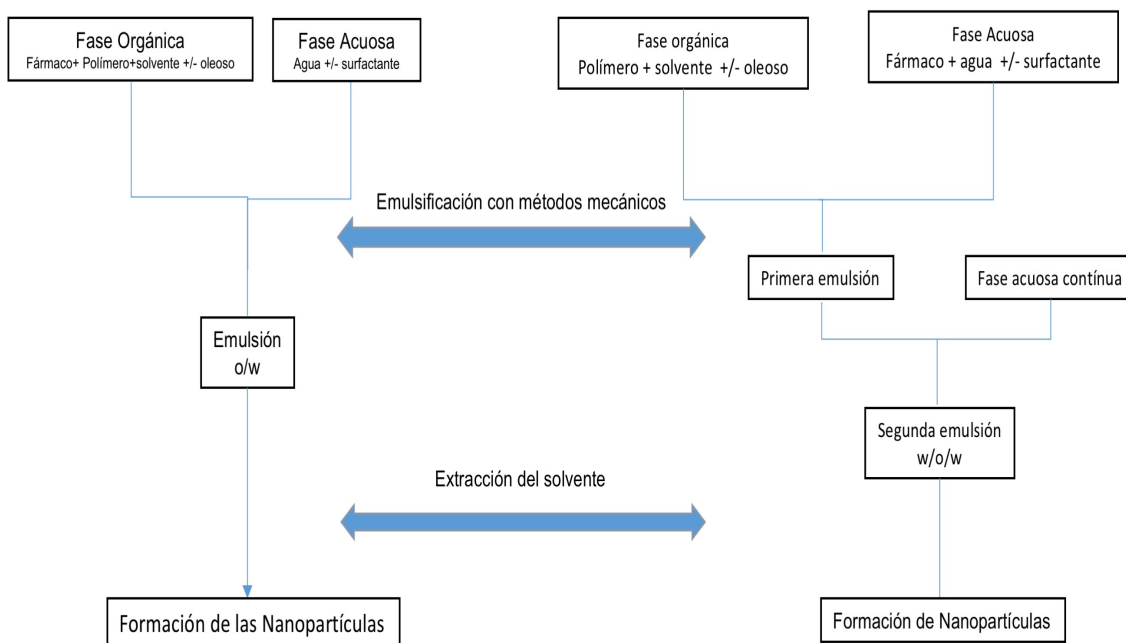


Figura 4. Esquema de técnicas para la preparación de Nanopartículas poliméricas. Simple (W/O) y doble emulsión (W/O/W).

#### 1.4.3.2. *Salting-out*

Este método fue descrito por Bindschaedler et al (84), y plantea una versión modificada de la emulsión simple y la doble emulsión. El método implica un procedimiento que evita el uso de tensoactivos y disolventes clorados. La emulsión del polímero se hace con un disolvente que es totalmente miscible en agua, como por ejemplo es la acetona y la emulsificación de la solución de polímero se realiza en solución acuosa, dando lugar a una emulsión sin emplear ningún método de agitación. Tras la dilución se produce una migración del polímero a las gotitas de la emulsión debido a la reducción de la concentración de sales en la fase continua.

#### 1.4.3.3. *Nanoprecipitación*

Este método denominado desplazamiento del solvente fue desarrollado por Fesi et al (85). La técnica se basa en la deposición interfacial de un polímero después del desplazamiento de un solvente semipolar, miscible con agua, de una solución lipofílica. La difusión rápida del solvente dentro de la fase no solvente, resulta en la disminución de la tensión interfacial entre las dos fases, la cual incrementa el área de superficie y lleva a la formación de pequeñas gotas de solvente orgánico. La nanoprecipitación consiste en tres elementos básicos, el polímero (sintético, semi-sintético o natural), el solvente del polímero y la fase acuosa no orgánica. El solvente

orgánico el cual es parcialmente miscible en agua (acetona, etanol, hexano, diclorometano o dioxano) es fácil de eliminar por evaporación, por ello la acetona es el solvente más frecuentemente empleado en este método. Por otro lado la fase acuosa es una mezcla de un no-solvente con un surfactante sintético (Figura 5).

Las NPs se producen tras la adición lenta de la fase orgánica en la fase acuosa, bajo agitación moderada. Una rápida difusión del polímero en la fase acuosa da como resultado NPs con tamaños bien definidos y una distribución uniforme de la población nanoparticulada (86).

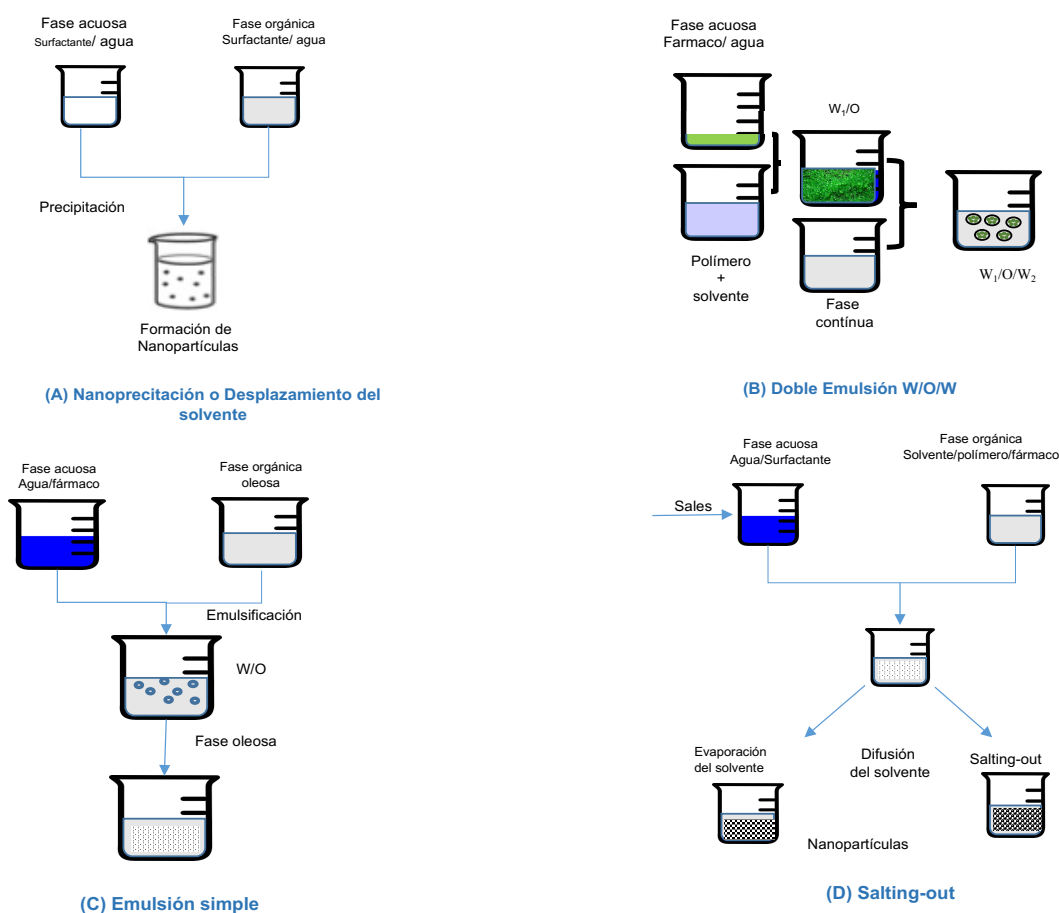


Figura 5. Métodos convencionales utilizados en la fabricación de Nps poliméricas

## 1.4.4. Caracterización de sistemas poliméricos nanoparticulados

La caracterización de sistemas poliméricos nanoparticulados incluye tanto pruebas físicas como químicas. Dichas pruebas se realizan para determinar la compatibilidad de los componentes del sistema, isotropicidad de la formulación, uniformidad del contenido, apariencia, viscosidad, densidad, pH, conductividad, tensión superficial, tamaño y zeta potencial entre otras. Un ejemplo claro es la utilización de la calorimetría diferencial

de barrido; con este método se pueden evaluar las diferentes interacciones que pueden existir entre los componentes de la formulación. Así también existen otros métodos que dan información acerca de la estabilidad y reproducibilidad de una formulación como es la turbidimetría. El tamaño de la partícula, es otro importante factor a analizar porque determina la velocidad y la tasa de liberación del fármaco, así como la absorción.

Por otro lado, la viscosidad, la conductividad y los métodos dieléctricos dan información acerca de las características microscópicas. Las medidas de viscosidad pueden indicar la presencia de micelas inversas y las medidas de conductividad determinan si la fase continua está en aceite o en agua. Las medidas dieléctricas son un medio para probar ambas las características dinámicas y estructurales de la formulación (87).

A continuación se describen los parámetros más comúnmente analizados en los sistemas nanoestructurados.

### *1.4.4.1. Morfología*

La morfología de los sistemas nanoestructurados puede ser determinada por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM). SEM da información acerca de la superficie y morfología mediante una imagen tridimensional de los glóbulos y TEM es un método que permite evaluar el tamaño y la distribución de la población de la suspensión nanoparticular.

### *1.4.4.2. Tamaño y polidispersidad*

La dispersión dinámica de la luz es una técnica utilizada para determinar el tamaño hidrodinámico exacto de las NPs. La solución es iluminada por un láser monocromático y las fluctuaciones de la luz dispersada son recogidas con un detector fotónico en un ángulo de dispersión variable o fijo. La luz dispersada depende del tiempo, debido al movimiento browniano de las NPs. En este tiempo, las fluctuaciones son capturadas usando el método de autocorrelación, en el cual la intensidad de luz dispersada a tiempo  $t$ , es comparada consigo mismo a tiempo  $(t+\tau)$ , donde  $\tau$  es el tiempo de retardo de la correlación. El proceso se repite durante el periodo de observación y para un rango de valores (típicamente espaciados logarítmicamente), generando una función de correlación, que se muestra gráficamente como un correlograma. A partir de la desintegración de la función de correlación, la velocidad de la difusión (por ejemplo, el coeficiente de difusión traslacional,  $D$ ) se calcula:

$$\Gamma = q^2 \cdot D \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde,  $\Gamma$  es la tasa de decaimiento exponencial y  $q$  es el módulo del vector de difusión (definido por el ángulo de dispersión y la longitud de onda de la luz). La ecuación de Stokes-Einstein pueden ser empleado para

relacionar  $D$  al diámetro hidrodinámico de la partícula, teniendo en cuenta la viscosidad de la muestra y la temperatura a la cual la medida realizada.

$$d_H = kT/3\pi\eta D \quad (\text{Ecuación 2})$$

$k$  es la constante de Boltzman,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\eta$  es la viscosidad en el medio,  $d_H$  es el diámetro equivalente a una esfera rígida que se difunde a la misma velocidad que el analito (88,89).

Las NPs en suspensión tienen una distribución de tamaños como resultado a las imperfecciones en la síntesis y debido a las variaciones conformacionales por el gran número de átomos involucrados. Mediante la tasa de retardo se puede determinar el tamaño medio de una población de NPs, mediante el ajuste de mínimos cuadrados de la función de correlación. La variabilidad del tamaño se define como el índice de polidispersidad (PI), un parámetro sin unidades que deriva del análisis de los acumulados equivalente a la varianza relativa de la distribución (90).

#### 1.4.4.3. Potencial-Zeta

En una solución iónica, las NPs con una carga neta tienen una capa de iones fuertemente unida a su superficie, conocida como la capa de “*Stern*”. Una segunda capa externa difusa está compuesta de iones ligeramente asociados. Estas dos capas son conocidas como la doble capa eléctrica. Como las partículas se mueven (debido a la difusión Browniana o fuerza aplicada) se crea una distinción entre los iones que permanecen con el surfactante alrededor de la nanopartícula. El potencial electrostático en este límite se denomina Potencial-zeta (ZP) y está relacionado a la carga superficial de las NPs. Para llevar a cabo las mediciones del ZP de las nanopartículas, un campo eléctrico se aplica a través de la muestra y el movimiento de las NPs se mide por “velocimetría doppler láser” (LDV). El ZP se calcula utilizando la ecuación de Henry:

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde  $U_e$ , es la movilidad electroforética,  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica,  $\eta$  es la viscosidad del medio,  $f(ka)$  es la función de Henry y  $ka$  es una medida de la relación entre el radio de la partícula y la longitud de Debye (90)

### 1.4.5. Interacciones biofísico-químicas en la Nano-Biointerfase

El término nano-bio-interfase está relacionado con las interacciones fisicoquímicas dinámicas, cinéticas, termodinámicas entre la superficie de las NPs y los componentes de las superficies biológicas (proteínas, membranas, fosfolípidos, vesículas endocíticas, organelos, DNA y fluidos biológicos).

La nano-bio-interfase comprende tres componentes que interactúan dinámicamente: (i) La superficie de la nanopartícula (las características fisicoquímicas del sistema), (ii) la interfase sólido-líquida y los cambios que ocurren cuando la partícula interactúa con los componentes del medio que la rodea, (iii) zonas de contacto entre la interfase líquido-sólido y los sustratos biológicos.

En un medio biológico, las características más importantes de las NPs que determinan las interacciones con las superficies biológicas son: la composición química, la funcionalización de la superficie de las NPs, la forma y el ángulo de curvatura, porosidad y cristalinidad de la superficie, heterogeneidad, aspereza, hidrofobicidad e hidrofiliidad. Otras propiedades cuantificables tales como son el potencial zeta, agregación de partículas, estado de dispersión, estabilidad/biodegradabilidad, características de disolución e hidratación vienen determinadas por las características del medio de suspensión.

Las características de las NPs contribuyen a las interacciones con el medio de suspensión a través de la adsorción de iones, interacción con proteínas; a través de la formación de la doble capa de iones; la disolución en el medio y minimizando la energía libre de las nanopartículas mediante la reestructuración de su superficie. Muchas de estas nuevas propiedades adquiridas o estados transformados determinan las fuerzas que operan en la interfase partícula/medio. Principalmente predominan las fuerzas de Van der Waals (VDW), interacciones electrostáticas de la doble capa, más las cargas de corto alcance que surgen de las interacciones de carga y de solvente (91).

La interfase sólido-líquida metaestable está sujeta a un medioambiente dinámico, poco homogéneo y transitorio que contribuye a la formación de la nano-bio interfase. La poca homogeneidad es el resultado de la distribución y localización espacial de las proteínas, lípidos y estructuras glicosiladas en la superficie de la membrana (91).

La interacción entre proteínas y NPs es un proceso dinámico y complejo, dado que la secuencia y la estructura de las proteínas, determinan los principales amino ácidos que están implicados en la absorción de las NPs a la superficie de las membranas. Estas interacciones dependen de la afinidad de las proteínas con las NPs. Las proteínas pueden establecer interacciones con las NPs por largos períodos de tiempo o ser reemplazadas por otras

proteínas poco después de la absorción inicial, este fenómeno es comúnmente llamado la “corona de proteínas” (92).

Se conoce un determinado número de proteínas que forman complejos transitorios con NPs, grandes variaciones en sus tasas de disociación, establecen interacciones de unión preferenciales entre cierto tipo de NPs y los fluidos biológicos en los que están suspendidas. Además, las concentraciones de proteínas próximas a las partículas influyen en la unión; un claro ejemplo está en la corona dinámica alrededor de NPs en la sangre, la albúmina sérica y el fibrinógeno dominan la superficie de las partículas durante cortos períodos de tiempo, mientras que las proteínas menos abundantes pero con mayor afinidad a las NPs y con una cinética más lenta, finalmente las desplazan. Las proteínas que se unen con mayor fuerza a las NPs poliméricas son la albúmina, inmunoglobulinas, complemento, fibrinógeno y apolipoproteínas (93).

### **1.4.6. NPs: Sistemas de transporte y liberación de péptidos terapéuticos**

Las nanopartículas se emplean como importante herramienta para atravesar barreras y liberar biomoléculas que son susceptibles a la degradación. A diferencia de biomoléculas como son las proteínas; los péptidos son lo suficientemente pequeños para encajar en un espacio poco profundo e hidrófobo sin comprometer la especificidad y la afinidad. Por esta razón, varios péptidos con diferentes fines terapéuticos y de diagnóstico han sido incorporados en nanopartículas poliméricas como una estrategia para mejorar tanto su biodisponibilidad como su biocompatibilidad.

Además de las aplicaciones biomédicas, la nanomedicina ha incorporado los péptidos en NPs como: (i) un medio de direccionamiento para que las NPs puedan alcanzar tejidos específicos. En este sentido, los péptidos se emplean como ligandos de receptores o como marcadores de células ó (ii) como moléculas terapéuticas. En esta categoría, las nanopartículas se funcionalizan con péptidos con función terapéutica (94).

Se han descrito diferentes estrategias para incorporar o unir péptidos a NPs. La incorporación implica métodos convencionales y no convencionales de fabricación de nanopartículas y la unión puede ser de tipo covalente ó no covalente. La unión no-covalente se basa en las propiedades anfipáticas asociadas ya sea a la estructura primaria o secundaria de secuencias peptídicas cortas. El anclaje o unión de péptidos anfipáticos, con estructura primaria a nanopartículas puede llevarse a cabo a través de su dominio hidrofílico o hidrofóbico, mientras que el anclaje de péptidos con estructura secundaria está restringida al estado conformacional de la molécula, el cual permite posicionar los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en lados opuestos.

Generalmente, los péptidos más utilizados en la funcionalización de nanopartículas son los comúnmente conocidos CPP "*cell penetrating peptides*". El primer CPP unido a NPs fue el péptido anfipático Pep-1, posteriormente otros péptidos anfipáticos con estructura secundaria han sido utilizados con el fin de mejorar la biodisponibilidad y captación de las nanopartículas en los tejidos vivos. Entre los péptidos más utilizados en la actualidad están el *Tat-VIH*, *penetrating peptide* y *transportan peptide* (95).

Los péptidos además de ser utilizados en el direccionamiento de nanopartículas, son utilizados como potentes agentes terapéuticos para el tratamiento de diferentes enfermedades crónicas como cáncer, hepatitis, diabetes, artritis reumatoide, leucemia y recientemente también en el tratamiento del VIH-1 (96,97). Sin embargo varios inconvenientes, además de los ya mencionados, limitan su aplicación clínica. La vía parenteral, es la principal vía de administración tanto de péptidos como de proteínas, no obstante, debido a la corta vida media de estas moléculas es necesario un aumento en la frecuencia de administración, lo que induce a que el paciente incumpla con el tratamiento, provocando efectos adversos como es la aparición de cepas resistentes, en el caso de las enfermedades infecciosas (98).

Se han utilizado vías alternativas sin muchos beneficios, tal es el caso de la administración oral, que a pesar de ser una vía no invasiva, la administración de biomoléculas como los péptidos es muy limitada debido a la presencia de enzimas proteolíticas en el tracto gastrointestinal (GIT), además de las propiedades fisicoquímicas y biológicas intrínsecas a la naturaleza de este tipo de moléculas, como lo son la inestabilidad a pH ácidos, el gran tamaño molecular y la ineficiente permeación a través de las membranas del GIT (99).

Además de la vía parenteral y oral, otras vías como son la nasal y pulmonar se han explorado con mayores expectativas debido a la baja actividad proteolítica con respecto a la oral. Estas vías son interesantes ya que son altamente vascularizadas, lo que significa que hay una mayor posibilidad de permeación, pero la depuración microcililar limita la adsorción de estas moléculas (100).

Para superar los inconvenientes anteriormente mencionados, se ha optado por incorporar las proteínas y los péptidos terapéuticos en sistemas de liberación controlada, tales como son las NPs. En este aspecto, las NPs poliméricas tienen mayores ventajas sobre otros sistemas de liberación, así, NPs de pequeños tamaños tienen la capacidad de atravesar eficientemente barreras epiteliales. Desde el punto de vista fisicoquímico, las NPs poliméricas tienen mayor estabilidad en medios biológicos, tienen una liberación sostenida, tamaño subcelular, protección de los péptidos encapsulados de la degradación enzimática y una alta biocompatibilidad con los

tejidos. Además, la versatilidad en la formulación permite manipular el perfil de liberación y el comportamiento biológico (bioadhesión, captación celular, liberación en el tejido blanco, entre otras) (101).

Las propiedades de las NPs poliméricas se encuentran afectadas por la naturaleza del polímero, ya sea éste natural o sintético y el método de preparación. Entre los polímeros naturales el Chitosan, es uno de los más empleados para la encapsulación y liberación de péptidos por vía oral. Entre las características más interesantes del Chitosan son una buena solubilidad en el pH intestinal y un aumento de la mucoadhesividad y permeación. En el intestino delgado las NPs de Chitosan pueden adherirse y filtrarse a través de la capa de moco y abrir las uniones estrechas entre las células epiteliales contiguas, además la sensibilidad al pH ácido, hace que las NPs hechas de este polímero, se desintegren y liberen el péptido, el cual a su vez penetrará a través de la vía paracelular que ya ha sido abierta (102).

Además de los polímeros de origen natural como es el Chitosan, otros polímeros de origen sintético se utilizan extensamente en la encapsulación de péptidos. Es el caso de los poli-esteres como el PLGA, ya descrito en uno de los anteriores apartados.

La incorporación de péptidos en las NPs puede ser llevada a cabo mediante diferentes métodos. Para la fabricación de Nps con polímeros naturales, se utilizan técnicas suaves como gelación iónica y coacervación, mientras que las nanopartículas hechas con polímeros sintéticos son fabricadas con técnicas más comunes como emulsificación- evaporación del solvente, Nanoprecipitación, salting-out y emulsificación-difusión del solvente.

### **1.4.7. Aplicación de NPs poliméricas como sistemas de liberación de péptidos por diferentes vías**

#### *1.4.7.1. Vía oral*

En el desarrollo de NPs poliméricas para la administración oral de péptidos se han considerado aspectos como es la captación de las NPs a través del epitelio intestinal; en este aspecto el tamaño se considera de vital importancia ya que la transcitosis de las NPs pequeñas (< 100nm) es mejor que la de NPs de tamaños mayores. Otro aspecto importante, es la carga de superficie de las NPs ya que las cargas positivas pueden facilitar la proximidad de las NPs al epitelio intestinal y aumentar su transporte a través de las placas de Peyer, contrario a lo que sucede con NPs cargadas negativamente, se ha visto que NPs de poliestireno cargadas negativamente, limitan la captación mediada por las células M (103).

Otro importante aspecto es la hidrofobicidad. En varios estudios se ha visto que NPs hechas con polímeros hidrofóbicos mejoran la entrada a el epitelio intestinal, principalmente a las placas de Peyer. Por otro lado, las



modificaciones en la superficie de las NPs ya sea mediante la utilización de polímeros bioadhesivos o mediante la utilización de ligandos aumentan su permeación (99).

Los péptidos son sensibles al pH ácido del estómago, además la degradación por enzimas como la pepsina y o proteasas pancreáticas en el intestino, además de las aminopeptidasas que existen en la membrana del borde en cepillo son otras de las principales barreras de la liberación de péptidos y proteínas.

Las NPs son una alternativa para mejorar la biodisponibilidad de los péptidos encapsulados, porque protegen de la degradación del medio ambiente intestinal, mejoran la adhesión a el epitelio intestinal y promueven la absorción por el intestino delgado. Existen dos diferentes rutas de transporte a través del epitelio intestinal la ruta paracelular (a través de las células adyacentes) y la ruta transcelular.

La ruta paracelular representa del 0.01 al 0.1% de toda la superficie intestinal con una dimensión de aproximadamente 10 Å, por lo tanto, macromoléculas como las NPs atraviesan el epitelio intestinal mediante esta ruta. Para mejorar el transporte, se han empleado varios potenciadores de la absorción como lo son el Chitosan, el almidón, polímeros tiolados y quelantes de calcio para abrir de manera reversible las uniones estrechas.

La ruta transcelular para péptidos y proteínas incluye una difusión transcelular pasiva, un transporte mediado por vehículos como NPs, una transcitosis por enterocitos mediada o no por receptores y fagocitosis por células M (103).

### *1.4.7.2. Vía parenteral*

La vía parenteral es atractiva porque se puede evitar el metabolismo de primer paso y proporciona una alta biodisponibilidad. Las principales características fisicoquímicas que pueden alterar *in vivo* la administración por vía parenteral de NPs son el tamaño, la carga superficial, la tasa de disolución y el recubrimiento. Así, NPs con tamaños mayores a los 200 nm pueden sufrir de un rápido aclaramiento por el sistema fagocítico mononuclear y esto puede aumentar de manera significativa su captación en hígado y bazo (104).

En la administración sistémica al cerebro, la barrera hematoencefálica representa una importante barrera para el transporte de péptidos. Las células endoteliales capilares del cerebro tienden a formar uniones intracelulares estrechas y ocluyen los espacios paracelulares; además alrededor de estas células se encuentran terminaciones de astrocitos y pericitos que forman una barrera poco accesible a péptidos y proteínas. Por lo que en los últimos años se han desarrollado varias NPs poliméricas para dirigirse a tejidos poco permeables como es el cerebro. Por

ejemplo, NPs de PLGA-PEG modificadas con lactoferrina han sido utilizadas por su eficacia para tratar la enfermedad de Parkinson (105). Huille y et al desarrollaron NPs de policaprolactona que fueron modificadas con los péptidos angiopep-2 y el EGPF-EGF-1. Estas NPs demostraron tener un alto potencial para permear la barrera hematoencefálica y unirse a las células neuroglia les (106).

### *1.4.7.3. Vía pulmonar*

La vía pulmonar se considera como una importante ruta no-invasiva que mejora la absorción de péptidos y proteínas. Esta vía ofrece numerosas ventajas como son una gran superficie de absorción ( $100\text{ m}^2$ ), es un área altamente vascularizada, una membrana alveolar delgada ( $0.1\text{-}2.0\ \mu\text{m}$ ) y una baja actividad enzimática. Pero a pesar de estas ventajas, el epitelio de las vías respiratorias centrales está constituido en gran parte por células cilíndricas ciliadas dispuestas en estrechas uniones intercelulares; estas uniones limitan el transporte paracelular de péptidos y proteínas. Por otro lado, la velocidad de difusión en esta región es directamente proporcional al gradiente de concentración y a la solubilidad lipídica. La capacidad de difusión esta directamente influenciada por el tamaño molecular y al estado de ionización de péptidos y proteínas. La unión al moco y el posterior aclaramiento a través del sistema mucociliar pueden reducir las concentraciones disponibles para la absorción. La humectabilidad de las NPs, la agregación, la cristalinidad, el polimorfismo y la vulnerabilidad a la degradación enzimática también pueden determinar la tasa de absorción de proteínas y péptidos. La deposición en el tracto respiratorio depende de las propiedades aerodinámicas de las partículas inhaladas y los patrones de inhalación. Los patrones de respiración lenta, pueden promover la absorción de NPs con un diámetro aerodinámico menor de  $500\text{ nm}$  y pueden depositarse fácilmente en los alveolos mediante difusión browniana (107).

### *1.4.7.4. Vía transdermal*

La administración transdérmica tiene varias ventajas como es una enorme superficie de absorción, que evita el metabolismo de primer paso y una ruta no invasiva y continua. Sin embargo, la liberación de proteínas y péptidos a través de la piel esta limitada por la penetración y las enzimas. Las NPs poliméricas son un enfoque atractivo para mejorar la penetración e estas biomoléculas; sin embargo por sí solas y sin ningún recubrimiento o potenciador, son incapaces de atravesar mas allá de las capas superficiales del estrato córneo. Por lo tanto, para una eficiente penetración, es necesaria la utilización de potenciadores de permeacion (108). Rastogi et al, estudiaron el potencial de electroporación transdérmica a través del estrato córneo con NPs PLC-PEG-PLC

cargadas con insulina. Esto dio como resultado una disposición de insulina 4 veces más alta en piel respecto a la solución, estos resultados demostraron la eficiencia de un método potenciador de la permeación de nanosistemas a través de la piel (109).

### 1.4.7.5. *Vía ocular*

La vía ocular se ha utilizado para la administración de péptidos tanto de acción localizada como sistémica. Para la liberación sistémica, la vía ocular tiene ventajas como una fácil administración, una velocidad de administración relativamente rápida comparada con la administración oral y además esta vía evita el metabolismo de primer paso. La absorción de péptidos y proteínas como insulina, encefalinas y calcitoninas se han estudiado siguiendo la vía ocular. Actualmente la administración de péptidos a través de esta ruta se está llevando a cabo para el tratamiento de diferentes enfermedades de ojo como degeneración macular, enfermedad del ojo seco y retinopatías. Sin embargo, las barreras anatómicas y fisiológicas y la degradación enzimática limitan la eficacia de estas moléculas.

Las NPs poliméricas pueden mejorar la liberación localizada de péptidos de uso terapéutico mediante la liberación sostenida, la protección de la degradación enzimática y el aumento del tiempo de residencia en la zona pre-corneal comparada con los colutorios. Sin embargo, para que las NPs permanezcan dentro del espacio pre-corneal es necesario mejorar sus propiedades mucoadhesivas para incrementar el tiempo de residencia en “*cul-de-sac*” corneal (110).

## 1.5. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA MUCOSA VAGINAL

La vagina es un canal fibromuscular expansible en forma de S. Se extiende desde el cérvix hasta el útero y tiene aproximadamente 10 cm de longitud, 4 cm de ancho y de 150 a 200  $\mu\text{m}$  de grosor. La pared posterior es más larga que la anterior como consecuencia de la posición asimétrica del cuello uterino en la bóveda vaginal.

La vagina es el órgano sexual femenino, no contiene glándulas y por lo tanto no tiene un papel secretor; no obstante, la vagina está recubierta por una delgada capa de líquido que incluye secreciones endometriales, cerebrales, vestibulares, residuos de orina y cantidades variables de trasudados vaginales. En cuanto al fluido que recubre la mucosa, este puede variar según la edad y el ciclo menstrual. Por ejemplo, el pH de la vagina es ácido (3.5 – 4.5) en mujeres sanas en edad reproductiva, pero este pH puede variar de acuerdo con el estado de salud ó el ciclo menstrual. La cantidad de trasudado vaginal también varía a lo largo de la vagina, siendo más abundante cerca del cérvix y menos en el fornix anterior.

Las microbiota de la mucosa vaginal, principalmente el *Lactobacillus* spp, es el encargado del mantenimiento del pH vaginal, ya que este microorganismo metaboliza el glucógeno que proviene de la ruptura autolítica de las células vaginales, convirtiéndolo en ácido láctico y sacáridos.

La pared vaginal se compone de varias capas celulares: (i) estratos no queratinizados, (ii) epitelio escamoso, (iii) capa muscular y (iiii) túnica adventicia. La lámina propia esta compuesta por tejido conectivo rico en vasos capilares y linfáticos que drenan a la vena ílica interna, razón por la cual los productos absorbidos evitan el metabolismo de primer paso. Se estima que aproximadamente 10-15 capas de células epiteliales son reemplazadas semanalmente. El epitelio escamoso estratificado no queratinizados, está asentado sobre queratinocitos ricos en glicógeno. Este epitelio además está compuesto por otro tipo de células como Langerhans y macrófagos. Además de lo mencionado, la lámina propia está constituida por fibroblastos, fibras elásticas y colágenas, vasos y nervios y células de defensa, leucocitos polimorfonucleares y nódulos linfáticos.

Las células epiteliales se disponen de acuerdo con las etapas de diferenciación, es decir dependiendo de la presencia de queratinas como K10 y K13 y en función de la ubicación de la célula dentro del epitelio. Además, numerosos pliegues están presentes en el epitelio aumentando la superficie y otorgándole distensibilidad.

Ciertas condiciones influyen la fisiología vaginal: el balance hormonal, el embarazo, el pH, la microflora y la edad. La edad, es el principal biomarcador del grosor del epitelio vaginal, de concentración de enzimas y producción de trasudado vaginal. Los cambios en las características fisiológicas pueden llegar a influenciar la permeación de fármacos, ya que este depende principalmente del grosor del epitelio, de la composición de lípidos, de la organización del espacio intercelular y de la estanqueidad celular.

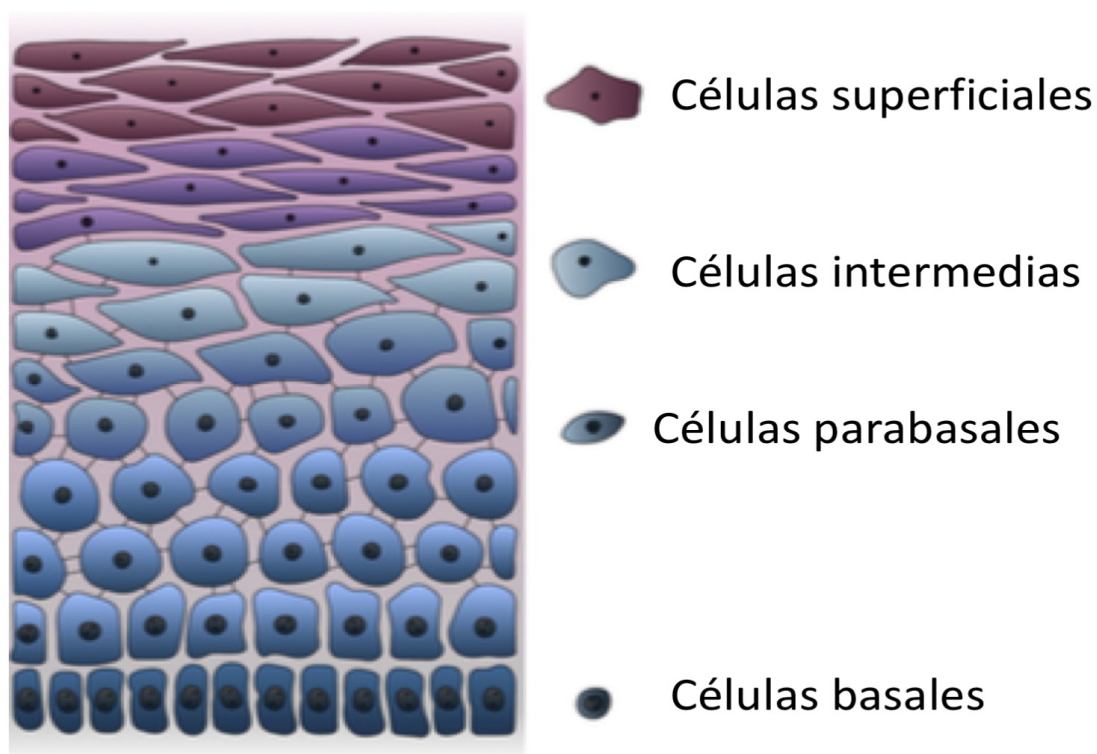


Figura 6. Esquema del tejido vaginal escamoso estratificado no queratinizado. (Adaptado de Schnell, *Microbiología de la vaginal*) (111).

### 1.5.1. La mucosa vaginal como vía de administración de fármacos

Los dos principales pasos que debe seguir un fármaco para que sea absorbido a través de la vagina son la disolución y la penetración en el fluido vaginal. En consecuencia, todos los factores que están asociados a la estructura y fisiología del epitelio vaginal y las características fisicoquímicas, como es el perfil de liberación del fármaco, se consideran los aspectos más relevantes para poder alcanzar el epitelio (112).

Aunque la vagina no es una verdadera mucosa, el transporte de fármacos se lleva a cabo a través de un mecanismo de múltiples vías, similar al de otras membranas biológicas. Los mecanismos de absorción son similares a los de cualquier otra mucosa, los cuales incluyen mecanismos pasivos y activos. Los mecanismos pasivos pueden ser, a través de las membranas de las células (transcelulares) y a través de los fluidos intercelulares y uniones estrechas (paracelulares). Las uniones estrechas y otras uniones (adherentes y desmosomas) están presentes en el epitelio vaginal y cervical con una mayor expresión en el endocervix. La importancia de estas estructuras es el papel protector que desempeñan frente a la colonización de la mucosa por bacterias y virus, además de la penetración de fármacos (113).

Las uniones estrechas se componen de proteínas transmembrana (occludinas, claudinas y moléculas de adhesión) que entran en contacto con el espacio intercelular y crean un red que restringe la difusión paracelular de las moléculas a través de la lámina epitelial. Adicionalmente, las uniones estrechas tienen un papel estructural en la polarización epitelial, al limitar la movilidad de las moléculas unidas a membranas entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática de cada célula epitelial (114).

El transporte activo genera gradientes a través de las barreras. El transporte puede ser activo primario o activo secundario siendo este último un proceso que está acoplado indirectamente a adenosin tri-fosfato (ATP), mientras que el primario es un proceso que utiliza directamente ATP durante todo el ciclo del transporte, aunque en diversos estudios se ha demostrado que los mecanismos de penetración de fármacos están relacionados con mecanismos de difusión pasiva (115).

Las moléculas lipófilas y de bajo peso molecular tienden a ser mejor absorbidas que las moléculas más grandes e hidrófilas. Los principales factores que afectan la absorción a través de la vagina son la cantidad de fluido y la composición, factores que interfieren directamente en la disolución del fármaco antes del transporte. Una cantidad excesiva de fluido puede llegar a remover el fármaco antes de alcanzar el epitelio, sin embargo la presencia de moco cervical es importante para aumentar la bioadhesión al epitelio. La producción de estrógenos como consecuencia de la estimulación de la proliferación de las células epiteliales pueden llegar a afectar la farmacocinética a través de la vagina, ya que se aumenta el riego sanguíneo, la trasudación y la producción de moco cervical. Este aspecto es importante cuando se desea una acción sistémica de un fármaco, además se debe tener en cuenta características como espesor del epitelio, cambios enzimáticos y hormonales, pH vaginal (interfiere con la ionización de fármacos) (116,117).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la composición de la formulación es de vital importancia, ya que este puede causar irritación, inflamación y daño, provocando una ruptura de la barrera, lo que llevaría no sólo a un aumento de su absorción sino que además puede promover la penetración de agentes infecciosos.

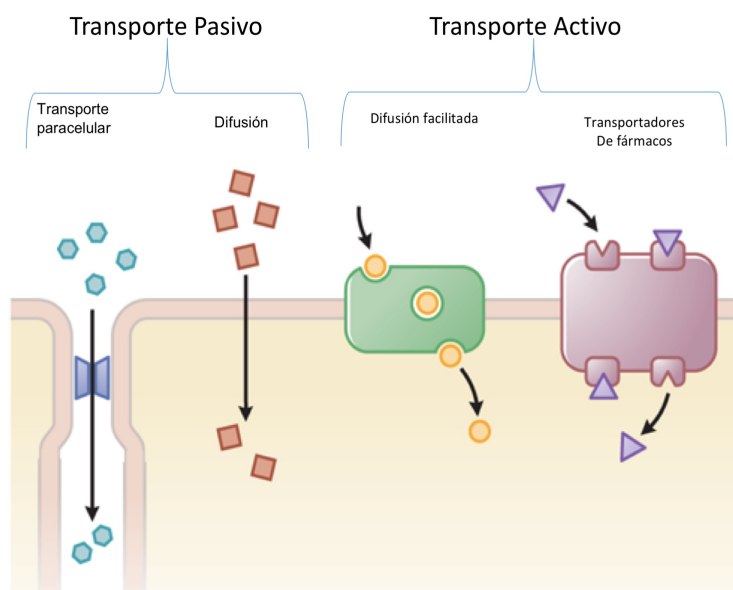


Figura 7. Esquema de la dinámica de la absorción de fármacos a través de la mucosa. ([www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com)).

### 1.5.2. NPs como sistemas de liberación de Fármacos a través de la mucosa vaginal

Además de las ventajas ya mencionadas con respecto a la liberación de fármacos a través de la vagina existen otras que deben ser citadas, tales como son una administración de dosis pequeñas con menos efectos secundarios, además para fármacos que actúan localmente la aplicación tópica da lugar a concentraciones más elevadas y una eficacia mejorada.

Desde que fueron descritos los mecanismos de absorción de fármacos a través de la mucosa vaginal, los estudios de liberación se han intensificado, involucrando sistemas de liberación controlada como NPs, liposomas, dendrímeros, films y geles entre otros.

El desarrollo de NPs ha incrementado el interés de muchos investigadores, ya que además de proteger el fármaco de la degradación enzimática, las NPs pueden mejorar la eficacia del fármaco gracias a que pueden adherirse al tejido diana y aumentar el tiempo de residencia del fármaco. Actualmente, el diseño de NPs como vehículos de transporte y liberación de fármacos en la mucosa vaginal, está enfocado hacia el desarrollo de estrategias que impidan el aclaramiento de las NPs por el moco vaginal (118).

En un estudio de permeación se demostró que las NPs cubiertas con polietilenglicol (PEG), se difunden a través del moco cervical con una velocidad similar a la penetración en agua, pero cientos de veces más rápido que las NPs no cubiertas; esto generó la hipótesis de que la penetración de las NPs a través de moco mejora el tiempo

de retención y la distribución del fármaco, mientras que si las NPs son atrapadas en la capa externa del moco, existe mayor posibilidad de que sean removidas (119).

Para que un sistema NPs sea eficiente en transporte y liberación de fármacos a través de la mucosa, debe cumplir cierto tipo de características terapéuticas tales como son una liberación controlada y sostenida, una penetración profunda en el tejido y protección del fármaco tanto a nivel intracelular como extracelular (120).

Las membranas mucosas son superficies húmedas que recubren muchas cavidades del cuerpo entre ellas el epitelio vaginal. Así como en otros órganos, la membrana mucosa de la vagina proporciona lubricación y humectabilidad de las células superficiales del epitelio. Para mejorar la eficacia terapéutica de los sistemas de liberación controlada a través de la mucosa, las formulaciones deben tener propiedades de mucoadhesividad. La mucoadhesión es definida como una interacción en la interfase entre una forma de dosificación terapéutica y la membrana mucosa (121,122).

En la actualidad la incorporación de polímeros mucoadhesivos en el diseño y desarrollo de NPs para la liberación de fármacos a través del tracto vaginal es trascendental, porque además de aumentar el tiempo de residencia, incrementa la penetrabilidad a través del epitelio mediante la alteración de las uniones estrechas entre las células (123).

Como fue mencionado anteriormente, el principal obstáculo que tienen que superar las NPs que son utilizadas para el transporte de fármacos a través de la vagina, es el moco vaginal. Es bien sabido, que las NPs que penetran el moco, deben evitar las interacciones con las fibras de mucina y tener un tamaño adecuado ( $\leq 300$  nm) para evitar la inhibición estérica de la malla de fibras de mucina (122).

La mucoadhesión es un fenómeno que a pesar de la gran variedad de estudios que se han realizado para comprender mejor los mecanismos que la gobiernan, aún sigue siendo un aspecto complejo de comprender y por lo tanto el diseño de formas farmacéuticas basadas en dicho fenómeno sigue siendo tema de investigación. En la tabla 1 se muestran algunas de las teorías que explican el fenómeno de la mucoadhesión



Tabla 1. Teorías y mecanismos de mucoadhesión

Teoría	Mecanismo	Tipo/condición del Polímero	Referencia
Humectabilidad	Capacidad del polímero mucoadhesivo para extenderse sobre la capa mucosa	En forma líquida	(124)
Electrónica	Transferencia de electrones entre el polímero y la capa mucosa	Polímero cargado	(125)
Difusión	Penetración del polímero dentro del moco a una profundidad de 0.2 – 0.5 mm	Buena interacción y solubilidad	(126)
Adsorción	El polímero interactúa con el moco mediante uniones covalentes, metálicas, iónicas o fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas	Polímeros con múltiples grupos funcionales	(124)
Fractura	Dificultad de separación, tras la adhesión del polímero al moco	Polímeros sólidos/rígidos	(127)
Mecánica	Aumento de la rugosidad de la superficie de contacto, lo cual aumenta la adhesión	Polímeros rugosos/porosos	(123)

(Adaptada de J Neves., *et al*) (118)

### 1.5.3. NPs como sistemas de liberación vaginal para la prevención del VIH-1

En la actualidad, existen más de 50 moléculas candidatas a microbicidas para la prevención del VIH-1 en desarrollo pre-clínico y otras 12 en diferentes etapas de desarrollo clínico. Una de las alternativas más exploradas para la administración dirigida de microbicidas son las NPs poliméricas. Las NPs fabricadas a partir de PLGA están siendo objeto de investigación gracias a que pueden superar los problemas típicos de los fármacos tales como son semivida biológica, estabilidad conformacional, estabilidad fisicoquímica, solubilidad y respuesta inmunológica. En el caso de los microbicidas vaginales, las NPs de PLGA pueden servir no sólo para proteger el agente activo, sino que además también para facilitar la penetración a través de la mucosa vaginal y ectocervical permitiendo que el agente terapéutico alcance, ya sea el caso, las células diana del VIH ó interaccione directamente con el virus impidiendo su fusión e integración en el genoma de la célula blanco (128).

En vista de las facilidades que ofrece la mucosa vaginal como una vía de administración de fármacos, en la actualidad existen algunos estudios en los cuales se han utilizado NPs para encapsular y liberar fármacos anti-VIH-1 en la mucosa vaginal. En la tabla 2 se describen los investigaciones más relevantes en este campo.

Tabla 2. NPs cargadas con diferentes agentes anti-VIH

Tipo de NPs	Agente anti-VIH	Tamaño de las NPs (nm)	Zeta-potencial (mV)	Actividad anti-VIH	Ref
PLGA-NPs	PSC-RANTES	256,5± 19.5	-10,3±1.8	IC <sub>50</sub> : 425 fM	(129)
PLGA-NPs	Dapivirine	168,1± 2.4	-20,9±1.4	NR	(130)
NPs de Lactoferrina	Efavirenz, Curcumina	Entre 40 – 70	-21 a -25	NR	(131)
NPs de Eudragit S-100®	Tenofovir (TNF)	226,4±12,6 (TNF)	-5,31±1,1	NR	(132)
	Etravirine (ETV)	264,4±29,6 (ETV)	-10,7±1,6	NR	
NPs de Chitosan	Tenofovir	281,6±25,6	53,0±0,5	NR	(133)
NPs de Policaprolactona	Dapivirine	198,0±3,0	30,5±2,4	EC <sub>50</sub> : 1-4 μM	(134)

NR: No hay datos reportados.



## **2. OBJETIVOS**







### 2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de NPs poliméricas para la encapsulación y liberación en la mucosa vaginal de péptidos inhibidores de la fusión del VIH-1.

Para poder alcanzar este objetivo el estudio se dividió en tres etapas. La primera etapa se centra en la síntesis de péptidos derivados de las proteínas E1 y E2 del virus del GB-C con efecto inhibidor de la fusión del VIH-1 en las células diana y su derivatización con sondas fluorescentes

La segunda etapa conlleva el desarrollo, optimización y caracterización fisicoquímica y morfológica de NPs poliméricas recubiertas con Glycol-Chitosan (GC-PLGA-NPs) cargadas con los péptidos sintetizados y sus correspondientes derivatizados fluorescentes.

La tercera etapa se centra en el diseño y desarrollo de ensayos *ex vivo* e *in vivo* para evaluar la toxicidad y capacidad de absorción y penetración de las GC-PLGA-NPs en un modelo de mucosa vaginal. Además, se estudió el perfil de liberación de los péptidos inhibidores de la fusión del VIH-1 en el modelo de mucosa vaginal.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

La primera y segunda etapa del estudio se centran en la obtención de péptidos inhibidores de la fusión del VIH y su encapsulación en GC-PLGA-NPs. Para su desarrollo se plantean los siguientes objetivos específicos

- Sintetizar y purificar los péptidos E1P47 y P6-2 derivados de las proteínas de envoltura E1 y E2 del virus GBV-C, utilizando la estrategia de Síntesis de péptidos en fase sólida (*SPPS*).
- Derivatizar con [5-(6)FAM] los péptidos sintetizados (E1P47-FAM y P6-2-FAM)
- Diseñar y optimizar las PLGA-GC-NPs que contienen el péptido E1P47, utilizando un diseño factorial.
- Encapsular los péptidos sintetizados y sus respectivos derivatizados en las PLGA-GC-NPs utilizando la formulación optimizada (NPsE1P47; NPsP6-2; NPsE1P47-FAM; NPsP6-2-FAM).
- Caracterizar fisicoquímicamente las PLGA-GC-NPs que contienen los péptidos inhibidores, analizando sus propiedades morfométricas y morfológicas (diámetro hidrodinámico, la distribución de tamaño, la carga superficial, la eficiencia de atrapamiento del péptido en el polímero y el perfil de liberación).
- Evaluar el estado físico del péptido E1P47 y sus posibles interacciones con los demás componentes de la formulación, utilizando rayos-X y espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (espectroscopia de FTIR) .



- Determinar por citometría de flujo la captación y/o absorción de las NPsE1P47-FAM en una la línea celular HeLa que expresa la proteína de envoltura del VIH.
- Determinar el contenido de P6-2 en las PLGA-GC-NPs utilizando un análisis de aminoácidos

La tercera etapa del estudio se centra en la evaluación de la toxicidad, permeacion y grado de penetrabilidad de las PLGA-GC-NP. Para la ejecución de esta etapa se plantean los siguientes objetivos específicos

- Determinar mediante ensayos *ex vivo* e *in vivo* el grado de penetración y seguridad de las NPsP6-2-FAM, utilizando mucosas vaginales de cerdo.
- Evaluar la permeacion *ex vivo* e *in vivo* de NPsE1P47 en mucosas vaginales de cerdo
- Determinar tanto *ex vivo* como *in vivo* la cantidad de péptido E1P47 formulado y no formulado que es retenido por la mucosa vaginal.





### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**





#### 3.1 REACTIVOS Y SOLVENTES

La tabla 3 muestra la relación de reactivos y solventes con sus respectivas casas comerciales, utilizado para la síntesis de los péptidos y la preparación y caracterización de las NPs los equipos utilizados para el desarrollo del estudio.

Tabla 3a. Reactivos y disolventes utilizados en la síntesis de los péptidos

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS	
Reactivos y Solventes	Casa comercial
Aminoácidos y Resinas 5(6)- Carboxifluoresceína	Novabiochem
Ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) N,N-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) Piridina N,N-Diisopropiletilamina (DIEA) Cloroformo Metanol	Fluka
Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo- [4,5-b]piridin-1-il-metilil]-N-metilmetanaminio (HATU)	Genscript
Piperidina Anhidrido acético 1,2-Etanoditiol (EDT) Ácido 6-(7-Nitrobenzofurazan-4-ylamino)esanoico (NBD) Triisopropilsilano (TIS) 2-mercaptoetanol (BME)	Sigma
Etanol absoluto Acetona Cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4- benzoquinona)	Carlo Erba
Ácido 2,5- dihidroxibenzoico (DHB)	BRUKER
Diclorometano                      Resina Amberlite MB-3 Ninhidrina Éter dietílico Acetonitrilo Bromuro de litio	MERCK
N,N-Dimetilformamida Ácido acético  Ácido trifluoroacético	Scharlau

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3b. Reactivos y productos utilizados para el desarrollo, optimización y caracterización de GC-PLGA-NPs

Reactivos	Casa Comercial
PLGA Resomer <sup>®</sup> 503H 34 kDa	Boehringer Ingelheim
Polyvinyl alcohol (PVA)	BASF
Glycocl Chitosan (50-190 kDa) Hepes solución (1M pH 7,0 – 7,6)	Sigma Aldrich
<b>Ensayos <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i></b>	
Reactivos	Casa Comercial
DTT ( <i>threo</i> -1,4-Dimercapto-2,3-butanediol) Paraformaldehído	Sigma
DRAQ5 (1,5-bis {[2-(di-methylamine) ethyl] amino}-4,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione)	BD, Bioscience
Tissue-Tek <sup>®</sup> O.C.T	Sakura Finetek
Transcutol <sup>®</sup>	Gattefossé
FBS inactivado (Fetal Bovine Serum, 10270106, Invitrogen) Penicilina-Estreptomicina (P11- 010, PAA) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D5796, Sigma)	PAA



#### 3.2 INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPOS

El instrumental utilizado y la casa comercial se muestran en la Tabla 4

Tabla 4. Instrumentación y marca comercial

Instrumentación /Equipos	Marca comercial
HPLC	Waters® 2695
HPLC	Agilent® 12690
Detector diode array	Waters® 2996
Detector líquido-masas de tiempo de vuelo	LCT Premier XE (Micromass Waters)
Espectrómetro de masas MALDI-TOF	Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics)
Microscopio electrónico de Barrido	Hitachi S43000
Microscopio Confocal	TCS-SL-Leica Microsystems
Microscopio electrónico de luz Transmitida A1+	NIKON
Ultracentrifuga PF09	Beckman coulter
Liofilizador	Lioalfa, Telstar
Equipo de Agua Milli-Q	Milipore
Baños de Ultrasonido	Selecta
Baño María	Nirco
Sonda de Ultrasonido XL 2000	Z sizer Nano S (Malvern)
Medidor de tamaños y cargas	Formulacion
Turbiscan Lab Expert	PermeGear
Células de Franz	Leica Microsystems
Criostato Leica CM1510	Leica Microsystems

### 3.3 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPPS)

Los péptidos inhibidores de la fusión del VIH-1 (E1P47 y P6-2) fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos, IQAC-CSIC. La síntesis se llevo a cabo manualmente en fase solida, como fue descrita por Merrifield (135).

La síntesis en fase sólida se basa en el crecimiento de la cadena mediante adición consecutiva de aminoácidos sobre una resina.

El primer aminoácido que se acopla es el que corresponde al último de la secuencia, es decir que la síntesis va desde el extremo N-terminal a el extremo C-terminal. El acoplamiento de cada aminoácido nuevo a la secuencia se hace a través de su extremo carboxilo, el grupo amino, así como las cadenas laterales están protegidas para evitar reacciones secundarias y de polimerización. Una vez finalizada la secuencia, el péptido es desanclado de la resina junto con la remoción de los grupos que protegen las cadena laterales de los L-aminoácidos.

Esta síntesis puede llevarse a cabo utilizando dos estrategias diferentes: La estrategia Boc/Bzl y la estrategia Fmoc/tBu. La estrategia Boc/Bzl utiliza el grupo tert-butoxicarbonil (tBOC) para proteger los grupos  $\alpha$ - amino y las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales se protegen con grupos bencílicos, mientras que la estrategia Fmoc utiliza el grupo 9- fluorenilmetoxicarbonilo para los grupos  $\alpha$ - amino y el grupo ter-butil (tBu) para las cadenas laterales.

La síntesis de los péptidos E1P47 y P6-2 se realizó manualmente utilizando la estrategia Fmoc/tBu. Para la síntesis de E1P47 fue utilizada la resina NovaSyn<sup>®</sup> TGR con una funcionalidad de 0,023 mmol/g. Para la síntesis de P6-2 fue utilizada la resina NovaSyn<sup>®</sup> TGA, esta resina está funcionalizada con el ácido hidroximetilfenoxiacético, razón por la cual el primer aminoácido es acoplado a la resina mediante la formación de un enlace éster (Figura 8)

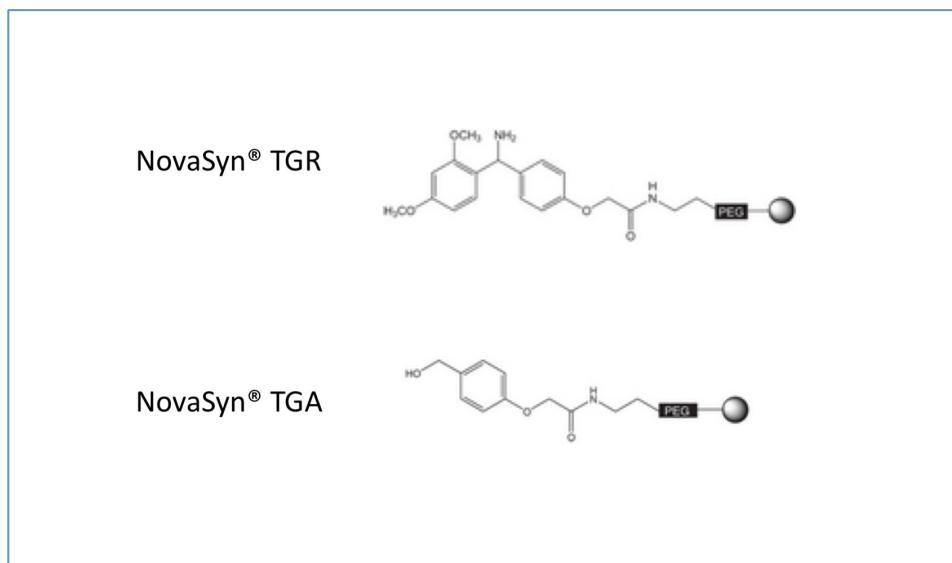


Figura 8. Resinas NovaSyn® TGR y NovaSyn® TGA.

Para el acoplamiento del primer aminoácido, se llevó a cabo la esterificación de la resina mediante la formación de un anhídrido simétrico del aminoácido en presencia de DMAP (4-Dimetilaminopiridina).

Para la formación del anhídrido simétrico se disolvió el aminoácido (10 equivalentes en exceso, respecto a la funcionalización de la resina) en DCM, con 1 ó 2 gotas de DMF para completar la disolución. Se adicionaron 5 equivalentes de DIPCIDI (respecto a la funcionalización de la resina) disuelto también en DCM. La mezcla se dejó reaccionar durante 20 minutos a 0°C en un ambiente seco que se consiguió tapando el balón con un tubo relleno de CaCl<sub>2</sub>. Después, se evaporó el DCM en un rotavapor. El residuo seco obtenido se disolvió en la mínima cantidad de DMF y se adicionó a la resina. Seguidamente, se adicionaron 0,1 equivalentes de DMAP también disuelto en DMF. Después de 1 hora de reacción a temperatura ambiente con agitación ocasional, se eliminaron los excesos de reactivo realizando lavados de DMF.

Se determinó el porcentaje de incorporación del primer aminoácido sobre la resina, y la funcionalización real fue determinada mediante la detección de la N-fluorenilmetilpiperidina que se obtiene al liberar el grupo Fmoc con piperidina. Para llevar a cabo el ensayo se pesó una cantidad de Fmoc-aminoácido-resina seca equivalente a 5 μmol respecto a la funcionalización de la resina. Se le adicionaron 2 ml de una disolución de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-7-undeceno (DBU) al 2% en DMF y se agitando durante 30 minutos. Posteriormente la solución se enrasó hasta 10 ml con acetonitrilo (ACN) y de esta solución se tomaron 2 ml y se enrasó a 25 ml con ACN. Paralelamente, se preparó un blanco que contenía únicamente la disolución sin Fmoc-aminoácido-resina. Se

midieron las absorbancias de la muestra y el blanco en cubetas de cuarzo a la longitud de onda de 304 nm. Se calculó la nueva funcionalización en ( $\text{mmol g}^{-1}$ ) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Fmoc}(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}) \times 16.4}{\text{mg de resina}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

#### 3.3.1. Acoplamiento y activación de los L-aminoácidos

Los acoplamiento se llevaron a cabo activando con carbodiimidas y sales de fosfonio o uronio el grupo  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido entrante. Estos activadores permiten obtener altos rendimientos en la formación del enlace amida y además minimizan las reacciones secundarias como la recemización que se puede producir durante la síntesis.

Las carbodiimidas más utilizadas en la síntesis de péptidos son N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) que es muy soluble en las ureas que se forman como subproductos de síntesis. Las sales más utilizadas en la síntesis de péptidos son el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)ofonio (PyBOP), derivadas de HOBt, el 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio y el hexafluorofosfato (HATU), esta última sal es preferida a la hora de la síntesis, ya que su utilización produce mejores resultados en cuanto a la eficiencia de la activación y la casi total ausencia de racemización. Estas sales en presencia de una base, generalmente una amina terciaria como la N,N-diisopropiletilamina (DIEA), pueden convertir el carboxilato del aminoácido protegido en una especie activada.

El acoplamiento de los aminoácidos se llevo a cabo formando un enlace peptídico entre el grupo amino de la cadena peptídica en crecimiento que se encuentra anclada a la resina y el grupo carboxilo del aminoácido entrante. Para la síntesis de los péptidos E1P4 y P6-2 se utilizaron los activadores HATU/DIEA.

El procedimiento se llevó cabo pesando 3 equivalentes en exceso tanto del aminoácido como del activador HATU, que se disolvieron en DMF y una vez disueltos se añadió a la solución la DIEA. A continuación, la solución se adicionó a la resina y se dejó reaccionar durante aproximadamente 15 minutos. Una vez finalizado el tiempo de reacción, la resina se lavó varias veces con DMF para eliminar el exceso de reactivos y de aminoácidos que no llegaron a reaccionar.

### 3.3.2. Test de detección de grupos amino

#### 3.3.2.1. Test de Kaiser o Ninhidrina

El test de ninhidrina o Kaiser (136) se utiliza para identificar los grupos aminos primarios libres. La ninhidrina reacciona con los grupos aminos primarios que se encuentran desprotegidos obteniéndose una coloración azul púrpura (test positivo). Para preparar la solución de ninhidrina se utilizaron los siguientes reactivos:

➤ *Reactivo A*

Solución 1: 20g de fenol se disuelven en 5 ml de etanol absoluto calentando poco a poco bajo campana de extracción. Posteriormente se adiciona 4g de resina Amberlite y se deja reaccionar durante 3 horas bajo agitación.

Solución 2: 6.5mg de KCN se disuelven en 10 ml de agua milliQ. De esta solución se toma 1ml y se enrasa con 50 ml de piridina. Se adiciona 4g de resina Amberlite y se deja reaccionar durante 3 horas bajo agitación.

Filtrar ambas soluciones y mezclar.

➤ *Reactivo B*

2,5g de ninhidrina en 50 ml de etanol absoluto.

Para realizar el test se adiciona una pequeña porción de la peptidil resina en tubo de vidrio, luego se añaden 3 gotas del reactivo A y 3 gotas del reactivo B. Simultáneamente se realiza esta misma operación utilizando un tubo que no contiene peptidil resina, que servirá de control. Se agitan ambos tubos y se colocan en una estufa a 110°C. La aparición de perlas amarillas indica que **NO** hay grupos aminos libres (test negativo), a lo que atribuimos que el proceso de acoplamiento ha sido efectivo.

#### 3.3.2.2. Test de Cloranilo

Este test se utiliza para determinar cualitativamente aminas secundarias libres como la prolina (137). Mediante este método se puede evaluar el acoplamiento de este y el siguiente aminoácido. El reactivo utilizado es una solución saturada de 0,75 g de cloranilo en 25 ml de tolueno.

El test se realiza de forma similar al test de ninhidrina. Se adiciona una pequeña porción de peptidil-resina en un tubo de vidrio, y se añaden 4 gotas de acetona y 1 gota de solución saturada de cloranilo, a temperatura

ambiente. Una coloración azul-verdosa es indicativo de la presencia de aminas secundarias libres, y por lo tanto indica un resultado positivo del test. Este método no es tan sensible como el test de Kaiser.

#### 3.3.2.3. *Test del TNBS*

Con este método se pueden determinar tanto aminas primarias como secundarias libres (138). EL TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfónico) reacciona con los grupos aminos libres, obteniéndose una coloración naranja (test positivo). Para realizar el test se agrega una pequeña cantidad de peptidil-resina a un tubo de vidrio, se añaden 3 gotas de DIEA al 10 % en DMF y 3 gotas de TNBS al 1 % en DMF.

#### 3.3.3. **Desprotección del grupo $\alpha$ -amino**

Para llevar a cabo el acoplamiento del aminoácido entrante, se lleva a cabo la remoción del grupo Fmoc, que protege el  $\alpha$ -amino del aminoácido que está anclado a la resina. Fmoc es un grupo relativamente lábil en bases orgánicas principalmente aminas secundarias, aunque también puede ser removido en presencia de bases primarias y terciarias. La desprotección se realiza con una solución de piperidina al 20% en DMF. El procedimiento se basa en la adición de la solución de piperidina hasta cubrir completamente la resina. Una vez ha transcurrido el tiempo de reacción (aproximadamente 10 minutos), los restos de piperidina son removidos de la resina mediante varios lavados con DMF.

#### 3.3.4. **Derivatización de los péptidos con sondas fluorescentes**

Una vez finalizada la síntesis del péptido y previo al desanclaje de la resina, parte de la peptidil-resina se utilizó para hacer la derivatización con 5(6)-FAM.

Una vez se acopla el último aminoácido de la secuencia, se elimina el grupo Fmoc, dejando libre el grupo  $\alpha$ -amino. Paralelamente, se activan 3 equivalentes en exceso de la sonda en presencia de activadores del grupo  $\alpha$ -carboxilo, la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). La sonda y el HOBt se disolvieron en DMF y posteriormente se adicionaron 3 equivalentes en exceso de DIPCDI; la mezcla se dejó en reposo aproximadamente 10 minutos y, posteriormente, se agregó a la peptidil-resina. La reacción se llevó a cabo durante 24 horas protegida de la luz. Transcurrido el tiempo de la reacción, la peptidil-resina se lavó varias veces con DMF para eliminar los restos de sonda y reactivos. El acoplamiento fue evaluado realizando el test de ninhidrina.

#### 3.3.5. Desanclaje y desprotección

Una vez finalizada la síntesis y eliminado el grupo Fmoc del último aminoácido acoplado, se procede al secado de la peptidil-resina para eliminar el DMF y los restos de bases que puedan interferir con el desanclaje. Posterior al secado de la peptidil-resina, esta se coloca en un desecador en condiciones de vacío para eliminar los excesos de solventes. Las condiciones de secado de la resina se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Tratamiento de secado de la peptidil-resina

Pasos	Lavados	Ciclos x tiempos (minutos)
1	Ácido acético	2 x 1
2	Diclorometano	2 x 1
3	Metanol	2 x 1
4	Éter	4 x 1

El desanclaje del péptido de la peptidil-resina se llevó a cabo mediante un proceso de acidólisis. Para lo cual fue utilizado el ácido trifluoroacético (TFA).

Para realizar el desanclaje se preparó un cóctel con TFA/BME/TIS/H<sub>2</sub>O en una proporción de (94:2.5:2.5:1). La reacción entre la peptidil-resina y el cóctel se llevó a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo de la reacción, el TFA se evaporó bajo una corriente de N<sub>2</sub> (g) y el péptido se lavó 10 veces con éter frío, centrifugando cada vez a 3000 rpm durante 5 minutos a 10°C. Al finalizar los lavados, el péptido se disolvió en una solución de ácido acético al 30 % y se liofilizó. El liofilizado fue almacenado a -20°C hasta su uso.

#### 3.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS

Los péptidos purificados fueron caracterizados por HPLC analítico, cromatografía de ultrapresión (UPLC), adaptado a espectrometría de masas electrospray (ES-MS) y espectrometría de masas MALDI-TOF.

##### 3.4.1. Caracterización analítica de los péptidos por HPLC

La caracterización se llevó a cabo utilizando un HPLC. Se utilizaron las columnas de fase reversa Kromasil (Teknokroma) C8 (4,6 x 250 mm y 5 µm de tamaño de partícula) y la columna *Eclipse Plus* C18 (4,6 x 100 mm, y 3,5 µm de tamaño de partícula). Los péptidos se eluyeron a un flujo de 1 ml/min y un gradiente lineal de los disolventes A y B (A: H<sub>2</sub>O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA). La detección se realizó a 220 y 280.

#### 3.4.2. Caracterización de los péptidos por UPLC/ES-MS

Los pesos moleculares de los péptidos sintetizados fueron detectados mediante un espectrómetro de masas por ionización con electrospray acoplado a un UPLC ACQUITY (Waters). La medida de masas por electrospray (ES-MS) consiste en la generación de un spray de iones de la muestra a una determinada energía en la cámara de ionización. Estos iones pasan al analizador mediante una serie de lentes con un voltaje determinado. Para ello, se utilizó un detector líquido-masas de tiempo de vuelo (LC-TOF) LCT Premier XE (Micromass Waters) con una interfase electrospray positiva (ES+) o negativa (ES-), en función de la molécula a analizar.

Se utilizó una columna en fase reversa ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm y tamaño de partícula 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters). Los péptidos fueron disueltos en una mezcla de ACN/ H<sub>2</sub>O (1/1, v/v), se eluyeron a un flujo 0,3 ml/min y un gradiente lineal de los disolventes A (H<sub>2</sub>O con 20 mM HCOOH) y B (ACN con 20 mM HCOOH). La detección se realizó a una longitud de onda de 220 y 280 nm.

#### 3.4.3. Caracterización de los Péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF

La confirmación de la presencia del péptido se realizó mediante la detección de sus pesos moleculares utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF. Este tipo de espectrometría de masas utiliza el láser como fuente de ionización y consiste en bombardear directamente la muestra cristalizada constituida por una mezcla del péptido y una matriz.,

La preparación de la muestra se realizó mezclando 1  $\mu\text{l}$  de solución del péptido (1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) con 1  $\mu\text{l}$  de solución de matriz. Posteriormente, 1  $\mu\text{l}$  de la muestra se colocó en la placa de MALDI-TOF y se dejó secar a temperatura ambiente.

La matriz utilizada fue el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB). Se empleó un espectrómetro Auto Flex III Smartbeam (Bruker Daltonics) y una placa MTB 384 polished steel (Bruker). Se utilizó como método de adquisición el método lineal con un voltaje de polaridad positiva.

### 3.5. DESALACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS

#### 3.5.1. Purificación de los péptidos en HPLC a escala semi-preparativa

Los péptidos sintetizados se purificaron por HPLC a escala semipreparativa con las columnas Bridge (Agilent) de fase reversa C8 y C18, (22 x 250 mm y 5  $\mu\text{m}$ ), en un cromatografo Agilent 1260 Infinity. Se utilizó un flujo de elución de 3,5 ml/min con un gradiente lineal de los disolventes A y B (A: H<sub>2</sub>O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA). La detección se realizó a una longitud de onda de 220 nm. Las fracciones recogidas durante



la purificación de los diferentes péptidos, se caracterizaron mediante HPLC analítico y espectrometría de masas (UPLC, ES-MS y/o MALDI-TOF).

#### 3.5.2. Extracción en fase sólida

Los crudos peptídicos obtenidos tras la síntesis y desanclaje de la resina, fueron desalados utilizando columnas Oasis HLB Plus cartridge 225 mg/60 µg de Waters. El procedimiento se inicia acondicionando la columna con 5 ml de metanol y posteriormente con 5ml de H<sub>2</sub>O. A continuación, se añadió una disolución del péptido en H<sub>2</sub>O/ACN (1 mg/ml) y posteriormente se adicionaron 5 ml H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA para eluir las sales del crudo peptídico. Después, se eluyó el péptido con 5 ml de H<sub>2</sub>O/ACN (80:20). Por último se añadieron 5 ml de ACN para recoger los restos de péptido que podían haber quedado retenidos en la columna. Cada fracción de filtrado fue colectada en un tubo diferente de polipropileno de 10 mL. Los filtrados recogidos, se caracterizaron por HPLC analítico, UPLC y ES-MS con el fin de identificar la fracción que contenía el péptido.

#### 3.6. DISEÑO DE LAS GC-PLGA-NPS

Las NPs que contienen los péptidos inhibidores de la fusión se prepararon utilizando el método de la doble emulsión y evaporación del solvente (w/o/w) descrito por Ogawa et al (139). Este método consiste en cuatro pasos fundamentales: (i) una primera emulsión: la solución acuosa que contiene el agente activo (denominada fase interna acuosa, W<sub>1</sub>) se emulsifica en la fase orgánica que contiene el polímero biodegradable (PLGA/fase oleosa, O), (ii) re-emulsificación: La primera emulsión (W<sub>1</sub>/O) es emulsificada en una segunda fase acuosa que contiene un estabilizador o surfactante, en este caso es PVA/GC, (esta se conoce como fase acuosa externa, W<sub>2</sub>), para finalmente formarse la doble emulsión W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>, (iii) solidificación: en este paso el solvente orgánico se elimina por evaporación o extracción y entonces se forman las partículas sólidas y (iv) separación y purificación: las partículas sólidas se colectan por centrifugación o filtración.

Para la preparación de las NPs de este estudio, 50 mg de PLGA Resomer<sup>®</sup> 503 H (50:50) se disolvieron en 1 ml de diclorometano. Paralelamente, se preparó la fase interna acuosa (FIA) disolviendo 1,5 mg de péptido en 500 µl de una solución de ACN:Hepes. Para el péptido E1P47 la proporción de ACN:Hepes fue de 1:4 (v/v) y para P6-2 fue de 2:3 (v/v). El pH de la solución final de Hepes fue ajustado a 7,4. Posteriormente, se preparó la fase externa acuosa, para ello se pesó 150 mg de PVA y 3 mg de GC. El PVA fue disuelto bajo agitación constante en 6 ml de agua ácida (pH 4,2), una vez se evidenció la disolución del surfactante, se adicionó el GC, manteniendo la agitación constante hasta su disolución completa (aproximadamente 1 hora).

Una vez fueron preparadas las fases (orgánica, FIA y acuosa externa), se adicionó FIA a la fase orgánica y se emulsificó en frío para evitar el calentamiento de la suspensión, utilizando una sonda de ultrasonidos a una amplitud de 38 % a una temperatura de 10 °C durante 30 segundos, formándose la primera emulsión (W<sub>1</sub>/O). Posteriormente, la primera emulsión es adicionada a la fase acuosa externa y re-emulsificada durante 1 minuto en las mismas condiciones, formándose la doble emulsión W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>. La evaporación del solvente se llevó a cabo mediante agitación constante (395 rpm) en cámara extractora y a temperatura ambiente durante 24 horas.

Las NPs se purificaron haciendo 2 lavados con agua Milli-Q y ultracentrifugando a 15000 rpm a una temperatura de 4°C, esto con el fin de eliminar el exceso de tensoactivo así como el péptido que no fue atrapado en la preparación de las NPs.

#### 3.6.1. Optimización de las GC-PLGA-NPs que contienen E1P47

Las GC-PLG-NPs se optimizaron para obtener un tamaño inferior a 300 nm y una eficiencia de asociación superior al 50 %. La optimización se llevó a cabo utilizando un diseño factorial con un mínimo de experimentos. El diseño factorial se desarrollo en base a la selección de tres factores que influyen en las propiedades fisicoquímicas de las NPs. Se usó un diseño de tres componentes de cinco niveles ( $2^3 + start$ ), para determinar los niveles óptimos de las variables seleccionadas (140).

La concentración de E1P47 ( $X_1$ ), el volumen de la FIA ( $X_2$ ) y la concentración polímero PLGA ( $X_3$ ), se seleccionaron como las variables independientes y se estudiaron en cinco niveles diferentes codificados como  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $1$ , y  $+\alpha$ . El valor para alfa (1.682) se calcula con el fin de cumplir la rotabilidad en el diseño. Adicionalmente, las variables dependientes se seleccionaron a partir de las propiedades fisicoquímicas de las NPsE1P47, es decir, el tamaño medio de partícula ( $Z\text{-Ave}$ ), el índice de polidispersidad (PI) y la eficiencia de encapsulación (EE). Los valores codificados y los valores de las variables se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Factores y niveles del diseño experimental

FACTORES	NIVELES				
	-1,68	-1	0	1,68	1
<b>X<sub>1</sub>: Concentración de Péptido (mg/ml)</b>	0,16	0,20	0,25	0,30	0,33
<b>X<sub>2</sub>: FIA (ml)</b>	0,33	0,40	0,50	0,60	0,66
<b>X<sub>3</sub>: Concentración de PLGA (% w/v)</b>	0,50	0,66	0,83	1,00	1,11

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Según la matriz de diseño compuesto central generada por el software Statgraphics Plus 5.1 (Sigma Plus) se realizaron un total de 16 experimentos, incluyendo 8 puntos factorial, 6 puntos axiales y 2 puntos centrales replicados, para la estimación de la suma pura de errores de cuadrados, (Tabla 7).

Tabla 7. Factores experimentales y de respuesta definidos por el diseño factorial compuesto rotatorio ( $2^3+$  starts)

Formulación	Factores Experimentales			Factor Respuesta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Z-Ave (nm)	PI	EE (%)
<b>Puntos Factoriales</b>						
F1	0,20	0,40	0,66	240,0 ± 2,0	0,123±0,001	21,13
F2	0,30	0,40	0,66	248,0 ± 1,6	0,187±0,011	34,29
F3	0,20	0,60	0,66	235,5 ± 3,2	0,175±0,006	67,00
F4	0,30	0,60	0,66	209,7 ± 2,9	0,132±0,012	13,12
F5	0,20	0,40	1,00	259,7 ± 0,5	0,170±0,008	37,00
F6	0,30	0,40	1,00	244,5 ± 3,3	0,154±0,014	75,00
F7	0,20	0,60	1,00	221,8 ± 0,9	0,066±0,046	26,00
F8	0,30	0,60	1,00	176,0 ± 1,9	0,222±0,016	47,50
<b>Puntos Axiales</b>						
F9	0,33	0,50	0,83	218,1 ± 1,1	0,158±0,021	69,9
F10	0,16	0,50	0,83	258,9 ± 2,4	0,151±0,029	52,9
F10	0,25	0,66	0,83	220,7 ± 1,5	0,143±0,019	37,3
F12	0,25	0,33	0,83	243,4 ± 2,0	0,195±0,032	58,0
F13	0,25	0,50	1,11	443,8 ± 16,8	0,418±0,053	83,0
F14	0,25	0,50	0,55	235,2 ± 1,9	0,145±0,003	57,5
<b>Puntos Centrales</b>						
F15	0,25	0,50	0,83	262,0 ± 0,5	0,139±0,011	80,2
F16	0,25	0,50	0,83	265,5 ± 1,8	0,139±0,040	84,6

Se calcularon los efectos y las interacciones entre variables o factores. Para determinar el efecto de un factor x

(Ex), se aplicó la siguiente ecuación:

$$E_x = \frac{\sum x(+)-\sum x(-)}{\frac{n}{2}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

$\sum x (+)$  es la suma de los factores y su nivel más alto (+1),  $\sum x (-)$  es la suma de los factores y su nivel más bajo(-1) and  $n/2$  es la mitad del número de medidas usadas para los cálculos. Las interacciones entre dos factores se simboliza como factor 1: factor 2.

La respuesta experimental del diseño factorial se obtuvo de los resultados de la influencia individual y de las interacciones de las tres variables independientes. Las respuesta obtenidas se definieron usando un a modelación matemática utilizando una ecuación polinomial de segundo orden. La ecuación se muestra a continuación

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$$

(Ecuación 6)

Donde:

Y es el factor respuesta,  $\beta_0$  es el intercepto  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  son los coeficientes lineales,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  y  $\beta_{33}$  es el coeficiente cuadrático,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  and  $\beta_{23}$  es la interacción entre coeficientes, y ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) son las variables independientes estudiadas. Los análisis estadísticos de los datos de la matriz obtenida del diseño factorial, se llevaron acabo usando el software Statgraphics Plus 5,1 (Sigma Plus). Además un análisis de varianzas (ANOVA) para identificar la significancia de los efectos y las interacciones entre ellos. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

#### 3.6.2. Encapsulación de P6-2, P6-2-FAM y E1P47-FAM en GC-PLGA-NPs

La encapsulación se llevó a cabo utilizando el método de la doble emulsión anteriormente descrito, modificando las cantidades de los péptidos que se derivatizaron con 5(6)-FAM. Con respecto a los péptidos marcados con sonda, el objetivo de ser encapsulados se estableció como un medio para evaluar cualitativamente el nivel de penetración de las NPs en un modelo de mucosa y determinar si las NPs pueden interaccionar con la membrana de las células endoteliales HeLa que expresan las proteína de envoltura del VIH-1 y si además las NPs son captadas por estas células. En la Tabla 8 se muestran las cantidades utilizadas para el desarrollo de cada una de las formulaciones y el estudio para el cual se sintetizaron.

Tabla 8. Cantidades de péptido utilizadas en el diseño de las diferentes formulaciones

Formulación	Cantidad de péptido (mg)	Estudio
NPs-P6-2	1,5	Estudios in vitro Estudios de permeación ex vivo
NPs-P6-2-FAM	1,5	Estudios de penetración ex vivo e in vivo Evaluación de la toxicidad
NPs-E1P47-FAM	0,125	Ensayos de Captación celular

#### 3.7. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACION DE P6-2 Y E1P47

La demostración de que un método analítico es fiable, es de gran importancia porque se garantiza la calidad, seguridad y eficacia del análisis. Por tal motivo, antes implementar un método analítico para su uso rutinario, este debe ser validado previamente para demostrar que es adecuado para el propósito que se destina.

El objetivo final de la validación de un método analítico, es asegurar que cada medida que se realice en el futuro, dará una verdadera estimación del valor real del contenido de un analito en una muestra.

Para esta tesis, se llevó a cabo la validación de los métodos analíticos para la cuantificación de P6-2 y E1P47, tanto en estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Los parámetros tenidos en cuenta para la validación de cada uno de los métodos fueron: (i) linealidad y rango, (ii) precisión, (iii) exactitud y (iv) sensibilidad, que se determinó mediante los límites de detección y cuantificación.

Para la determinación de la cantidad de péptido encapsulado en las GC-PLGA-NPs, se empleó el método de cromatografía líquida de alta precisión en fase reversa (RP-HPLC) con detector UV-VIS. Para la determinación de la cantidad de péptido liberado de las GC-PLGA-NPs, en los ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, se utilizó cromatografía líquida de alta precisión acoplado a un espectrómetro de masas de ionización por electrospray (HPLC-ESI-MS/MS) con un analizador triple cuadrupolo.

La RP-HPLC es un método basado en la separación de moléculas en base a su hidrofobicidad. La separación depende de la unión hidrófoba del analito desde la fase móvil, a los ligandos hidrófobos inmovilizados que están unidos a la fase estacionaria. En términos generales, la muestra es inyectada a la fase estacionaria en presencia

de tampones acuosos, posteriormente es eluida por adición de solventes orgánicos a la fase móvil. La elución puede llevarse a cabo bajo condiciones isocráticas, en la que la concentración de solvente orgánico es constante, o llevarse a cabo bajo condiciones de gradiente, en la que la concentración de solvente orgánico se incrementa en el tiempo. El analito o analitos de la muestra son eluidos en orden de hidrofobicidad creciente.

En la detección de péptidos mediante RP-HPLC, la fase estacionaria generalmente consiste de un empaquetamiento de N-alquilsilica, desde la cual los péptidos son eluidos con una concentración creciente de solvente orgánico como ACN con un modificador iónico como TFA (141).

La espectrometría de masas, es una técnica analítica que puede aportar información tanto cuantitativa como cualitativa (masa molecular y concentración) sobre las moléculas después de su conversión a iones. En termino generales, la muestra se introduce primero en la fuente de ionización del espectrómetro de masas, donde son ionizadas para adquirir cargas positivas o negativas, entonces los iones viajan a través del analizador de masas y llegan a diferentes partes del detector de acuerdo con su relación masa/carga. Una vez los iones entran en contacto con el detector, este envía señales que son recogidas en forma de espectro de masas en base a la relación masa/carga.

Existen varios métodos de ionización, entre ellos el más utilizado es la ionización por electrospray para el análisis de moléculas altamente polares como son los péptidos y las proteínas.

El proceso de ionización por electrospray ocurre en un capilar o aguja (emisor), en donde una solución acuosa del analito es aplicada desde la punta del emisor y a la cual se le aplica un potencial de 3-4 kV. Una vez, el líquido empieza a salir de la aguja, incrementa su carga y asume una forma cónica (cono de Tylor). En la punta del cono, el líquido cambia de forma a una línea fina, que se vuelve inestable ya que es forzado a retener más y más carga, y finalmente llega a un punto crítico donde no puede soportar más carga eléctrica y la solución entonces se dispersa en forma de niebla de pequeñas gotas altamente cargadas que vuelan buscando una superficie de carga opuesta (142). En la Figura 9, se muestra el mecanismo de ionización por electrospray

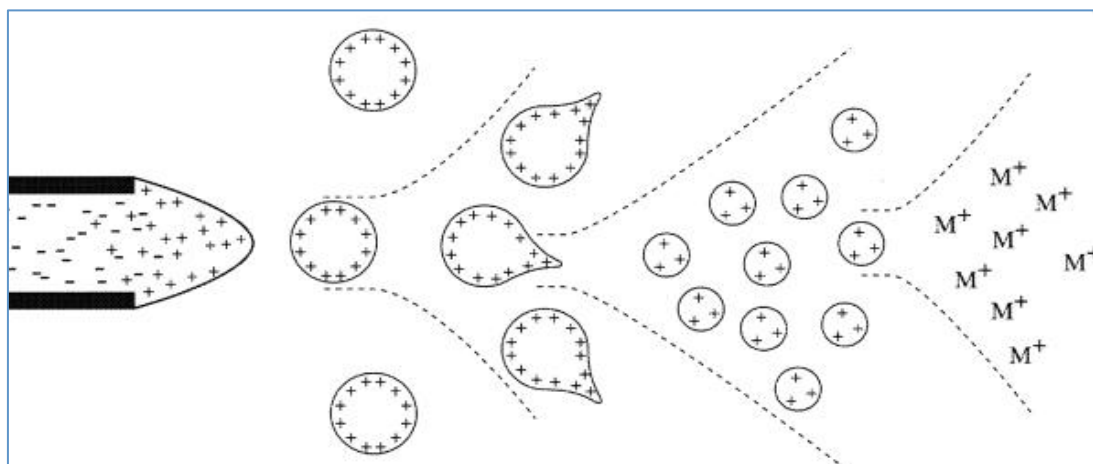


Figura 9. Esquema del mecanismo de ionización por electrospray (*Adaptado de CS Ho et,al*) (142)

Después de la ionización y del desplazamiento de los iones, los analitos entran en el analizador de masas. El espectrómetro de masas mide las señales del ión dando como resultado un espectro de masas, que da información sobre el peso molecular, estructura, identidad y cantidad de un compuesto.

El analizador está formado por tres cuadrupolos (Q1-Q3) y por lo tanto varios modos de funcionamiento que darán como resultado información diferente.

- Q1: se utiliza como filtro para la  $m/z$  específica (ión precursor)
- Q2: se utiliza como celda de colisión para fragmentar el ión precursor y generar iones producto
- Q3: configurado para la  $m/z$  específica (SRM o MRM) o en modo de barrido (barrido del ión producto) (143).

#### 3.7.1. Condiciones cromatográficas

El RP-HPLC usado para realizar las determinaciones del contenido de péptido encapsulado, consistió en un sistema Waters® 2695 Alliance (Milford, MA, USA) combinado con un detector diodo array (Waters 2996), equipado con un degasificador, una bomba cuaternaria, un muestreador automático y un inyector automático. Se utilizó el software de cromatografía Empower 3 (Milford, MA, EUA) para el control del equipo, la adquisición de datos y el análisis. Los análisis por HPLC se llevaron a cabo usando una columna Kromasil 100 C18 (250mm×4,6mm, 5µm, Teknokroma), mantenida a temperatura ambiente. La detección de P6-2 se realizó a longitud de onda de 280 nm y la de E1P47 a 265 nm, a un flujo de 1.0 ml/min y un volumen de inyección de 25 µl. Como fase móvil se utilizó ACN/TFA:H<sub>2</sub>O/TFA (95:5 v/v) y los análisis se realizaron en modo de gradiente.

#### 3.7.2. Descripción de la espectrometría de masas

La detección de las masas moleculares se llevó a cabo empleando un espectrómetro de masas QTrap 6500 (Absciex) acoplado a un sistema de HPLC Agilent 12690. Los análisis se llevaron a cabo usando una columna Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$ , C18 100Å 50 x 2,1 mm, como fase estacionaria. La columna se mantuvo a una temperatura de 60 °C. La fase móvil consistió de un sistema binario de solventes empleando agua acidificada con 0,1 % de ácido fórmico (Fase A) y 100 % de ACN (Fase B), manteniendo un flujo de 0,75 ml/min. Se realizó un gradiente de elución empezando con 98 % de Fase A y 2% de Fase B. La Fase B ascendió linealmente hasta el 98 % en 3 minutos, manteniéndose en este nivel durante 0,6 minutos. En el minuto 5, el gradiente retornó a las condiciones iniciales y la columna se re-equilibró por 3 minutos entre inyecciones. El espectrómetro de masas se calibró de modo que se obtuvieron especificaciones de acuerdo a la exactitud de masa y sensibilidad en todo el rango de masa. Previo a la validación y cuantificación se llevó a cabo un cuidadoso proceso de optimización para lograr la mejor detección de sensibilidad para los péptidos: estándares de P6-2 Y E1P47 y muestras, con el potencial de descomposición (DP) más adecuado y colisión energética (EC) para péptidos.

Todos los análisis utilizaron la fuente de pulverización de iones turbo en modo positivo con los siguientes ajustes: para la detección de ambos péptidos, el voltaje de ionización se estableció en 5500V, DP (potencial declinante) para E1P47 se estableció en 240,20 y para P6-2 en 171,23, el potencial de entrada (EP) 5,00, los datos se adquirieron en modo de monitorización de reacción múltiple. Se seleccionaron las energías de transición de 1184,3 / 789,7 (confirmación) y la energía de colisión aplicada se estableció en 62,60 y 31,80 para E1P47, respectivamente. Para P6-2 las energías de transición se establecieron en 1083,0/995,5 (confirmación) y la energía de colisión aplicada se estableció en 35,2 y 31,77 respectivamente. La señal de E1P47 se obtuvo a 5,1 min y la de P6-2 a 2,2 minutos.

#### 3.7.3. Preparación de las muestras

Los patrones secundarios de P6-2 y E1P47 se prepararon a partir de soluciones madre. Para la detección por HPLC UV-VIS de P6-2, la solución madre fue de 0,22 mg/ml y para la detección de E1P47 fue de 0,20 mg/ml. Los patrones secundarios de P6-2 se prepararon en la matriz compuesta por ACN, Agua Milli-Q, 1mM de DTT, (60:40 v/v) en concentraciones de 27,5; 45; 55; 90; 110; 180 y 220  $\mu\text{g/ml}$ . Los patrones secundarios de E1P47 se prepararon en la matriz (sobrenadante de las NPs blancas y ACN) a concentraciones de 12; 25; 50; 100; 150 and 200  $\mu\text{g/ml}$ .



Los patrones secundarios para detección por HPLC ESI-MS-MS de P6-2 fueron de 1, 3, 12, 25,50 and 100  $\mu\text{g/L}$  y para la detección de E1P47, fueron de 1.5, 3, 6, 12, 25,50 and 100  $\text{ng/L}$ .

La validación de los métodos se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Conferencia Internacional de Harmonización (ICH) (144).

#### 3.7.4. Linealidad y rango

La linealidad de las mediciones de P6-2 y E1P47 por HPLC UV-VIS, se evaluó utilizando cinco curvas de calibración en el rango entre 27,5 a 220  $\mu\text{g/ml}$  y entre el rango de 6 a 200  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

La linealidad de las mediciones de P6-2 por HPLC ESI-MS/MS, se evaluó usando cuatro curvas en el rango de 1,0 a 100  $\mu\text{g/l}$ . Para E1P47 se usaron seis curvas de calibración en el rango entre 1,5 a 100  $\text{ng/ml}$ .

Las curvas de calibración se validaron graficando los valores de las medidas obtenidas del instrumento frente a las correspondientes concentraciones de péptido. Con el ajuste de mínimos cuadrados se evaluaron estadísticamente los resultados de la linealidad mediante: una línea de regresión y la pendiente correspondiente, intercepción y coeficientes de regresión ( $r^2$ ). Se calculó la ecuación de regresión:  $y = bx + a$ , donde  $x$  es la concentración, ( $y$ ) área de los picos cromatográficos, ( $b$ ) es el valor de la pendiente en el intercepto. Además, la linealidad de P6-2 por HPLC UV-VIS se evaluó con la prueba de ANOVA, para HPLC ESI-MS/MS se realizó el test de Sperman  $r$ . La linealidad de E1P47 por HPLC UV-VIS y ESI-MS/MS se evaluó con la prueba Pearson. Estas pruebas comparan la relación de áreas de pico frente a la concentración de cada patrón. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ , el análisis de regresión y las determinaciones matemáticas fueron realizadas por el software Prism, V. 3,00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

#### 3.7.5. Precisión y exactitud

Para determinar la precisión y exactitud de P6-2, se utilizaron cinco curvas de calibración y se evaluaron siete niveles de concentración para cada curva. Para E1P47 se utilizaron cinco curvas de calibración y se evaluaron cinco niveles de concentración para cada curva.

La precisión expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones. La precisión se evaluó y se expresó como el coeficiente de variación medio (CV%).

La exactitud del método analítico expresa la proximidad entre los resultados experimentales obtenidos y los resultados reales de la muestra. La exactitud se obtuvo calculando la desviación porcentual (% EE) de las

concentraciones observadas (valor experimental) de la concentración nominal (valores teóricos) de cada patrón, y se indica como porcentaje de recuperación. El método se consideró preciso y exacto, si los intervalos de confianza están dentro de  $\pm 10\%$ .

#### 3.7.6. Sensibilidad

La sensibilidad del método se determinó con respecto al límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). LOD proporciona información sobre el nivel mínimo en el que el péptido se detectó de manera fiable mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de P6-2 y E1P47. LOQ, estableció el nivel mínimo en el cual los péptidos se cuantificaron con precisión y exactitud aceptables. Ambos parámetros, LOD y LOQ se determinaron sobre la base de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración usando la ecuación 6 y 7 respectivamente.

$$LOD = 3.3 \cdot \frac{DS}{m} \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{DS}{m} \quad (\text{Ecuación 7})$$

donde,  $DS$  es la desviación estándar y  $m$  e la pendiente

### 3.8. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LAS GC-PLGA-NPS

#### 3.8.1. Morfometría

El tamaño promedio ( $Z\text{-Ave}$ ) y la distribución poblacional ( $PI$ ) se determinaron mediante el método de espectroscopia de correlación fotónica que utiliza la dispersión dinámica de la luz a través de una suspensión (89). Con este método se pueden determinar los tamaños en un rango comprendido entre 0,6 nm a 4  $\mu\text{m}$  en un tiempo de análisis corto y sin previa determinación de la concentración. El fundamento del método se describe ampliamente en la introducción de esta tesis.

Para determinar el  $Z\text{-Ave}$  y  $PI$  de las formulaciones diseñadas para este trabajo, se realizaron diluciones de 1:10 en agua Milli-Q. Antes de las mediciones se pre-estableció el valor de la viscosidad absoluta en 0,890 mPas y el índice de refracción en 1,332 como una función de la temperatura y composición del solvente. Estos valores se seleccionaron en base a las propiedades del agua pura, que es el medio acuoso en el que se hicieron las diluciones. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y a 25 °C .

#### 3.8.2. Carga superficial

La determinación de la carga superficial o Zeta-potencial (ZP) de las formulaciones se utilizó, no sólo para evaluar el potencial electrostático en la doble capa eléctrica que rodea las NPs en suspensión, sino que además como un parámetro para evaluar indirectamente la agregación de las NPs.

Las mediciones del ZP de las formulaciones se llevaron a cabo en un Z-sizer Nano S y se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

➤ *Preparación de la celda.*

Se usaron celdas de policarbonato con electrodos chapados con oro (DTS1060). Las celdas se lavaron varias veces con agua Milli-Q, seguido de etanol y finalmente nuevamente con agua Milli-Q. La solución de lavado se paso varias veces por cada entrada de la celda (1ml cada vez) para enjuagar bien el electrodo. Después de los lavados, la celda se secó muy bien y se chequeo visualmente el buen estado de los electrodos (sin ralladuras ni opacidades).

➤ *Preparación de la muestra*

Se realizaron varias diluciones en agua Milli-Q, para determinar la concentración ideal de partículas en función de la dispersión de luz. Finalmente se seleccionó la dilución 1:20. Una vez hecha la dilución, con una jeringa se llenaron los habitáculos de la celda, verificando la ausencia de burbujas y que los electrodos estuvieran sumergidos- Las lecturas se hicieron por triplicado a 25 °C después de un periodo de calibración del equipo (2 minutos)

#### 3.8.3. Caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (MET) es una técnica de formación de imágenes en la que una muestra es bombardeada con haz de electrones provocando que una versión ampliada aparezca en una pantalla fluorescente o capa de película fotográfica (145).

Para llevar a cabo los análisis por MET de las NPs se procedió de la siguiente manera:

Sobre un trozo de parafina se puso 10 µl de la suspensión y 5 de gotas de 10 µl de acetato de uranilo. Posteriormente se colocó sobre la suspensión de NPs una rejilla de cobre de carbono y se dejó en contacto con la suspensión 3 minutos, estas rejillas tienen dos lados, un lado brillante y un lado opaco, el lado brillante se puso en contacto con la suspensión. Una vez transcurrido el tiempo, se separó la rejilla de la suspensión y se

limpiaron los excesos con papel filtro, posteriormente se puso la rejilla por el lado brillante en contacto con la primera gota del acetato de uranilo y se dejó por 3 minutos protegido de la luz, al terminar el tiempo se separó la rejilla de la gota de acetato de uranilo y se limpiaron los excesos con papel de filtro. De la misma manera se procedió con las demás gotas del colorante. Posteriormente la rejilla se puso en una cámara de vacío. Una vez la muestra estuvo seca y fijada, se introdujo la rejilla en el inyector de muestra del microscopio y se visualizó a través de una pantalla.

#### 3.8.4. Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE %)

La concentración de péptido encapsulado en las GC-PLGA-NPs se determinó mediante RP-HPLC (146). La cantidad de péptido libre se separó por centrifugación en una ultracentrífuga Beckman a 15000 rpm durante 15 minutos 10 °C. Posteriormente, se hizo una dilución de 1:10 del sobrenadante en una solución de ACN/H<sub>2</sub>O. Para la detección se utilizó un HPLC Waters Alliance 2695<sup>®</sup> acoplado a un detector diodo array Waters Alliance 2996<sup>®</sup> y una columna Kromasil 100 C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm, Teknokroma) a un flujo de 1 ml/min. La señal de E1P47 se detectó a una longitud de onda de 265 nm y la de P6-2 se detectó a 280 nm. Se usaron como eluyentes 95 % Agua (0,05 % TFA) fase A and 5 % ACN (0.05 % TFA) como fase B (95:5 v/v). La EE se determinó en base a la ecuación 8

$$E.E (\%) = \frac{\text{Cantidad total de péptido} - \text{Péptido libre}}{\text{Cantidad total de péptido}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 8})$$

#### 3.8.5. Estudios de difracción de rayos-X

Esta técnica descrita por Max von Laue (147), se basa en la interferencia óptica que se produce cuando una radiación de rayos X monocromáticos atraviesa una rejilla de espesor comparable a la longitud de onda de la radiación. La interacción de los rayos incidentes con la muestra producen una interferencia constructiva ( y un rayo difractado) cuando las condiciones satisfacen la ley de Bragg ( $n\lambda = 2d \sin \theta$ ), donde d es la distancia entre los planos interatómicos que producen la difracción. Esta ley relaciona la longitud de onda de la radiación electromagnética con el ángulo de difracción y la distancia entre celdas en una muestra cristalina. Estos rayos X difractados son detectados y contados. Mediante el escaneo de la muestra en un ángulo de 2θ, todas las posibles direcciones de difracción de la rejilla son alcanzadas debido a la orientación aleatoria del material en polvo. Los rayos X tienen longitudes de onda de Angstroms, del mismo orden que las distancias interatómicas de los componentes de las redes cristalinas.

Para realizar los estudios de difracción de rayos X, una suspensión de NPs fue centrifugada, el sobrenadante descartado y el pellet se mantuvo en un desecador en condiciones de vacío. Posteriormente la muestra intercalada entre películas de poliestireno de 3,6  $\mu\text{m}$  de grosor, y se expuso a una radiación Cu Ka (45 kV, 40 mA,  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) en un rango de  $2\theta/\theta$  desde 1 a  $60^\circ$ ,  $2\theta$  con un tamaño de paso de  $0,026^\circ 2\theta$ , en un tiempo de medición de 196 segundos por paso.

Para realizar el ensayo se utilizó un difractómetro PANalytical X'Pert PRO MPD  $q/q$  para polvo de 240 mm de radio, en una configuración de haz convergente con un espejo focalizante y una geometría de transmisión.

#### 3.8.6. Estudios de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica se basa en la medición de las longitudes de onda y la intensidad de absorción de la luz infrarroja de una muestra (148). La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se utilizó para estudiar la interacción entre los componentes de las NPs E1P47 (PLGA, PVA, Péptido y GC). Para ello, las muestras sólidas se depositaron directamente en un diamante. Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro IR Nicolet 360 FTIR con accesorio smart iTR, en modo transmisión, con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$  y 64 scans.

#### 3.8.7. Estudios de estabilidad a corto plazo

Para predecir la estabilidad física a corto plazo de las formulaciones desarrolladas se utilizó el TurbiScan<sup>®</sup> Lab (Formulation, L'Union, Francia), instrumento óptico basado en el análisis de dispersión múltiple de la luz. Este instrumento puede detectar fenómenos de desestabilización de emulsiones y dispersiones concentradas mucho antes que el ojo del operador.

Los estudios se realizaron colocando la muestra en una celda cilíndrica de vidrio, que se escaneó completamente por un cabezal de lectura. El escaneo se consiguió con una fuente de luz infrarroja cercana pulsada ( $\lambda = 880 \text{ nm}$ ) y dos detectores ópticos sincrónicos. El detector de transmisión (T) recibe la luz transmitida por la muestra ( $0^\circ$  de la radiación incidente) y el detector de retrodispersión (BS) recibe la luz retrodispersada por la muestra ( $135^\circ$  de la radiación incidente) (149). Como las formulaciones son de aspecto lechoso y opaco se utilizaron sólo los perfiles de la luz retrodispersada o "*Back Scattering*" (BS) para evaluar la estabilidad fisicoquímica de las NPs. El cabezal de lectura recogió los datos de BS cada  $40 \mu\text{m}$  durante 24 horas. Los datos obtenidos de la lectura se representan mediante el perfil de luz retrodispersada, curva que muestra el porcentaje de BS en función de la altura de la muestra en milímetros. Las adquisiciones se repitieron obteniendo una superposición de muestras como huellas dactilares, lo que demuestra estabilidad o inestabilidad de la muestra.

#### 3.8.8. Estudios de liberación *in vitro*

La liberación de un fármaco desde un sistema nanoparticular así como la degradación del polímero durante el proceso de liberación son dos importantes factores que definen el éxito de una formulación. El perfil de liberación de un fármaco depende de: (i) la solubilidad, (ii) la adsorción o desorción del fármaco a la superficie de la nanopartícula, (iii) la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica, (iv) la degradación/erosión de la matriz polimérica y (v) la combinación de los procesos de degradación del polímero y difusión del fármaco a través de la matriz.

En el caso de las nanoesferas, cuando el fármaco se distribuye uniformemente en la matriz polimérica, la liberación ocurre por difusión o erosión de la matriz bajo condiciones “*sink*”. Si la difusión del fármaco es más rápida que la erosión de la matriz, se puede decir que la liberación es controlada por un proceso de difusión. Cuando al inicio del estudio se produce una liberación rápida, se atribuye a que parte del fármaco se ha adsorbido en la superficie de la partícula.

Los métodos mas usados en los estudios de liberación *in vitro* son: (i) difusión de lado a lado usando membranas biológicas o células artificiales, (ii) difusión directa a través de bolsas de diálisis, (iii) difusión indirecta a través de bolsas de diálisis, (iv) agitación seguida por centrifugación, (v) por ultrafiltración.

Los ensayos de liberación se llevan a cabo siempre bajo condiciones controladas de agitación y centrifugado. Debido a las dificultades técnicas relacionadas con la separación de la NPs, la diálisis es el método preferente (70).

Este método fue descrito por Levy et al (150), se basa en la dispersión directa de la suspensión nanoparticular en un medio de liberación, en el que se cumplen las condiciones Sink.

En este proceso el sistema nanoparticular se encuentra separado del medio de liberación por una membrana de diálisis. El fármaco liberado se difundirá del interior del saco de diálisis o a través de la membrana al medio en favor del gradiente estableciéndose un rápido equilibrio.

Los estudios de liberación de este trabajo se llevaron a cabo por el método de diálisis usando células de Franz de vidrio ámbar (FDC-400) de 18 mm de diámetro. El montaje de la muestra se llevo a cabo de la misma forma para los dos estudios. Se usaron membranas de diálisis (Iberlabo, España) ( membranas de celulosa mW de corte 12000-14000 Da). Las membranas se hidrataron durante 24 horas en una solución de metanol /agua (95:5) y

posteriormente se lavaron con PBS pH 7,4. Las membranas hidratadas se pusieron entre el compartimento donador y el compartimento receptor de las células de Franz.

En los estudios de liberación *in vitro* de E1P47 se empleó como medio receptor PBS 1M pH 7,4 y para P6-2 se utilizó una solución de (PBS pH 7,4/DTT 10mM). En ambos casos, el compartimento receptor se llenó con 5 ml del correspondiente medio receptor, estableciéndose el área de difusión en 0,62 cm<sup>2</sup>.

Los ensayos se desarrollaron bajo condiciones controladas de temperatura (37 °C) y las condiciones del experimento se mantuvieron durante 24 horas para E1P47 y 10 horas para P6-2. En intervalos de tiempo específicos se tomaron 100 µl del medio receptor y se sustituyeron inmediatamente con una cantidad igual de medio fresco. La determinación de la cantidad de péptido en el medio receptor se realizaron mediante HPLC ESI-MS/MS.

#### 3.8.9. Análisis de aminoácidos

Este método se utiliza para determinar la cantidad de aminoácidos de muestras que contienen péptidos, proteínas ó aminoácidos. Este método que se describió por primera vez en 1950 por Moore et al (151), involucra 3 pasos importantes: (i) purificación de la muestra, (ii) hidrólisis y (iii) derivatización. En la fase de purificación se eliminan las sales de buffer, urea o detergentes que puedan interferir con la hidrólisis y derivatización. En la literatura se describen varios métodos de purificación, entre los más relevantes están RP-HPLC, *Zip-Tis* (son puntas de pipeta que contienen una pequeña capa de sílica como las de las columnas de cromatografía), electroforesis y en el caso de muestras biológicas se utiliza la precipitación de proteínas interferentes con TFA, acetona o metanol. En la fase de hidrólisis la muestra se disuelve en una solución de ácido clorhídrico 6 M y se somete a 110 °C bajo condiciones de vacío, por 16-24 horas, con este procedimiento se asegura la ruptura de los enlaces peptídicos. En la última fase, la derivatización de los aminoácidos libres se puede hacer por diferentes métodos, siendo el más utilizado la derivatización AQC de pre-columna por tener una mayor sensibilidad. El A-carbamato de N-hidroxisuccinimilo (AQC) reacciona con aminoácidos primarios y secundarios para formar derivados de urea (AQC-aminoácidos) estables, asimétricos, que son altamente fluorescentes y fácilmente susceptibles de análisis por RP-HPLC.

En este estudio, se cuantificó la cantidad atrapada de P6-2 en las GC-PLGA-NPs mediante este método siguiendo las pautas descritas por Cohen et al (152). Para la determinación del contenido de aminoácidos en la suspensión nanoparticular se tomaron 30 µl de ácido 1- amino-n-butírico (2,5 mM) y 1 ml of HCl 12 M se adicionaron a 1 ml de la muestra (NPsP6-2 suspensión que contenía 166 µg/ml de péptido). La hidrólisis se

llevó a cabo a 110 °C durante 16 horas. Posteriormente, se adicionaron 10 ml de un patrón interno y luego se diluyó con agua hasta llegar a los 250 ml. Seguidamente, la solución se pasó a través de un filtro de 0,20 µm. Después, el ácido fue evaporado y la muestra seca se disolvió en agua Milli-Q.

Para la derivatización, se adicionaron 70 µl de buffer borato a 10 µl de la muestra filtrada e hidrolizada y a 10 µl del patrón. Después, 20 µl del reactivo AccQ.Fluor previamente reconstituido (3 mg/ml en ACN) se adicionaron a la muestra y el patrón. Posteriormente, los viales que contenían la muestra y el patrón se colocaron en un bloque de calentamiento a 50°C, durante 10 minutos.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Waters AccQ.Tag amino acid analysis Nova-Pak™ (3.9 mm × 150 mm, 4 µm) con un relleno de Nova-Pak™ C 18, un caudal de 1.0 ml/min y un volumen de inyección de 20 µl. La fase móvil A consistió de AccQ.Tag (100 ml AccQ.Tag A concentrado + 1 L de agua Milli-Q) y se usaron como fase móvil B y C, ACN y agua Milli-Q respectivamente.

La reacción de los aminoácidos con el 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato se detectaron a una longitud de onda de 254 nm. Los análisis cuantitativos y cualitativos se basaron en los tiempos de retención y el método del patrón interno, respectivamente.

#### 3.9. ENSAYOS DE CAPTACIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El selector de células activado por fluorescencia (FACS) fue inventado por Bonner et al, a finales de los años 60 y a principios de los años 70 Beckton Dickinson introdujo comercialmente las primeras máquinas (153). La citometría de flujo emplea una metodología descriptiva y analítica para medir parámetros celulares de manera individual, célula a célula, pero con capacidad para obtenerlos de manera rápida (muchas células a la vez).

La citometría de flujo (FCM) utiliza los principios de la dispersión de la luz, la excitación de la luz y la emisión de moléculas fluorocromas para generar datos multiparámetros específicos de partículas y células en el rango de tamaño de 1-40 µm de diámetro. Esta técnica se basa en medir características de cada elemento particulado en suspensión (principalmente celular), cuando se le incide un rayo de luz.

Cuando la luz se dispersa hacia adelante, normalmente hasta 20° desviado del eje del rayo láser, se denomina luz de dispersión frontal (*forward scatter*, FS). La intensidad del FS describe el tamaño de la célula y de la partícula. La luz que se dispersa en un ángulo de 90° se le denomina luz de dispersión lateral (*side-scatter*, SS). La intensidad SS proporciona información sobre el contenido granular dentro de una célula y una partícula. Ambos FS y SS son únicos para cada célula y partícula, y una combinación de los dos se utiliza para diferenciar



diferentes tipos de células en una muestra heterogénea. En la Figura 10, se muestra el gráfico de puntos de un patrón típico de supervivencia / muerte celular (apoptosis).

Se sabe que el tamaño de las células en estado apoptótico disminuye (encogimiento de las células) y que presentan mayor granularidad (folículos esféricos nucleares (cuerpo apoptótico) Por lo tanto, en las células apoptóticas, la intensidad del FS disminuye y la intensidad de SS aumenta (154).

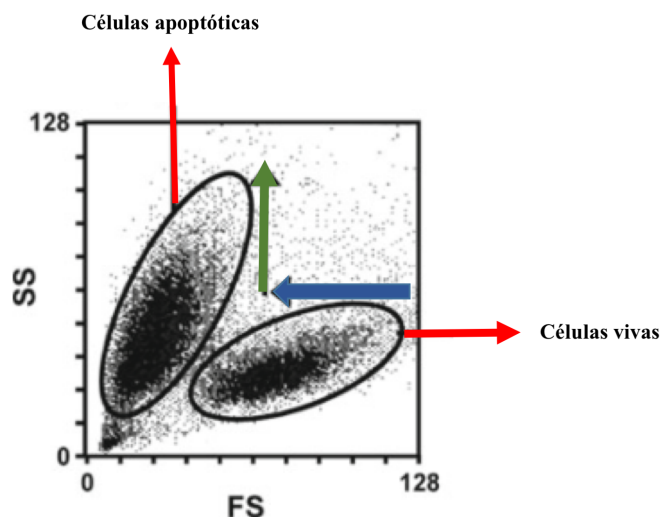


Figura 10. Análisis por citometría de flujo de células vivas y células apoptóticas. (Adaptado de Ibuki et al.) (150)

Mediante el uso de los parámetros FS y SS se desarrolló un método para determinar la capacidad de captación celular de nanopartículas. Cuando las partículas son captadas por las células, la intensidad SS aumenta y la intensidad del FS no cambia. Esta evaluación del potencial de captación de NPs usando SS en FCM es una herramienta útil en el cribado inicial de la nanotoxicidad sin necesidad de realizar procedimientos de tinción o marcación celular (155).

Para esta tesis, se realizaron evaluaciones de la captación de las NPsE1P47-FAM por células endoteliales HeLa. Adicionalmente mediante un método sencillo se discriminó el porcentaje de las NPsE1P47-FAM adheridas a las células de las NPs que fueron captadas por las células.

Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron células HeLa-env (donadas por el Dr. Julià Blanco de la Fundación IRSICaixa), que expresa las proteínas de la envoltura del VIH-1 (gp41 y gp120) e integra en su genoma el promotor LTR (Long Terminal Repeats).

Las células se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de  $2 \cdot 10^5$  en DMEM con 10% de FBS, 100  $\mu\text{g/ml}$  de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina. Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Después, el medio se retiró de las monocapas y las células se lavaron con PBS. Posteriormente, se adicionó a cada pozo 1 ml de DMEM que contenía NPs ó NPsE1P47-FAM a una concentración de 36  $\mu\text{M}$  y se incubaron durante 1, 2, 4, 6 y 24 horas a 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$ .

Al finalizar los tiempos de incubación, las células se desprendieron de los discos de cultivo y se lavaron varias veces con PBS para remover las NPs que no fueron captadas. Inmediatamente, se prepararon las suspensiones celulares para realizar la citometría de flujo adicionando a las células 100  $\mu\text{l}$  de Tripsina/EDTA-PBS. Los datos se adquirieron usando el software InCite™ en el cual se registraron los eventos (10.000) dentro de las regiones asignadas a las células HeLa-env.

Para discriminar entre NPsE1P47-FAM unidos de internalizados, se utilizó un ensayo con azul de tripano para apagar la señal de 5 (6)-FAM. El apagado de la señal de 5 (6)-FAM se produce porque el azul de tripano absorbe la luz emitida por NPsE1P47-FAM después de la excitación. Sin embargo, la señal 5(6)-FAM de las NPsE1P47-FAM que se encuentran internalizadas no se apaga, ya que el colorante no puede pasar por la membrana plasmática. Por lo tanto, la fluorescencia que queda es la que resulta de las NPsE1P47-FAM internalizadas, ya que el azul de tripano sólo extingue la fluorescencia de las NPsE1P47-FAM que están adheridas extracelularmente (156).

#### 3.10. ESTUDIOS *EX VIVO* E *IN VIVO*

Los ensayos *ex vivo* e *in vivo* se realizaron con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona, con arreglo a las regulaciones actuales para el uso y la manipulación de animales de experimentación (Decreto 214/97, Generalitat de Catalunya).

Para la realización de los estudio *ex vivo* se usaron las celdas de Franz. Este es un sistema de difusión compuesto de una cámara donadora y una cámara receptora separadas ya sea por una membrana sintética o biológica. Con este sistema se puede evaluar la difusión de moléculas biológicamente activas desde un compartimento a otro. En el compartimento donador se deposita la solución de estudio que contiene el agente activo y el compartimento receptor se llana del medio al cual el agente activo se difunde.

La realización de ensayos de permeacion en celdas de Franz debe cumplir con el control de parámetros como la temperatura, velocidad de agitación, conservación de la membrana y la estabilidad del medio receptor (157).

#### 3.10.1. Estudios *ex vivo* de penetración y permeación de NPsP6-2-FAM

Los ensayos de penetración *ex vivo* se realizaron con mucosas vaginales de cerdo obtenidas de la Unidad de experimentación de Bellvitge (Universidad de Barcelona). La mucosas se criopreservaron y se mantuvieron a -80 °C de acuerdo con el protocolo descrito por Amores et al (158).

Para evaluar tanto la tasa de penetración como la permeación de NPsP6-2 se cortaron discos de mucosa vaginales de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se pusieron entre el compartimento donador y el receptor de las celdas de Franz y sujetando ambos compartimentos con una abrazadera. El área de difusión disponible fue de 0,62 cm<sup>2</sup>.

Al compartimento donador se adicionó 1 ml de la suspensión NPsP6-2-FAM o de NPsP6-2 y el compartimento receptor se lleno con 5 ml de una mezcla del medio receptor (PBS 10mM + DTT 10mM) y Transcutol<sup>®</sup> (50:50) (v/v), para asegurar la solubilidad del péptido. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado con agitación constante 300 rpm a 37°C ± 1°C. Los ensayos se llevaron a cabo por 5 horas.

Las NPsP6-2 se usaron para evaluar la permeación. A intervalos de tiempo determinados (cada hora) se tomaron muestras de 300 µl del medio receptor e inmediatamente se remplazaron con medio fresco. Las cantidades de P6-2 permeado fueron cuantificadas usando el mismo protocolo descrito para la cuantificación de péptido en los estudios de liberación *in vitro*. El coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ , cm·s<sup>-1</sup>) a través de la mucosa fue determinado usando la siguiente ecuación:

$$P_{app} = \left( \frac{\Delta Q}{\Delta t} \right) \cdot \frac{1}{A \cdot C_0 \cdot 60} \quad (\text{Ecuación 9})$$

donde: Q es la cantidad total de péptido permeado a tiempo t,  $\Delta Q/\Delta t$  es la pendiente de la parte lineal de la recta obtenida de la regresión lineal para la cantidad de péptido permeado a tiempo t, A es el área expuesta y C0 es la concentración inicial de péptido.

Las comparaciones estadísticas entre las muestras se realizaron usando un test ANOVA de una vía y una prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

También se determinó la cantidad retenida de P6-2 de los ensayos de permeación. Para esto, al final del experimento se removieron las mucosas y se lavaron con PBS. Posteriormente, las áreas que estuvieron en contacto con las NPs se cortaron y se pesaron. La cantidad de P6-2 retenida en las mucosas se extrajo con una mezcla del medio receptor y ACN (80:20) con sonicación en un baño de ultrasonidos en frío durante 20

minutos. La cantidad de P6-2 se cuantificó por LC ES-MS utilizando el protocolo descrito en los estudios de liberación y se expresó en  $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{cm}^2$  de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Q_r = \left(\frac{Ex_x}{Px}\right) / 0.62 \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde:  $Q_r$  es la cantidad de P6-2 retenida después del ensayo de permeación a través de un área de  $0.62 \text{ cm}^2$ .  $Ex_x$  es la cantidad de P6-2 extraída.  $Px$  es el peso de cada mucosa.

Para evaluar la tasa de penetración, los tejidos vaginales fueron removidos al finalizar el tiempo de los ensayos. Posteriormente fueron inmersos en paraformaldehído 4% en PBS pH 7.4 (PFA) durante 24 horas. Al siguiente día, las mucosas fueron sumergidas en una solución de sacarosa al 30 % durante 5 horas y, posteriormente sumergidas con OCT Tissue-Tek<sup>®</sup> para construir los bloques. Finalmente los bloques fueron sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Una vez contruidos los bloques, se hicieron cortes perpendiculares a la muestra de  $25 \mu\text{m}$  usando un criostato (Leica CM1510, Leica Microsystems) a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Los cortes se dispusieron en láminas portaobjetos y se sumergieron durante 1 hora en PBS pH 7,4 para eliminar los restos de OCT. Después se tiñeron los núcleos celulares con una solución de DRAQ5 en PBS (1:2000).

Los cortes se analizaron con un microscopio confocal de barrido láser (TCS-SL-Leica Microsystems), usando una  $\lambda_{\text{exc}}$ : 488 nm para la visualización de las NPsP6-2-FAM. Las imágenes adquiridas se procesaron mediante el software IMAGE-J.

#### **3.10.2. Estudios *in vivo* de penetración y toxicidad de las NPsP6-2-FAM**

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron cuatro cerdos hembra de 25 kg para cada uno de los ensayos, de acuerdo con los principios de Reducción, Refinamiento y Reemplazo animal (3R) (159). Antes de los experimentos los animales se anestesiaron. Para depositar las NPsP6-2-FAM en el conducto vaginal, 1 ml de la suspensión (0,3 mg/ml) fue instilada dentro del orificio vaginal a tres animales con ayuda de una pipeta plástica de Pasteur. El cuarto animal sirvió de control y se le instiló agua en lugar de la suspensión. Después de 5 horas, los animales fueron sacrificados usando para ello una sobredosis de anestesia, inmediatamente, mediante escisión quirúrgica, se extrajeron las vaginas de los cerdos. Una vez extraídas las vaginas, se realizaron cortes para evaluar tanto la toxicidad como la penetración.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Para evaluar la penetración se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente. Para evaluar la toxicidad, se realizó una técnica histológica convencional, este método es el más utilizado para el tratamiento de tejidos el cual consiste en la transformación de una muestra en delgados cortes teñidos que faciliten su observación a través de un microscopio de luz.

Para realizar los estudios histológicos las mucosas se cortaron en piezas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, posteriormente fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Se llevó a cabo el protocolo descrito en la Tabla 9.

Para la evaluación de los resultados se diseñó un estudio ciego en el cual participaron dos especialistas en morfología. Se consideraron 3 características: (i) La calidad de la tinción nuclear, (ii) la calidad de la tinción del citoplasma, (iii) calidad general del corte histológico considerando rasgos específicos como la presencia de fisuras, fragilidad tisular y homogeneidad de la tinción. Para éstos parámetros se asignaron valores en una escala del 1-10, donde 1-2 corresponden a muestras de muy mala calidad, 3-4 mala calidad, 5-6 calidad regular, 7-8 buena calidad, 9-10 excelente calidad. La evaluación de la toxicidad se llevó a cabo solo con aquellas que se categorizaron como muestras de excelente calidad. La condición morfológica de la mucosa vaginal fue examinada en 20 láminas diferentes, usando un microscopio de luz transmitida (microscopía de fluorescencia Epi, NIKON).

Tabla 9. Protocolo de procesamiento de tejidos por histología convencional

Tiempo	Tipo de Fijador/Compuesto
2 días	PBS pH 7.4
1 día	Sacarosa al 15%
3 días	Etanol al 50%
1 semana	Etanol al 70 %
3 horas	Etanol absoluto
1 hora	Xilol
12 horas	Parafina I
3 horas	Parafina II
Confección del bloque	
Cortes con micrótopo (4µm)	
Tinción hematoxilina /Eosina	

#### 3.10.3 Estudios de permeación *ex vivo* e *in vivo* de NPsE1P47

Para realizar los estudios de permeación *ex vivo* de NPs E1P47, se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado 3.10.1 cambiando el medio receptor por PBS 1M y Transcutol P® 80:20 (v/v). El estudio se hizo durante 6 horas bajo las condiciones ya descritas.

Para realizar los estudios de permeación *in vivo* se usaron 4 cerdos hembra de 25 kg y se siguió el procedimiento ya descrito en la sección 3.10.2. La formulación de NPsE1P47 se instiló en el tracto vaginal de dos animales, al tercer animal se le instiló el péptido E1P47 no formulado y el cuarto animal fue usado como control. Al animal control se le instiló el vehículo en el cual se disolvió el péptido no formulado (Solución de DMSO al 0,1%). Después de 4 horas, los animales fueron sacrificados y las vaginas se extrajeron mediante procedimiento quirúrgico para asegurar la viabilidad de las mismas. Cada vagina fue identificada de acuerdo con el tipo de formulación aplicada. Posteriormente, las vaginas se cortaron en trozos de igual tamaño y se pesaron. Posteriormente se procedió a la extracción y determinación de la cantidad de E1P47 formulado y no formulado retenido en la mucosa.

Para evaluar con mayor exactitud la cantidad de péptido retenido, se determinó el porcentaje de recuperación (R). Para esto, un fragmento de mucosa no tratada se pesó e incubó durante 6 horas a 37 °C con una solución

que contenía 100 µg/ml of E1P47. Al finalizar el tiempo de incubación, la solución restante fue reservada para determinar la cantidad de péptido. El péptido que se difundió dentro de la mucosa fue extraído usando una mezcla de Transcutol/PBS 1M, y la cantidad de péptido se determinó mediante HPLC MS-MS, método validado descrito en el apartado de 3.7. El porcentaje de recuperación fue calculado usando la siguiente ecuación.

$$R = \frac{\frac{Q_p}{m_2}}{\frac{c_1 - c_2}{m_1}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Donde  $Q_p$  es la cantidad de péptido extraído de la mucosa,  $m_2$  y  $m_1$  son los pesos de la mucosa al final y al inicio del experimento, respectivamente;  $C_1$  y  $C_2$  son las concentración inicial de péptido (100 µg/ml) y final, respectivamente. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los datos se presentaron como (media ± SD.). Para la comparación de varios grupos, se realizó la prueba de Anova para analizar las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos, seguido de un análisis Kruskal-Wallis. Los estudios histológicos y confocal adquiridos mediante el uso de un programa específico (Image J). El programa SPSS para Windows IBM21 se utilizó para el procesamiento de todos los resultados.





## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### 4.1. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS P6-2 Y E1P47

En estudios realizados por nuestro grupo se ha demostrado que péptidos derivados de las glicoproteínas de fusión E1 y E2 del GBV-C, inhiben la entrada y fusión del VIH-1 a las células susceptibles de ser infectadas (66,160–162). De los estudios realizados, dos péptidos destacan por su potente actividad inhibitoria. Uno de ellos, el péptido P6-2 derivado de la proteína E2 ha demostrado que inhibe la fusión de varios subtipos del VIH-1, principalmente aquellos con tropismo X4. P6-2 es una secuencia peptídica derivada del extremo N-terminal, específicamente abarca la región que va desde el aa 45 al aa 64 (Tabla 10). P6-2 fue descrito inicialmente por el grupo de Eissmann (53), y se ha utilizado en el desarrollo de algunos trabajos de nuestro grupo (163). Una de las principales características de P6-2 es la presencia de tres residuos de cisteína en su estructura, estratégicamente ubicados y que pueden estar relacionados con la formación de dímeros intermoleculares, de oligómeros o en la formación de péptidos cíclicos. Además, los autores sugieren que estas transformaciones estructurales, pueden ser un pre-requisito para los mecanismos de supresión del VIH mediados por P6-2. El mecanismo de inhibición no es completamente conocido, pero de acuerdo con los hallazgos de los autores, se sugiere que P6-2 interactúa con la región del bucle disulfuro en las proteínas gp41 y bloquea la fusión del VIH a las células.

La otra secuencia peptídica, de relevante importancia por su potente actividad anti-VIH, fue recientemente descrita por nuestro grupo y se trata de un derivado de la proteína E1 del GBV-C (67). Este péptido que representa la región que va desde el aa 139 al aa 156 de la proteína E1, ha demostrado una actividad inhibitoria del orden  $\mu\text{M}$ , comparable con la del péptido VIR576. Los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición sugieren que E1P47 interactúa con un dominio altamente conservado en el extremo N-terminal de la proteína gp41, conocido como péptido de fusión (Tabla 10).

Tabla 10. Estructura primaria de las secuencias peptídicas derivadas de la proteína E1 y E2 del GBV-C

<b>Péptido derivado del GBV-C</b>	<b>Secuencia</b>
P6-2	LCDCPNGPWVWVPAFCQAVG
E1P47	WILEYLWKVPFDFWRGVI

Las dos secuencias peptídicas descritas, se usaron para la presente tesis doctoral, para incorporarlos en GC-PLGA-NPs y evaluar su perfil de liberación y de difusión a través de mucosas vaginales. Para realizar este trabajo, los dos péptidos fueron sintetizados utilizando el método de *SPPS*, estrategia Fmoc. El grupo Fmoc tiene como principal ventaja, que es fácilmente eliminado en presencia de bases fuertes como la piperidina, sin afectar la unión de la secuencia a la resina. La remoción del grupo Fmoc es una reacción típica de ácido-base en la cual la piperidina actúa como base sobre el protón más lábil del grupo, liberando de manera espontánea  $\text{CO}_2$  y provocando la formación de un aducto, quedando el grupo amino libre para la formación del enlace peptídico.

La síntesis, se realiza desde el extremo C-terminal al N-Terminal, de tal manera que el primer aminoácido acoplado corresponde al último aminoácido de la secuencia. Posterior a la desprotección del grupo amino, se realiza el acoplamiento del siguiente aminoácido mediante la formación de un enlace peptídico, que se produce como resultado del ataque nucleofílico de la amina al éster activo, formado tras la reacción entre el grupo carboxilo y los activadores HATU y DIEA.

La derivatización de los péptidos se llevo a cabo con 5(6) carboxifluoresceína como se describió en los materiales y métodos. A continuación, los péptidos se desanclaron de la resina y los grupos protectores fueron removidos en la misma reacción, liberándose al medio como carbocationes que finalmente son atrapados por “*scavengers*” como el triisopropilsilano (TIS). El resultado obtenido fueron dos péptidos lineales y sus respectivas secuencias fluorescentemente derivatizadas.

Cada péptido fue caracterizado utilizando HPLC a escala analítica como se describió en materiales y métodos. Se realizaron análisis de UPLC, ES-MS y MALDI-TOF para determinar de forma inequívoca las secuencias peptídicas sintetizadas.

La purificación de los péptidos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC a escala semipreparativa. Los crudos peptídicos fueron eluidos en un gradiente de 80 % a 20% ACN- $\text{H}_2\text{O}$  en 25 minutos a un flujo de 3 ml/min. Los péptidos purificados y caracterizados por ES-MS se muestran en las Figuras 11 (P6-2) y 12 (E1P47). Como se puede observar, la separación cromatográfica fue efectiva alcanzando una pureza mayor del 95 %.

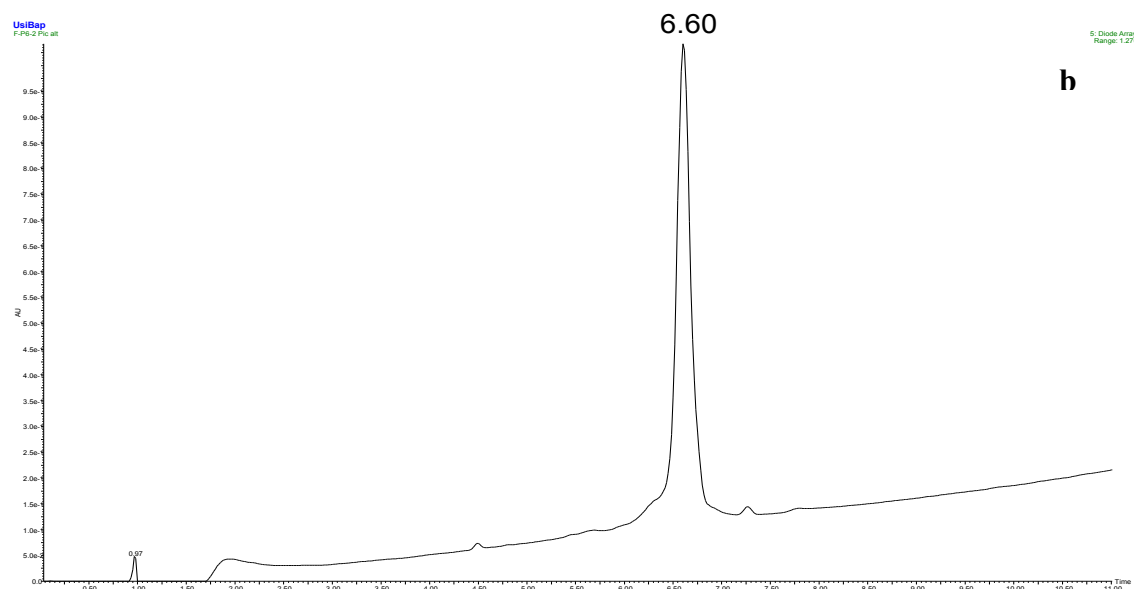
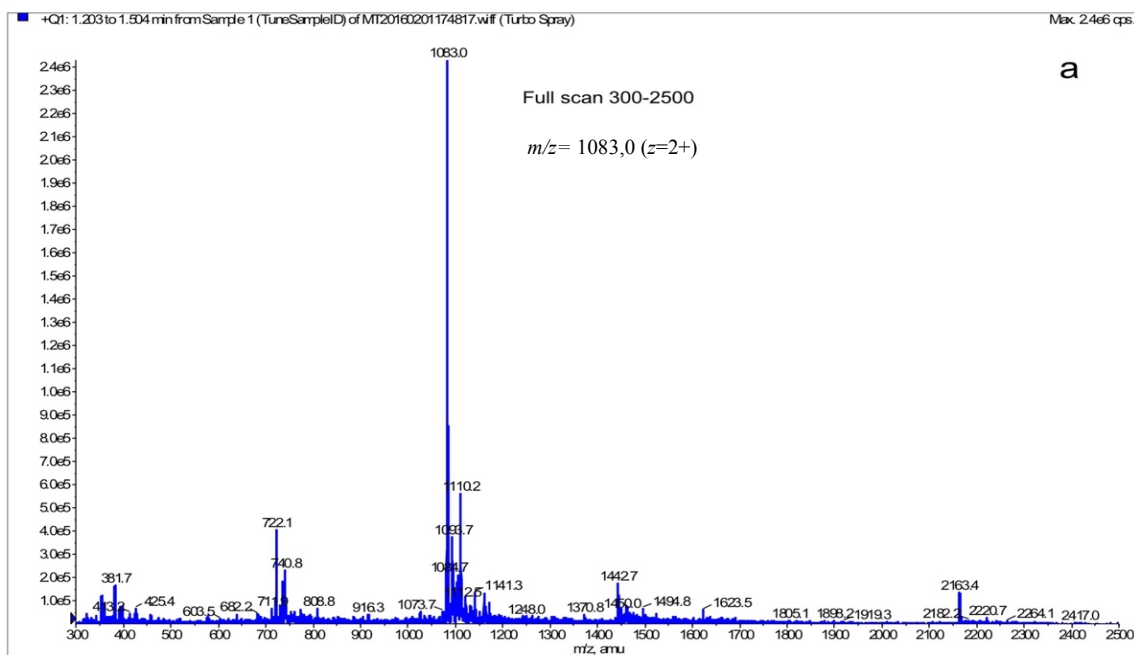


Figura 11 (a) Espectro de masas de masas del péptido purificado, masa calculada: 2166 Da. (b) Espectro del HPLC analítico de P6-2

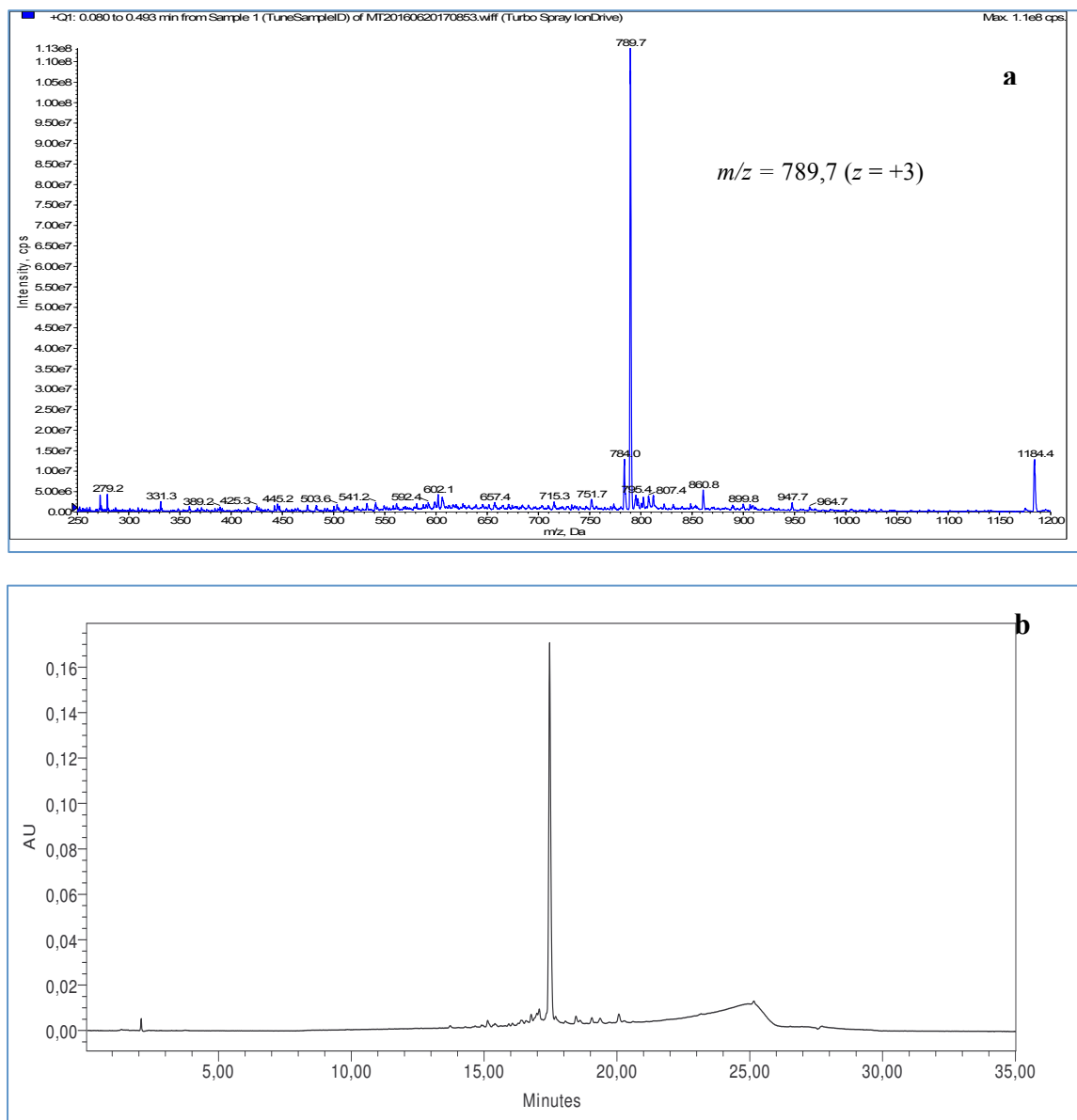


Figura 12. (a) Espectro de masas de E1P47 purificado, masa calculada: 2369 Da (b) Espectro del HPLC analítico de E1P47

Teniendo en cuenta, la relación masa/carga ( $m/z$ ) obtenida de la ionización de los péptidos P6-2 y E1P47 se calculó el  $M_w$  experimental, el cual coincidió con el  $M_w$  teórico calculado a partir de la herramienta informática ExPASy (Tabla 11). De igual manera, el  $M_w$  de los péptidos derivatizados con 5(6)-FAM, se obtuvieron a partir de los fragmentos de los iones de P6-2 y E1P47 y el  $M_w$  de la sonda. Los  $M_w$  teóricos y experimentales se muestran en la Tabla 11 y el espectro de ES-MS de P6-2-FAM y de MALDI-TOF de E1P47-FAM se pueden observar en las Figuras 13 y 14 respectivamente.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11. Caracterización de las secuencias peptídicas sintetizadas y sus respectivos derivatizados

Secuencia Peptídica	$[M+H]^+$ Teór <sup>a</sup>	$[M+H]^+$ Exp <sup>b</sup>
<b>P6-2</b>	2162,53	2166,00
<b>E1P47</b>	2367,82	2369,10
<b>P6-2-FAM</b>	2523,32	2522,06
<b>E1P47-FAM</b>	2726,14	2725,31

<sup>a</sup> Mw calculado a partir de la herramienta informática ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>)

<sup>b</sup> Mw calculado obtenido de ES-MS y MALDI -TOF

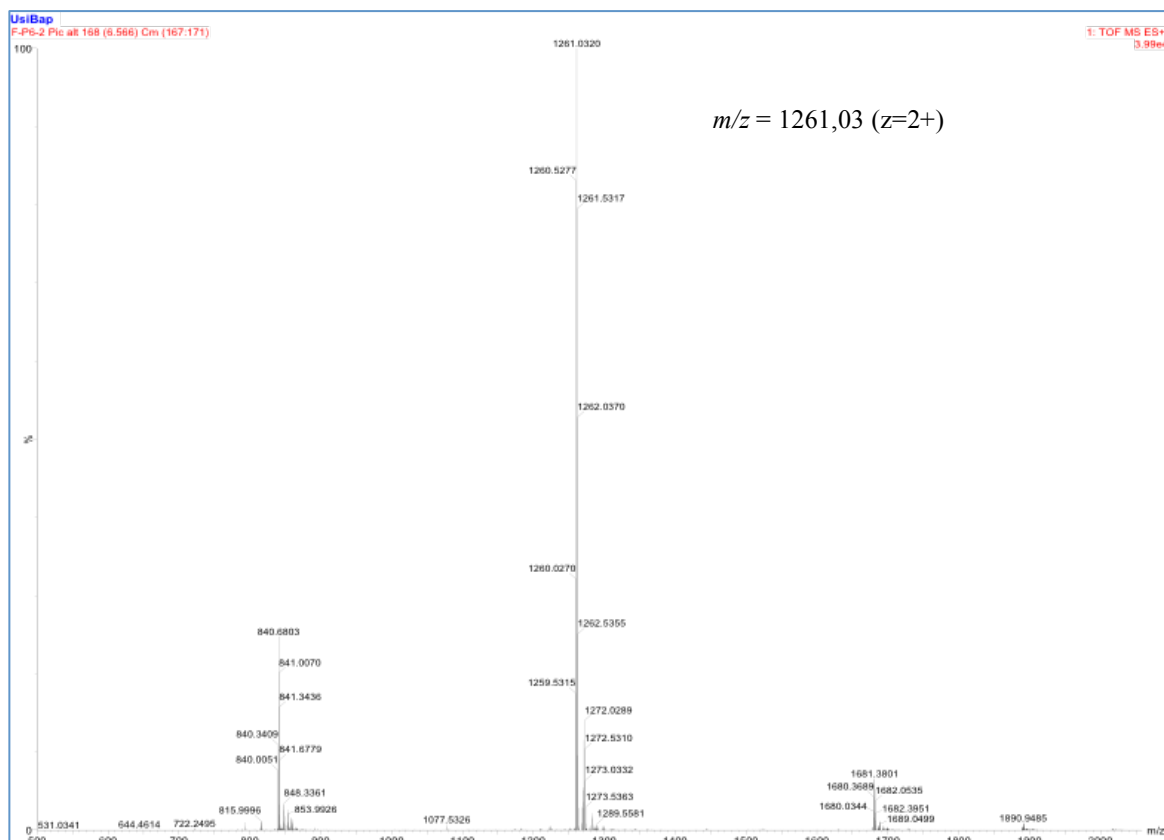


Figura 13. Espectro de masas de P6-2-FAM, masa calculada 2522.06 Da

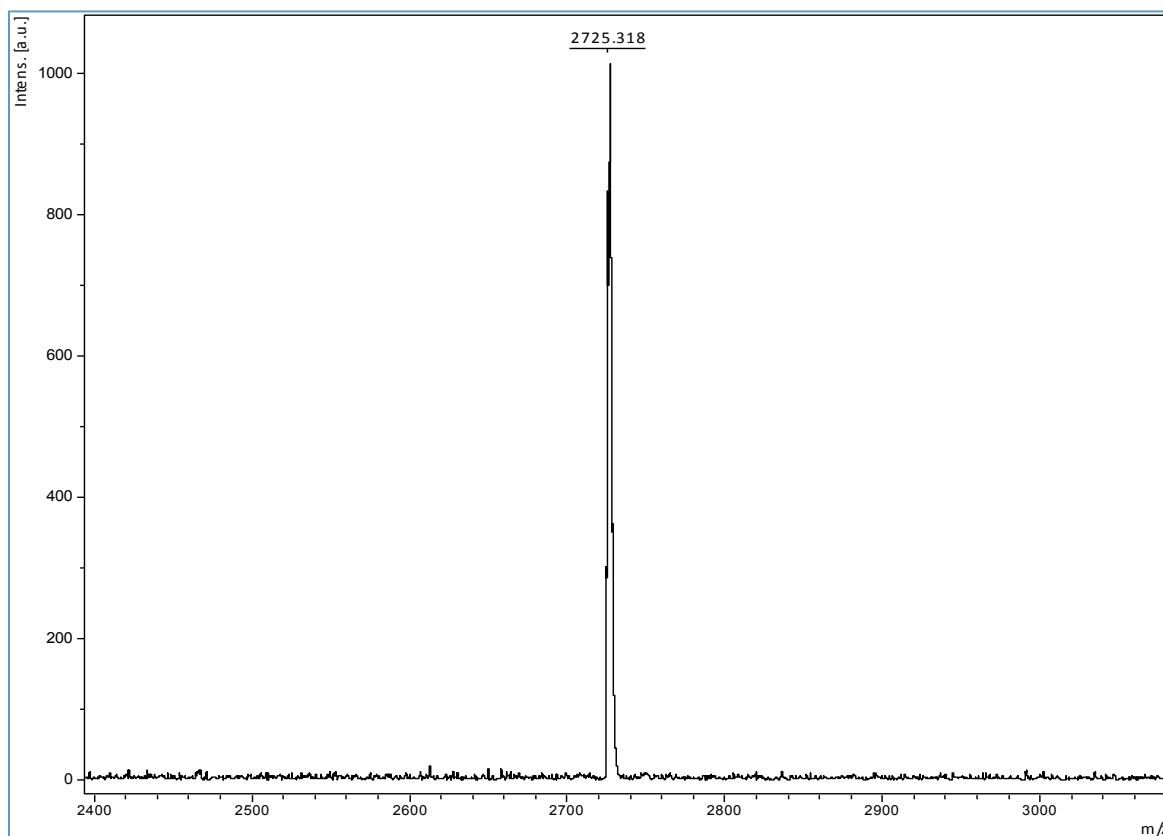


Figura 14. Espectro de MALDI-TOF de E1P47-FAM



4.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1. Validación de HPLC UV-VIS para P6-2

La linealidad se evaluó mediante el análisis de la regresión lineal de la relación entre el área del pico y la concentración nominal de las soluciones patrón de cinco rectas de calibrado (Tabla 12)

Tabla 12. Regresión lineal de HPLC UV-VIS para P6-2

Valores del mejor ajuste	Valores ± SE
<b>Pendiente</b>	<b>6141 ± 18,23</b>
Intercepto-Y	-14418 ± 2252
Intercepto-X	2,348
1/Pendiente	0,0001628
Intervalos de confianza (95%)	
Pendiente	6094 to 6188
Intercepto-Y	-20206 to -8630
Intercepto-X	1,414 to 3,269
<b><math>R^2</math></b>	<b>1</b>
<b>Valor de P</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Desviación de cero?	Significant
<b>Ecuación</b>	<b>Y = 6141*X - 14418</b>

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de varianza ANOVA de una vía, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cinco rectas patrón, esto fue indicativo de que el método fue lineal dentro del rango de concentraciones analizadas ( $\rho=0,5958$ ). La ecuación obtenida de los análisis de las rectas patrón estudiadas se presenta en la Tabla 13.

De acuerdo con la pendiente y la ordenada en el origen, definidos por la ecuación lineal, el límite de detección (LOD) para P6-2 se estableció en  $6,80 \pm 4,36 \mu\text{g/ml}$  y el límite de cuantificación se estableció en  $20,62 \pm 11,73 \mu\text{g/ml}$

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La precisión se expresó como el porcentaje de coeficiente de variación (% CV). Todos los valores obtenidos para las siete concentraciones de P6-2 fueron inferiores al 5% (Tabla 13). La exactitud del método analítico se evaluó calculando el porcentaje de recuperación de las cantidades conocidas de P6-2 en siete concentraciones diferentes. El porcentaje de recuperación global fue de  $100,17 \pm 0,84$ . Los resultados muestran una estrecha correlación entre los valores experimentales y teóricos, por lo cual el método se consideró exacto y preciso, en el rango completo del estudio.

Tabla 13. Determinación de la precisión y exactitud de HPLC UV-VIS para P6-2

Con. Teórica µg/ml	Conc. Exper. µg/ml	Desv St ±SD	Coefficiente de variación (% CV)	% EE	% Recuperación	<i>n</i>
220	220,25	5,67	2,57	-0,11	100,11	5
180	180,11	7,06	3,91	-0,06	100,06	5
110	109,99	3,84	3,49	0,01	99,99	5
90	88,91	4,35	4,89	1,21	98,79	5
55	54,98	2,19	3,98	0,04	99,96	5
45	45,32	2,16	4,76	-0,72	100,72	5
27,5	27,94	1,57	2,04	-1,60	101,60	5

Los resultados de la validación confirmaron que el método analítico HPLC UV-VIS es específico, lineal, exacto y preciso para la cuantificación de P6-2.

### 4.2.2. Validación de HPLC UV-VIS para E1P47

Los resultados obtenidos de la regresión lineal realizada para determinar la linealidad del método para la detección y cuantificación de E1P47 se muestran en la Tabla 14.

El  $r^2$  fue mayor que 0,998 y de acuerdo con los resultados de la prueba de Pearson, el método analítico ha demostrado ser lineal  $p < 0,005$ .

Con respecto a los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), estos se establecieron en  $2,07 \pm 0,90$  µg/ml y  $21,38 \pm 16,72$  µg/ml, respectivamente.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14. Regresión lineal de HPLC UV-VIS para E1P47

<b>Parámetros de la Regresión Lineal</b>	<b>Valores ± SE</b>
Valores con el mejor ajuste	
<b>Pendiente</b>	<b>4691 ± 29,41</b>
Ordenada-Y	-6852 ± 3060
Intercepto-X	1,461
1/Pendiente	0,0002132
Intervalos de Confianza (95%)	
Pendiente	4616 to 4767
Intercepto-Y	-14718 to 1014
Intercepto-X	-0,2189 to 3,101
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,9998</b>
Valor de P	<0.0001
Desviación de cero	Significativo
<b>Ecuación</b>	<b>Y = 4691*X - 6852</b>

Los análisis de precisión se expresaron mediante los correspondientes valores de CV %. La Tabla 15 resume todos los resultados de precisión de las seis soluciones estándar de E1P47. Los valores de CV de las soluciones patrón E1P47 fueron inferiores al 5%. La exactitud de los métodos analíticos se evaluó calculando el porcentaje de las cantidades conocidas del E1P47 en seis concentraciones diferentes. El porcentaje de recuperación global fue de 99,54 ± 0,96. Los resultados de precisión demostraron que ambos métodos son precisos, mostrando una estrecha relación entre los valores experimentales y teóricos.

Tabla 15. Determinación de la Precisión y Exactitud de HPLC UV-VIS para E1P47

<b>media (µg/ml)</b>	<b>± SD</b>	<b>Precisión (CV %)</b>	<b>E E (%)</b>	<b>Exactitud (100-EE)</b>	<b>n</b>
201,09	2,97	1,48	-0,55	100,55	6
149,91	2,48	1,66	0,06	99,94	6
98,09	3,76	3,80	1,91	98,09	6
49,51	2,40	4,84	0,98	99,02	6
25,13	0,40	1,59	-0,50	100,50	6
11,90	0,22	1,84	0,86	99,14	6

Los resultados de la validación confirmaron que el método analítico HPLC UV-VIS es específico, lineal, exacto y preciso para la cuantificación de P6-2.

4.2.3. Validación de HPLC ESI-MS/MS para P6-2

Los resultados obtenidos de la regresión lineal de HPLC-ESI MS-MS, demostraron que el método fue lineal en el rango de 1,0 - 100 µg/l con un coeficiente de correlación de 0,999 (Tabla 16). Un *run test* determinó la linealidad del método y los valores demostraron que no hay diferencias significativas entre las medias Spearman *r* confirma la correlación lineal entre datos

Tabla 16. Regresión lineal de HPLC-ESI MS-MS para P6-2

<b>Variables</b>	
<b>Pendiente</b>	1131 ± 15,35
Ordenada-Y	4370 ± 669.7
Intercepto-X	-3,862
1/Pendiente	0,0008839
Intervalos de Confianza (95%)	
Pendiente	1092 to 1171
Intercepto-Y	2648 to 6091
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9991
<b>valor P</b>	< 0,0001
<b>Desviación de cero</b>	Significante
<b>Spearman r</b>	1
<b>Exact or approximate P value?</b>	Exact
<b>Es la correlación significativa (alfa=0,05)</b>	Yes
<b>Valor de P (runs test)</b>	1
<b>Significativamente no lineal</b>	No

De acuerdo con los resultados obtenidos de la pendiente y la desviación estándar, el límite de detección para P6-2 detectado a través de HPLC ESI-MS/MS se estableció en 2,09 ± 0,53 µg/l y el límite de cuantificación se estableció en 6,32 ± 1,60 µg/l.

Los valores de coeficiente de variación (CV %) estuvieron por encima del 10% (Tabla 17), lo que se atribuyó a las dificultades encontradas durante la detección de cantidades pequeñas de P6-2, sin embargo, la exactitud represento el porcentaje de recuperación global de 100,9 ± 16,78. Esto demuestra que a pesar que en las detecciones de concentraciones pequeñas de péptido fue variable, el porcentaje de recuperación del 100 % determina que el método es exacto, lineal y sensible.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 17. Determinación de la Precisión y Exactitud de HPLC ESI-MS/MS para P6-2

Con. Teórica µg/ml	Conc. Exper. µg/ml	Desv St (± SD)	Coefficiente de variación (% CV)	% EE	% Recuperación	<i>n</i>
<b>1</b>	1,43	0,244	17,02	-43,38	143,4	4
<b>3</b>	3,20	0,499	15,60	-6,51	106,5	4
<b>6</b>	6,49	0,445	6,86	-8,14	108,1	4
<b>12</b>	11,17	0,412	3,68	6,89	93,1	4
<b>25</b>	25,93	0,852	3,28	-3,71	103,7	4
<b>50</b>	47,91	0,633	1,32	4,18	95,8	4
<b>100</b>	100,87	0,288	0,29	-0,87	100,9	4

### 4.2.4. Validación de HPLC ESI-MS/MS para E1P47

La linealidad de HPLC ESI-MS/MS para E1P47 evaluada mediante la regresión lineal de siete curvas de calibración de seis patrones. Los resultados se muestran en la Tabla 18. De acuerdo con el coeficiente de correlación  $>0,99$  y el test de Pearson, los resultados demostraron que el método es lineal en todo el rango de concentraciones estudiadas y correlativo  $\rho < 0,005$ .

Con respecto a los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se establecieron en  $2,53 \pm 0,91$  y  $6,83 \pm 3,17$  ng/ml.

El valor del CV de las soluciones patrón E1P47 para HPLC ESI-MS/MS fueron  $< 6$ . El porcentaje de recuperación global fue de  $102,05 \pm 3,2$  (Tabla 19). Los resultados de precisión y exactitud demostraron que el método es preciso y exacto, mostrando un estrecha relación entre los valores experimentales y teóricos.

Los resultados de la validación demuestran que el método analítico de HPLC ESI-MS/MS es lineal, preciso, exacto y sensible y adecuado para determinar la cantidad de péptido en muestras de diferentes orígenes, tanto *in vitro*, *ex vivo* como *in vivo*

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 18. Regresión lineal de HPLC ESI-MS/MS para E1P47

Parámetros de la Regresión Lineal	Valores± SE
Mejor ajuste	
<b>Pendiente</b>	24851 ± 389,5
Ordenada-Y	30527 ± 16988
Intercepto-X	-1,228
1/Pendiente	0,00004024
Intervalos de confianza (95%)	
Pendiente	23850 to 25852
Intercepto-Y	-13141 to 74195
Intercepto-X	-3,068 to 0,5154
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,9988</b>
<b>Ecuación</b>	<b>Y = 24851*X + 30527</b>
<b>Pearson r</b>	
<b>r</b>	<b>0,9994</b>
Intervalos de Confianza 95%	0,9958 to 0,9999
<b>Significante (alfa = 0,05)</b>	<b>si</b>

Tabla 19. Determinación de la Precisión y Exactitud de HPLC ESI-MS/MS E1P47

Conc. Teórica ng/ml	Conc. Exper ng/ml	± SD	Precisión CV %	E.E %	Exactitud (100- EE)	n
<b>1,5</b>	1,75	0,27	15,42	-16,55	116,55	6
<b>3,0</b>	3,09	0,44	14,20	-3,00	103,00	6
<b>6,0</b>	6,12	0,43	7,02	-2,07	102,07	6
<b>12</b>	11,32	0,47	4,15	5,64	94,36	6
<b>25</b>	23,57	0,20	0,48	5,73	94,27	6
<b>50</b>	52,44	1,91	3,64	-4,89	104,89	6
<b>100</b>	99,20	0,91	0,91	0,80	99,20	6

### 4.3. DISEÑO DE LAS GC-PLGA-NPS

El diseño de las GC-PLGA-NPs se dividió en 3 etapas: la primera fue la optimización del método y la formulación, la segunda etapa fue la caracterización fisicoquímica y morfológica y la tercera etapa se centró en los estudios *in vitro*.

La doble emulsión y evaporación fue el método elegido para la fabricación de las GC-PLGA-NPs cargadas con los péptidos inhibidores P6-2, P6-FAM, E1P47, E1P47-FAM. Este método, aunque es relativamente suave para la encapsulación de péptidos, algunos de los procesos y factores como la sonicación y el uso de solventes orgánicos pueden provocar la ruptura y deteriorar la bioactividad del péptido.

Previo al desarrollo del diseño factorial, se seleccionaron los parámetros para obtener una formulación óptima. Se variaron parámetros como son el porcentaje de surfactante, la composición de la fase interna acuosa (FIA) y el volumen de la fase continua hasta obtener NPs con una eficiencia de encapsulación superior al 50%.

En los ensayos iniciales se varió las concentraciones del surfactante PVA (1-3 %); los valores por debajo del 2% mostraron encapsulaciones deficientes (< al 10%), sin embargo por encima del 2 % hubo un incremento significativo en la encapsulación, por lo que la formulación inicial se trabajó con el 2,5 % de PVA.

El volumen de la fase continua fue otro factor importante en la encapsulación. En el proceso de fabricación por W/O/W, la doble emulsión se formó tras la dispersión de la primera emulsión en agua con un surfactante hidrofílico capaz de estabilizar la fase oleosa en el agua. En principio, este sistema es metaestable y el agua de la FIA, eventualmente se puede escapar a la fase continua, otorgándole a la doble emulsión una mayor estabilidad. Esto puede ocurrir por dos mecanismos, uno de ellos es por la ya descrita, difusión de las gotas de agua de la FIA a través de la fase oleosa; y el otro mecanismo es por coalescencia, en el cual las gotas de agua de la FIA se combinan para formar gotas grandes. En cualquiera de los dos casos, el compuesto disuelto en la FIA puede escaparse. Para evitar estos posibles inconvenientes, se realizó una modificación al método reportado por Silva et al (146). Los autores utilizaron una fase continua con un volumen grande (25 ml) y 0,3 % de PVA; para el presente estudio estos valores representaron la pérdida de casi la totalidad del péptido añadido a la FIA. Esto se atribuyó a que el PVA presente en la fase continua, penetra en la fase oleosa y reemplaza parte del surfactante que se encuentra en la interfase entre las gotas agua-aceite. Esto favorece cambios en la interfase de la gota de agua que esta en contacto con la interfase de la fase oleosa, provocando la apertura y la repentina liberación del contenido a la fase continua (164). Para evitar este inconveniente, la segunda emulsión (w/o/w) se llevó a cabo empleando una solución acuosa que contenía 2,5 % de PVA, que a su vez se usó como fase continua, evitando

la utilización de diferentes tensoactivos. Además la cantidad de agua usada en la fase continua fue suficiente para formar la doble emulsión y favorecer la evaporación del solvente y formación de las NPs, sin provocar coalescencia entre ellas y como consecuencia, inestabilidad.

Otro parámetro importante en la optimización de este método fue la composición de la FIA. Este factor fue investigado para la disolución de los péptidos. Los factores que se tuvieron en cuenta fueron el volumen y la concentración de sales. Debido a la naturaleza anfipática de los péptidos del estudio, para su disolución se usó ACN y Hepes. La concentración de hepes varió entre 20 mM y 50 mM, mostrando tasas de encapsulación diferentes. Las NPs preparadas con una FIA que contenía 20 mM, tuvieron una eficiencia de encapsulación por debajo de lo esperado (entre 5 y 10 %), mientras que aquellas que contenían 50 mM, el porcentaje de encapsulación se incrementó hasta un 50%. Este fenómeno fue atribuido a que altas concentraciones de sales provocan la deshidratación de las moléculas de surfactante que están adsorbidas en la interfase, produciendo un incremento en el tamaño de la gota de agua interna y en el grosor de la membrana oleosa. Este efecto impide la ruptura de la membrana incrementando así la encapsulación. Mientras que a concentraciones bajas de sales, la membrana oleosa se hace más delgada y su ruptura es inminente, liberándose el contenido (165). En la Figura 15 se muestra un esquema de la doble emulsión.

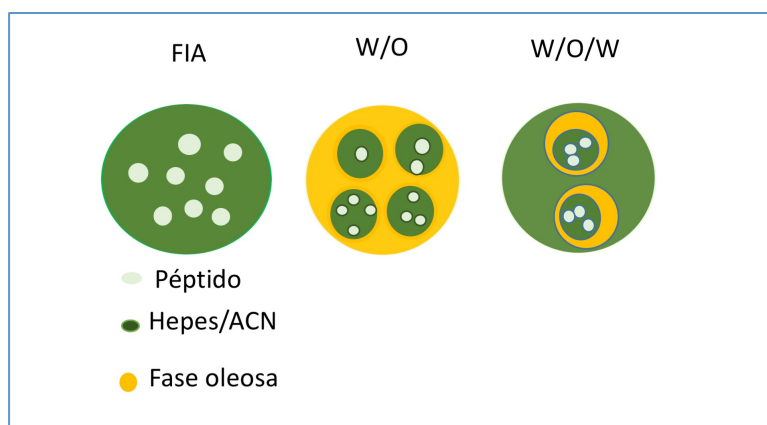


Figura 15. Esquema de la doble emulsión W/O/W

Otro parámetro estudiado fue la mucoadhesividad. En estudios en los que se han utilizado NPs poliméricas para la liberación de fármacos antirretrovirales a través de la mucosa vaginal, la mucoadhesividad de las NPs ha tenido un importante impacto en la captación, penetración y adhesión al epitelio. Neves et al (130), demostraron la captación por diferentes líneas celulares relevantes para la liberación vaginal y la transmisión del VIH, de NPs poliméricas de Dapivirine, un inhibidor de la transcriptasa reversa. Los resultados demostraron que estas NPs, con una carga superficial negativa, podían ser captadas por las células, restringiendo su localización al



citoplasma. Meng et al (133), encapsularon este mismo antirretroviral en NPs de Chitosan y evaluaron la mucoadhesividad y la citotoxicidad. Particularmente, estas NPs que tenían una carga superficial positiva debido a la presencia de grupos aminos débiles que son protonados en medio ácido, demostraron tener propiedades de mucoadhesividad, debido a la atracción electrostática entre los grupos amino del Chitosan presente en la superficie de las NPs y los grupos de ácido salicílico de la mucina. También reportaron que el Chitosan no dañaba la membrana celular y por lo tanto, se considera un polímero seguro y no citotóxico.

Para alcanzar el objetivo de este estudio, las NPs además de cumplir con las condiciones de Z-Ave y EE, deben ser mucoadherentes y biológicamente seguras, por tal motivo se utilizó Glycol Chitosan (GC) para recubrir las NPs de PLGA. El GC es un derivado del Chitosan que tiene una solubilidad en agua y una penetrabilidad mejoradas (166). La Figura 16 muestra la estructura del GC

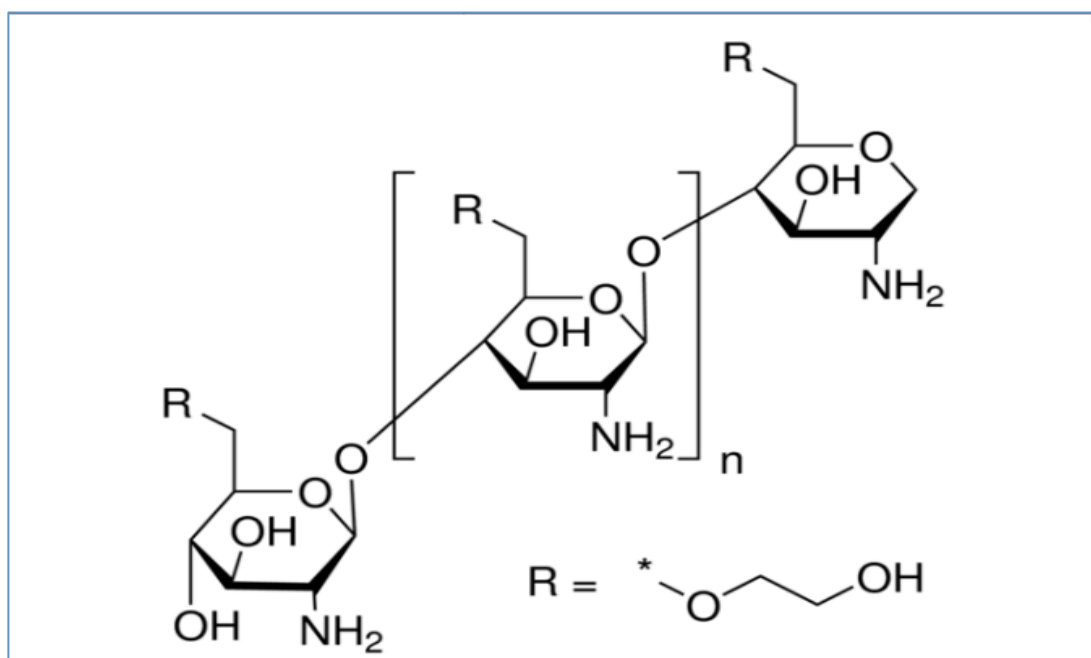


Figura 16. Estructura del GC

Para el recubrimiento de las NPs de PLGA, el GC fue disuelto en la fase externa acuosa, la cual estaba compuesta por agua ácida (pH 4,2) y PVA 2,5%, con el fin de solubilizar el polímero y proporcionar una carga positiva a las NPs.

### 4.3.1. Diseño factorial

Una vez fueron seleccionados los factores, que se han indicado anteriormente, se llevó a cabo el diseño factorial para optimizar la formulación. De acuerdo con los resultados obtenidos, las tasas de encapsulación oscilaron

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

entre el 13% al 86%, que corresponden a la formulación 4 (punto factorial) y a la formulación 16 (punto central) respectivamente. En cuanto al Z-Ave los valores oscilaron entre 174 y 443 nm. El valor más bajo correspondió a la formulación 8 (punto factorial) y el valor más alto correspondió a la formulación 13 (punto axial), respectivamente. Con respecto a la PI el valor más bajo (0,066), correspondió a la formulación 7 (puntos factoriales), mientras que el valor más alto (0,418) correspondió a la formulación 13 (punto axial).

En la Tabla 20 se presentan los valores de Z-Ave, de PI y EE para la formulación optimizada de GC-PLGA-NPs cargadas con E1P47. También se presentan las NPs producidas en los niveles bajos y altos de los factores que se consideraron para el diseño factorial.

Tabla 20. Resultados de Z-Ave, PI y EE para las GC-PLGA-NPs optimizadas cargadas con E1P47 y NPs producidas en los factores extremos

Niveles	Factores <sup>(a)</sup>			Propiedades de las GC-PLGA-NPs		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Z-Ave (nm)	PI	EE (%)
<b>Optimizado</b>	0,25	0,50	0,83	265,5 ± 1,8	0,139±0.040	84,60
<b>Alto</b>	0,30	0,60	1,00	176,0 ± 1,9	0,222±0.016	47,50
<b>Bajo</b>	0,20	0,40	0,66	240,0 ± 2,0	0,123±0.001	21,13

<sup>(a)</sup> la codificación de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> se definen en la tabla 6 de los materiales y métodos

Las variables independientes de C<sub>Péptido</sub> y C<sub>PLGA</sub> afectaron la eficiencia de encapsulación; como era de esperarse, a mayor cantidad de polímero y de péptido mayor encapsulación ( $p > 0,05$ ). El diagrama de Pareto demuestra que los factores concentración de PLGA y la concentración de péptido afectan de forma positiva la EE, mientras que volúmenes de FIA por encima del valor central establecido, (0,25 mg/ml) afectan de forma negativa la EE. Controversialmente, un estudio realizado por Zambaux et al (167), demostraron que valores por encima de 0,2 ml en el volumen de la FIA mejoraron al EE

En este estudio el balance entre el volumen de FIA y la C<sub>PLGA</sub> fue un aspecto crítico para obtener tasas de encapsulación mayores al 80%. El diagrama de Pareto, corrobora estas observaciones (Figura 17 a).

El volumen de la FIA fue la variable que tuvo mayor efecto en el Z-Ave, mientras que la concentración de polímero y péptido no influyeron en el tamaño. También se pudo demostrar que a una concentración constante de péptido (0,25 mg/ml) y volúmenes crecientes de la FIA entre ( 0.3 y 0,6 ml) el tamaño de partícula disminuye, mientras que la concentración de PLGA, a diferencia de lo que se esperaba no afectó el Z-Ave.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos se determinó que la formulación 16 (puntos centrales) fue la más óptima respecto al Z-Ave, PI y EE %. Siendo los valores de los tres factores para dicha formulación de :  $C_{PLGA}$ : 0,83%, w/v;  $C_{Péptido}$ : 0,25 mg/ml; Vol. de la FIA: 0,5 ml. Además, se pudo concluir que elevados contenidos de PLGA no incrementan la EE, y que una óptima EE, dependió del balance de los tres factores seleccionados para este estudio.

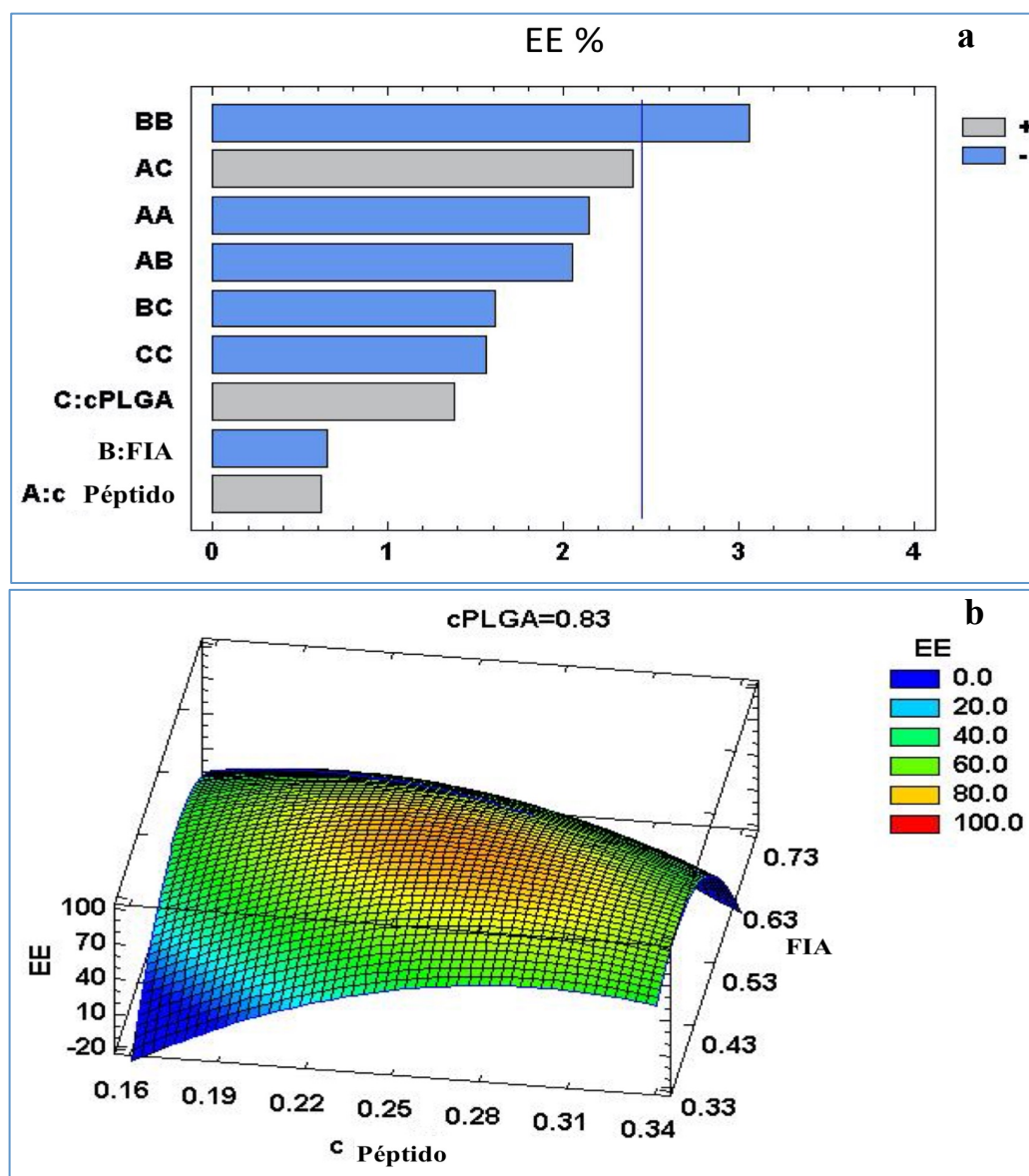


Figura 17 (a) Diagrama de Pareto de la EE. (b) Gráfica de superficie respuesta de EE

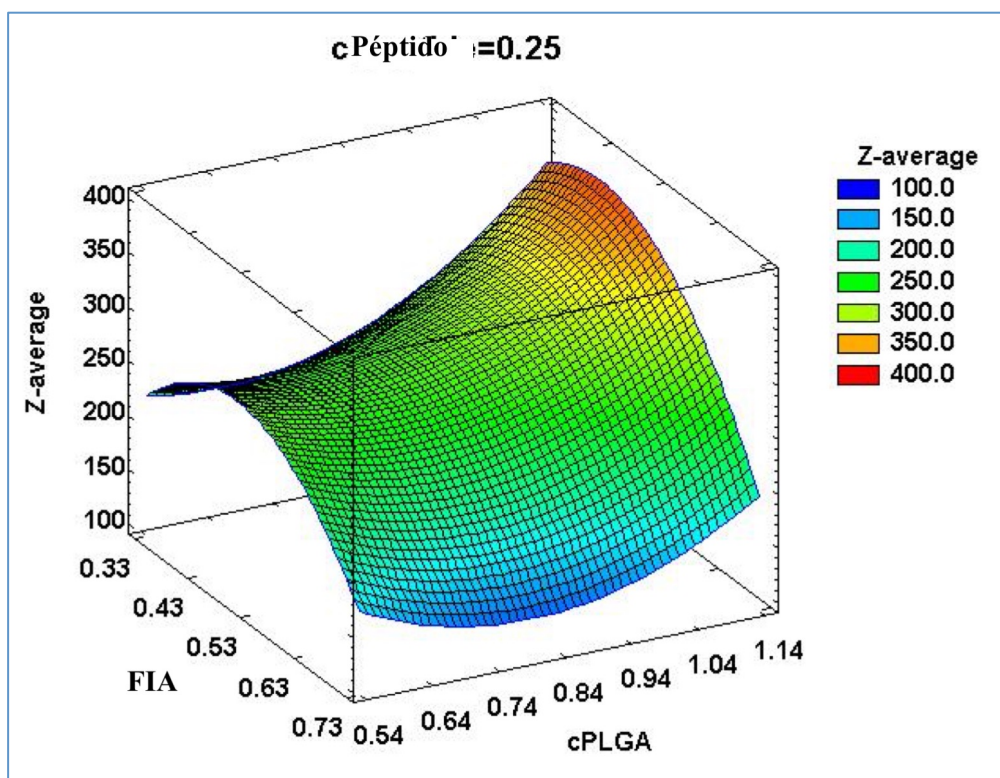


Figura 18. Gráfica de superficie respuesta de Z-Ave

Para establecer la relación entre los factores y las propiedades de la NPs se generó una ecuación polinomial cuadrática. Las figuras 17b y 18, muestran la gráficas de superficies respuesta como una representación gráfica de esta ecuación. Para identificar los factores que afectan el Z-Ave, PI y EE se realizó un ANOVA con los valores obtenidos del diseño factorial  $p > 0,05$  (Tabla 21).

Tabla 21. Valores de  $p$  de los análisis de ANOVA

Factores Evaluados y sus Interacciones	Valor de $p$		
	Z-Ave	PI	EE
<b>A: cPéptido</b>	0,707	0,620	0,483
<b>B: FIA</b>	0,554	0,677	0,403
<b>C: cPLGA</b>	0,077	0,204	0,179
<b>AA</b>	0,358	0,596	0,063
<b>AB</b>	0,944	0,825	0,097
<b>AC</b>	0,833	0,664	0,074
<b>BB</b>	0,309	0,720	0,018
<b>BC</b>	0,940	0,863	0,181
<b>CC</b>	0,285	0,331	0,145

#### 4.3.2. Caracterización fisicoquímica y morfológica las GC-PLGA-NPs

La caracterización fisicoquímica de las NPs se realizó determinando su morfometría (Z-Ave, PI), su carga mediante (ZP) y la eficiencia de encapsulación EE. De acuerdo con los resultados obtenidos en el diseño factorial, la formulación 16, se seleccionó como óptima respecto a Z-Ave, PI y EE. Los valores del Z-Ave, PI, EE y ZP para las diferentes formulaciones se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Propiedades Fisicoquímicas y EE de las formulaciones

Formulación	Z-Ave $\pm$ SD (nm)	PI $\pm$ SD	$\zeta$ (mV) $\pm$ SD	EE (%)
NPsE1P47 <sup>a</sup>	265,50 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 1,80	28,00 $\pm$ 0,50	84,6
NPsE1P47-FAM	316,31 $\pm$ 46,76	0,26 $\pm$ 0,02	32,26 $\pm$ 2,88	60,2 $\pm$ 2,32
NPsP2-2	305,30 $\pm$ 3,13	0,180 $\pm$ 0,014	30,60 $\pm$ 0,35	62,01 $\pm$ 1,89
NPsP6-2-FAM	326,10 $\pm$ 6,99	0,210 $\pm$ 0,007	32,50 $\pm$ 1,31	66,67 $\pm$ 2,81

<sup>a</sup> NPsE1P47 corresponde a la formulación optimizada. Los demás péptidos se encapsularon usando la formulación optimizada como plataforma.

Las posibles interacciones entre el péptido y los componentes de la formulación se evaluaron mediante estudios de rayos X y por espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Los resultados de los rayos X demostraron que todos los componentes de la formulación son amorfos. La Figura 19a muestra que el perfil de las NPsE1P47 y de E1P47 no formulado comparten una única protuberancia a  $2\theta = 15,97^\circ$ . Se observa una

protuberancia adicional a  $2\theta = 19,82^\circ$ , correspondiente al GC. La Figura 19b muestra el patrón de cada uno de los componentes de la formulación y el de las NPsE1P47. Los resultados indican que el patrón que sigue cada uno de los componentes esta presente en el patrón de las NPsE1P47. No se observa la presencia de nanocristales como consecuencia de la precipitación del péptido

Los análisis de FTIR de las GC-PLGA-NPs cargadas con E1P47 muestran dos bandas correspondientes a la amida I ( $1635,82\text{ cm}^{-1}$ ) y amida II ( $1527,35\text{ cm}^{-1}$ ). Esta dos bandas son la región espectral más sensible de la estructura secundaria de proteínas y polipéptidos. La amida A ( $3280\text{ cm}^{-1}$ ), menos prominente en el espectro, se relaciona con los estiramientos NH. Las Figuras 20a y 20b muestran los espectros de las GC-PLGA-NPs y el peptido (a), así como el de cada uno de los componentes de la formulación (b)

La bandas correspondientes a la amida I se deben principalmente a las vibraciones de estiramiento de los C=O del enlace peptídico. La amida II corresponde a la flexión en el plano NH y al estiramiento CN. De acuerdo con la literatura, la presencia de bandas entre  $1642\text{ and }1624\text{ cm}^{-1}$  se asignan a estructuras conformacionales en lámina- $\beta$  con contribuciones de estructuras en giro  $\beta$ . La presencia de bandas entre  $1654\text{ y }1658\text{ cm}^{-1}$  se asigna a estructuras en  $\alpha$ -hélice (148). En la Figura 18b se puede observar que las bandas vibracionales de E1P47 se repiten en las GC-PLA-NPs, además las NPs comparten un pico adicional con el PLGA ( $1762\text{ cm}^{-1}$ ) que se atribuye a los estiramientos vibracionales de C-H presente en los dos monómeros de el polímero.

Esto resultados sugieren que el E1P47 adopta una estructura conformacional en lámina  $\beta$ , característica de polipéptidos de tamaño medio. Además no existen interacciones entre el polímero y el péptido que puedan influir en su efectividad.

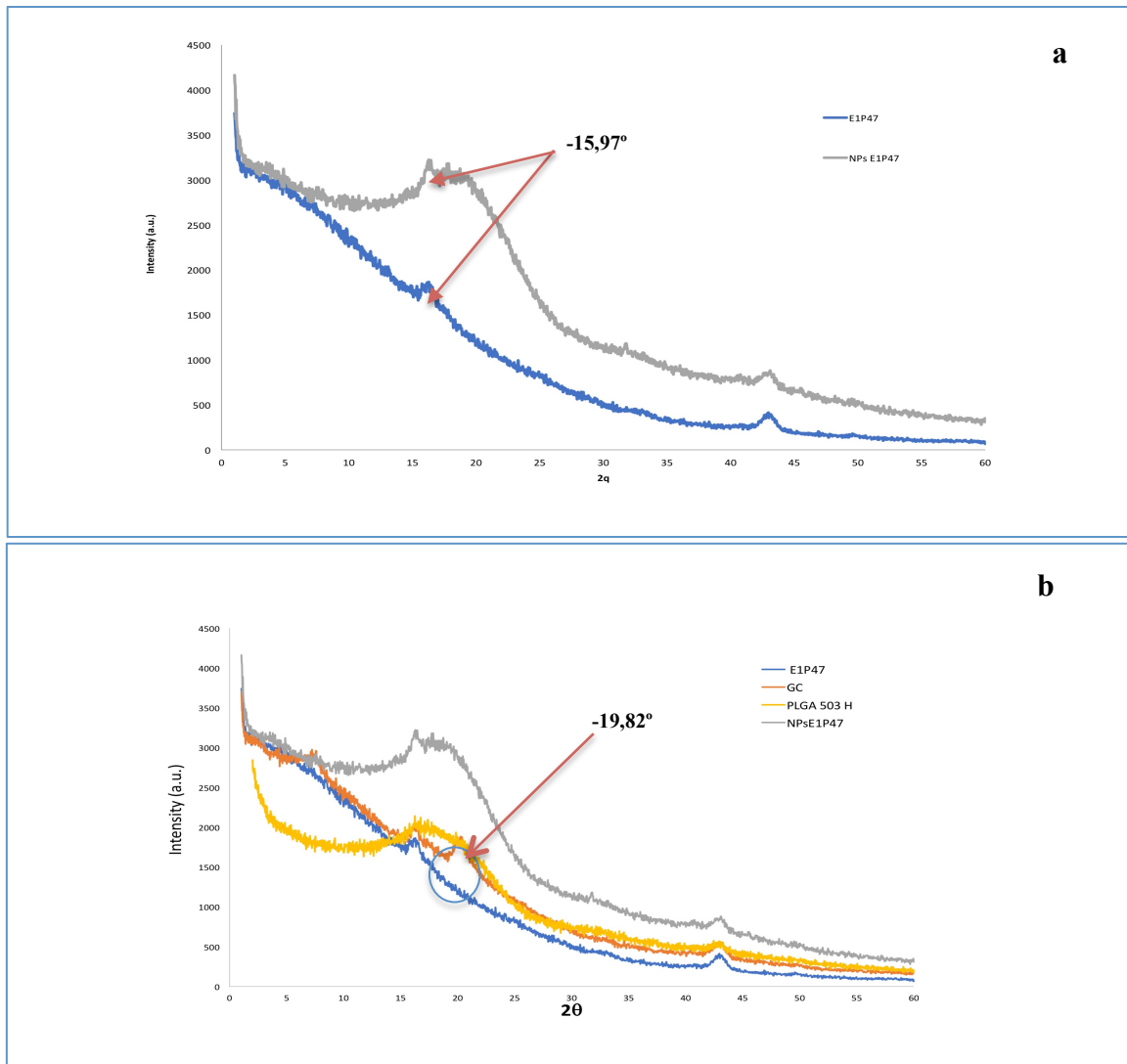


Figura 19. Diagrama de rayos X. (a) NPsE1P47 y péptido (b) NPsE1P47 y sus componentes (PLGA, GC y E1P47)

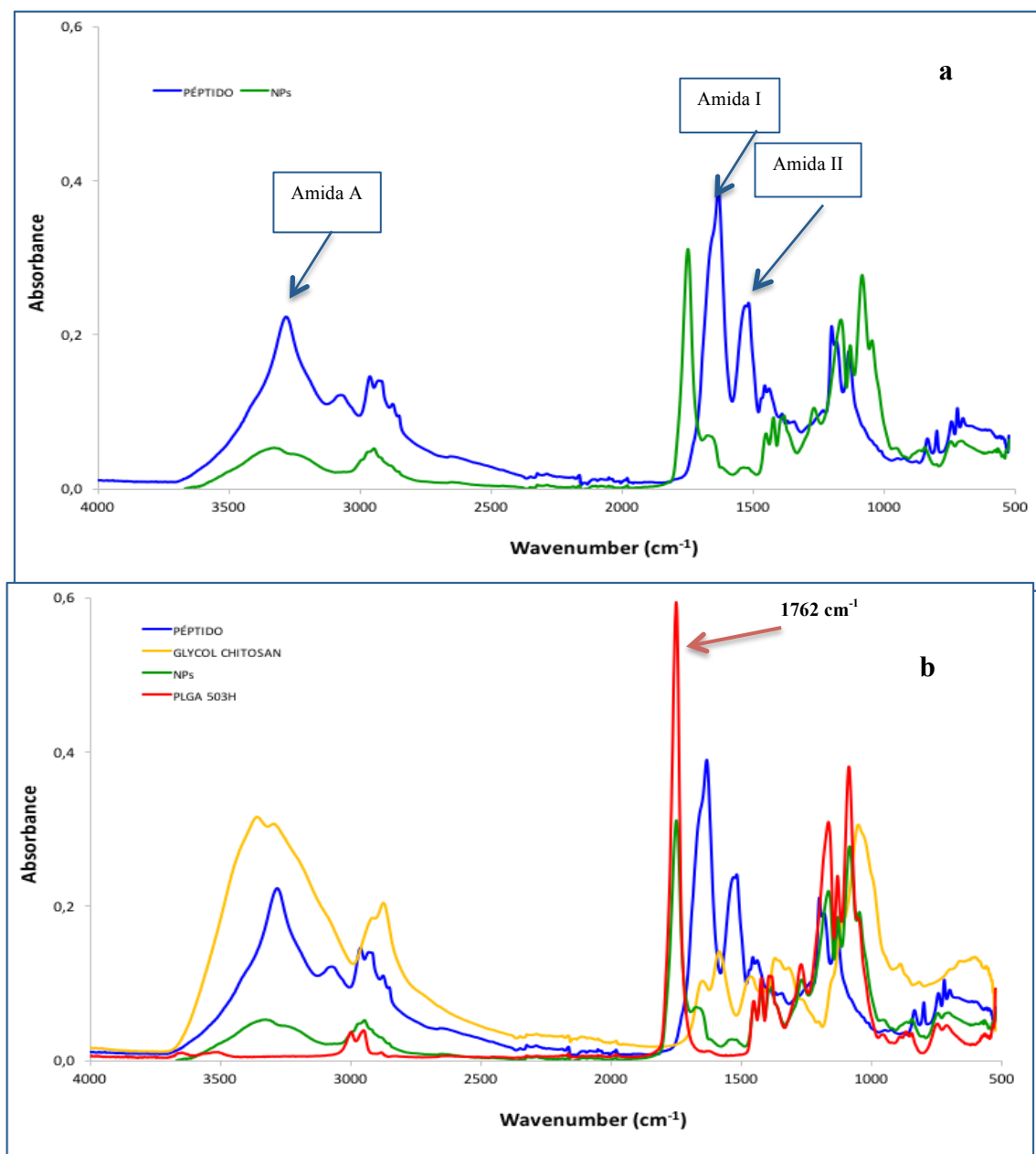


Figura 20. Espectros FTIR de GC-PLGA-NPs con E1P47. (a) Espectros de las GC-PLGA-NPs y de E1P47. (b) Espectros de las GC-PLGA-NPs y cada uno de los componentes

Morfológicamente, las GC-PLGA-NPs cargadas con E1P47 (NPsE1P47), se caracterizaron mediante MET, (Materiales y Métodos). Las evaluaciones realizadas por MET, confirmaron el Z-Ave y la PI obtenidos en el diseño factorial. En la Figura 21 se puede ver NPs esféricas con un resaltado del polímero y la cavidad interna. Además no se observan aglomeraciones lo que indica que las NPs en suspensión no sufren aglomeraciones (168)



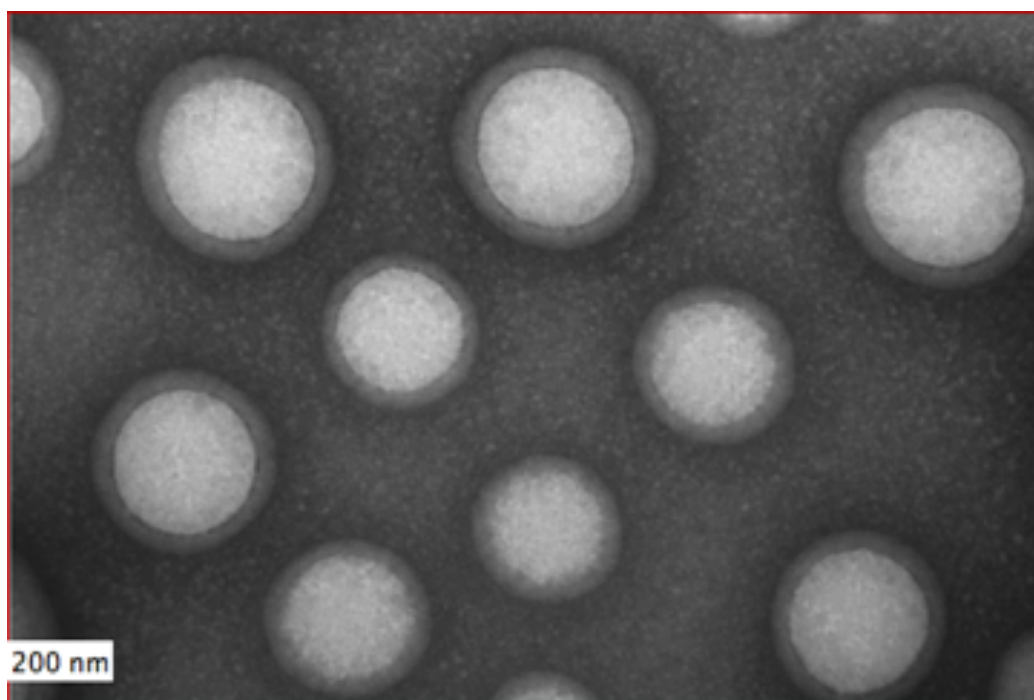


Figura 21. Micrografía de Transmisión electrónica de las NPsE1P47.

El análisis de los fenómenos físicos relacionados con la desestabilización de la formulación optimizada, se evaluaron durante 7 días tras el almacenamiento de la suspensión a 4 °C. Utilizando el analizador óptico Turbiscan<sup>®</sup>Lab. Las mediciones se registraron durante 24 horas. Las variaciones superiores al 10%, ya sea valor positivo o negativo en la escala gráfica de retrodispersión (backscattering, BS), representan una formulación inestable. En la Figura 22, se pudo observar el perfil de BS de NPsE1P47. No se observaron cambios asociados a la desestabilización física, como la agregación, la coalescencia o la cremación. El perfil de BA fue de  $\pm 2\%$ , lo que demuestra que la formulación es estable en las condiciones experimentales establecidas. Es posible que la suspensión de NPsE1P47 sea estable en el almacenamiento a largo plazo. Para el desarrollo de este estudio, las suspensiones se mantuvieron un máximo de 48 hasta su uso, por tal motivo no se realizaron ensayos de estabilidad a largo plazo

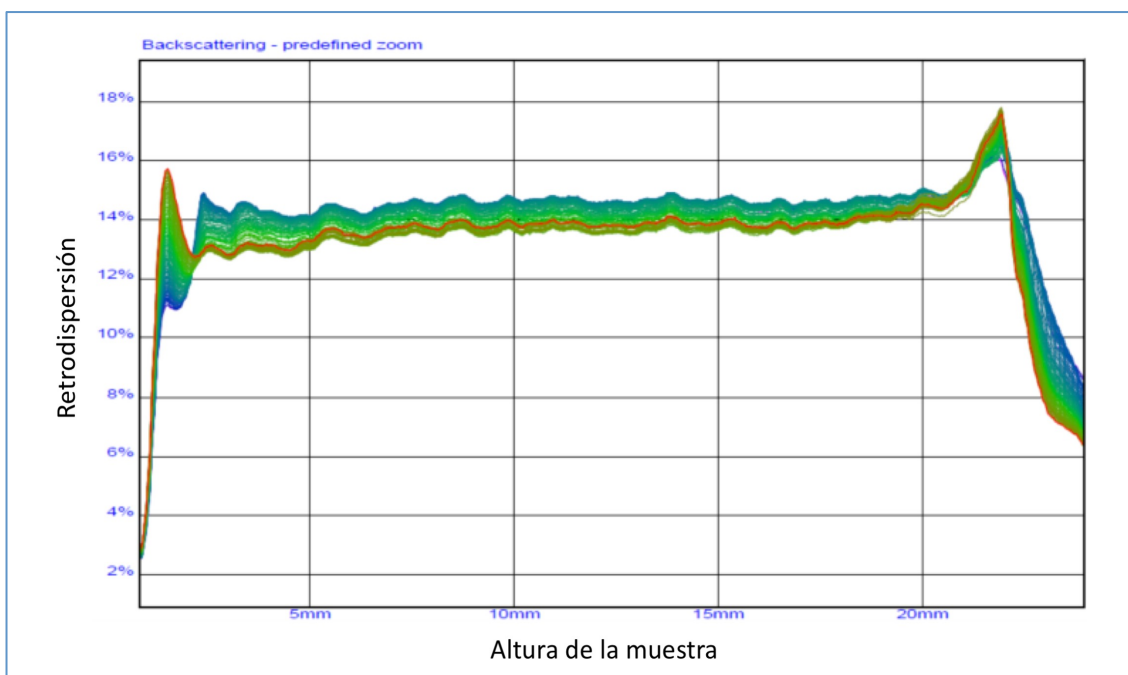


Figura 22. Perfil de retrodispersión (BS) de las NPsE1P47 como una función del tiempo medida a través de la altura (mm) de la celda de la muestra.

#### 4.3.3. Análisis de aminoácidos de NPsP6-2

El contenido P6-2 encapsulado en las GC-PLGA-NPs se determinó indirectamente por HPLC y se confirmó mediante análisis de aminoácidos. El cromatograma correspondiente a los aminoácidos presentes en la suspensión de NPsP6-2 después de la hidrólisis ácida se muestra en la Figura 23 y en la Tabla 23 se muestra la relación de aminoácidos de la suspensión de NPsP6-2. Como se puede observar, los aminoácidos asparagina y glutamina se describen conjuntamente como Asp / Asn y Glu / Gln, esto se debió a que durante el proceso la asparagina y la glutamina se desamidaron en sus respectivos ácidos durante la hidrólisis con el HCl. La ausencia de triptófano se debe a que este aminoácido es hidrolizado durante el proceso. Los aminoácidos más abundantes en la muestra fueron prolina, glicina y valina.

El contenido de aminoácidos en la muestra fue de 0,055 mM, lo que corresponde al 66,65% del péptido total añadido a NPs. Este resultado es consistente con los resultados obtenidos por el método UV-VIS de HPLC a 280 nm (62,01%).

Tabla 23. Contenido de aminoácidos en la suspensión de NPsP6-2

	Amino acidos	nmol	Teórica	Reporte
2	Asp/Asn	1,668	2	1,61
3	Thr	0,052	0	0,05
5	Glu/Gln	0,983	1	* 0,95
6	Pro	3,375	3	* 3,25
7	Gly	2,172	2	* 2,09
8	Ala	2,172	2	* 2,09
9	Cys	1,371	3	1,32
10	Val	2,767	3	* 2,67
11	Met	0,065	0	0,06
12	Ile	0,091	0	0,09
13	Leu	0,944	1	* 0,91
14	Tyr	0,065	0	0,06
15	Phe	1,073	1	* 1,03
16	His	0,181	0	0,17
17	Lys	0,078	0	0,08
19	Arg	0,168	0	0,16

(\*) Representa los aminoácidos que se usaron para los cálculos

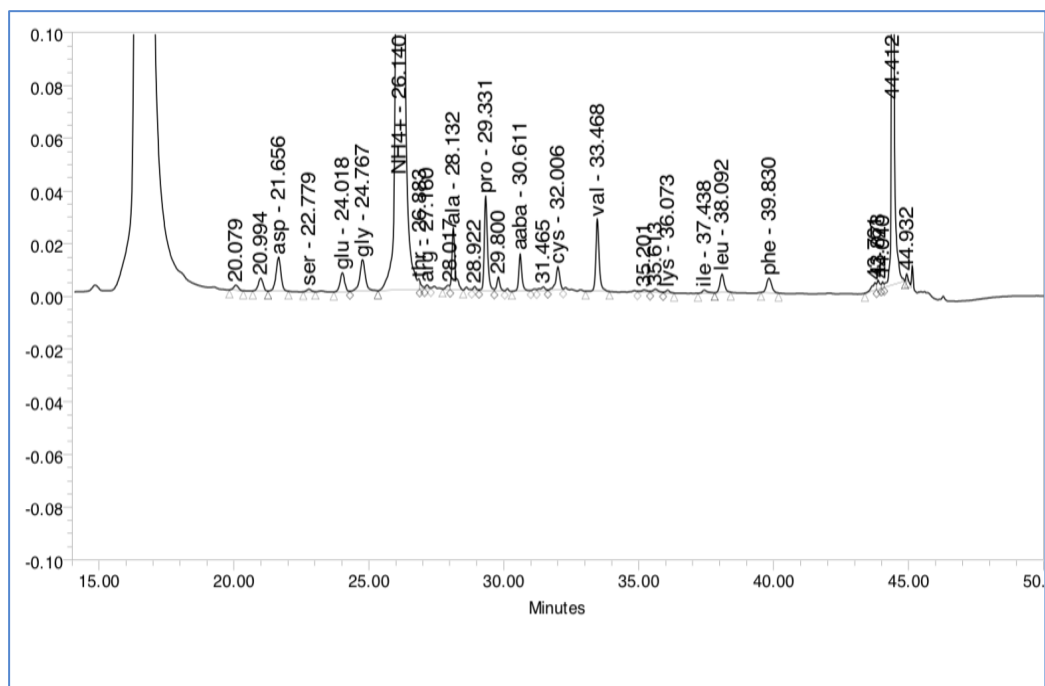


Figura 23. Cromatograma correspondiente a el análisis de aminoácidos de la NPsP6-2

### 4.3.4. Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo con el fin de caracterizar y evaluar la cinética de liberación de las formulaciones de GC-PLGA-NPs cargadas con E1P47 y con P6-2. Aunque existen varios métodos y el más recomendado para la liberación de péptidos es la separación por centrifugación, la presencia de los productos de degradación del polímero en el medio, llevan a realizar procedimientos de filtrado para poder detectar el péptido liberado. Esto produce detecciones inexactas debidas a la excesiva manipulación de la muestra.

En esta tesis, se seleccionó la liberación mediante diálisis dinámica; este método es uno de los más comúnmente usados para determinar la cinética de liberación de fármacos a través de NPs. Este método es el de elección dado que el paso de separación del fármaco libre de los productos de degradación de las NPs es eliminado (169).

Este método se basa en el paso del fármaco a través de una membrana física o biológica hacia un compartimento receptor, como resultado de la difusión desde las NPs seguida por la difusión a través de la membrana de diálisis. Aunque siempre se ha tratado como un proceso simple y de primer orden, experimentalmente se puede medir cualquier desaparición del fármaco del compartimento donador que contiene las NPs, o cualquier aparición del mismo en el compartimento receptor (170).

#### 4.3.4.1 Estudios de liberación *in vitro* de NPs E1P47

Los resultados obtenidos de la liberación *in vitro* de E1P47 se presentan como un perfil de liberación en la Figura 24.

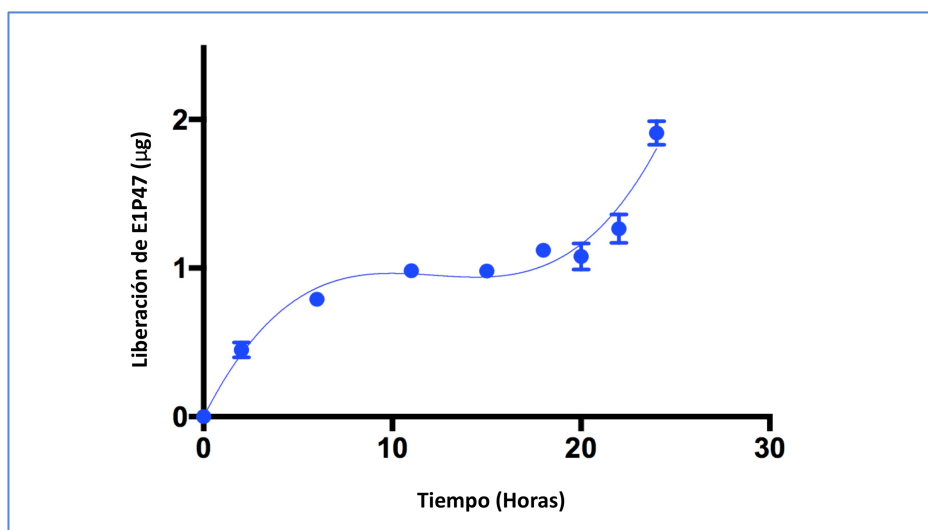


Figura 24. Perfil de liberación de E1P47

Analizando el perfil de liberación de E1P47 se puede observar que el péptido tiende a solubilizarse bien en el medio receptor, con lo cual la cantidad de péptido que se liberó en el tiempo del estudio es directamente

proporcional a la cantidad que queda en las NPs, y fácilmente se podría definir como un perfil de liberación monofásico, aunque ello no siempre es adecuado (171–173).

Aunque en el tiempo en el que se llevó a cabo el estudio de la liberación, el péptido no se liberó completamente, se pueden inferir los mecanismos que pueden estar relacionados con el proceso.

En general, existen cuatro mecanismos principales de liberación: (a) difusión a través de poros llenos de agua, (b) difusión a través del polímero, (c) erosión y (d) bombeo osmótico. También hay varios fenómenos que pueden estar relacionados con la liberación muy lenta: (a) velocidades de apertura de los poros, (b) interacción entre las moléculas con los demás componentes de la formulación que conducen a un complejo menos soluble en agua, (c) combinación de partículas de diferentes tamaños, (d) adsorción de péptidos en las interfases de los materiales NPs y (d) cierre de poros (170).

La liberación *in vitro* de E1P47 podría asociarse a más de un mecanismo, pero teniendo en cuenta las características de las NPs y también del péptido, el mecanismo más apropiado que podría describir la liberación es la difusión a través de poros llenos de agua. La velocidad de difusión se rige por la formación de poros, al principio del proceso, el tamaño de poro es pequeño para moléculas de gran tamaño tales como E1P47, por lo que la velocidad de difusión se ralentiza, y como consecuencia el perfil de liberación es lento. Por otro lado, la interacción entre el péptido y el polímero durante el proceso de difusión podría ralentizar la liberación y, por lo tanto, no se descarta.

#### 4.3.4.2. Estudios de liberación *in vitro* de NPsP6-2

A diferencia de E1P47, P6-2 mostró un perfil de liberación bifásico. En la (Figura 25) se muestra un perfil caracterizado por una fase de inducción (fase I), seguida de una fase sostenida (fase II). La asíntota de liberación se alcanzó a las 5 horas, manteniendo una fase de retardo de hasta 10 horas. Aunque los estudios de liberación de P6-2 se realizaron durante 24 horas, tras las 10 horas del ensayo, la detección del péptido fue imprecisa; este fenómeno se atribuyó a la agregación del péptido en el medio y a posibles problemas de adsorción al material. Para superar el problema de agregación, se añadió DTT en el medio de liberación y se limitó el tiempo de los ensayos a 10 horas. Durante este período, el péptido fue más fácil de detectar por HPLC / MS-MS.

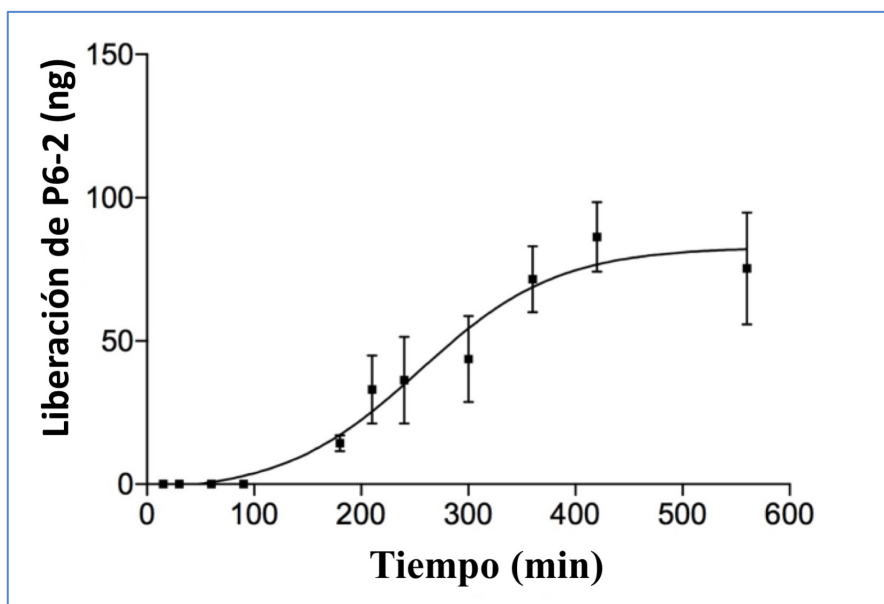


Figura 25. Perfil de liberación de P6-2

En un estudio reciente realizado por nuestro grupo, en el que se evaluó el perfil de liberación de P6-2 de liposomas, se demostró que la liberación fue más lenta en solución amortiguadora de pH (PBS) que en medio de cultivo suplementado con 10% de suero bovino fetal DMEM / FBS (174). En el presente estudio, se obtuvieron resultados similares, ya que durante el tiempo del estudio se liberó un 10% del contenido total en las NPs, sugiriendo que la liberación de P6-2 se ralentizó como resultado ya sea de un polímero con baja porosidad o por interacciones entre péptido y polímero durante el proceso de difusión desde la matriz del polímero. Aunque no se liberó todo el péptido incorporado en NPs, los resultados se ajustaron al modelo sigmoideal de Boltzmann (175).

$$m = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(t - t_0)/k}} + A_2 \quad (\text{Ecuación 12})$$

Donde (m) es la masa de cada muestra expresada en ng. ( $A_1$ ) es el límite Y bajo, ( $A_2$ ) es el límite Y alto, (k) es la pendiente y ( $t_0$ ) representa el V50. V50 es un parámetro modelista que puede determinar el tiempo en el que se libera la mitad del péptido. Los análisis estadísticos de los datos se realizaron mediante una regresión no lineal de mínimos cuadrados utilizando el software WinNonLin (WinNonLin versión profesional versión 3.3 y Graphpad prisma versión 6 Demo).

La Tabla 24 muestra el modelo y los parámetros de disolución correspondientes para el análisis estadístico de P6-2 liberado de NPs.

Tabla 24. Parámetros estadísticos de la cinética de liberación de P6-2

	<b>Bottom (ng)</b>	<b>Top (ng)</b>	<b>V50</b>	<b>Pendiente</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<b>GC-PLGANPsP6-2</b>	-3,15 ± 5,64	82,60 ± 6,87	254,600 ± 18,40	63,64 ± 19.15	0,989

### 4.3.4.3. Estudios de captación celular

La captación celular es un mecanismo que se ha utilizado para evaluar diferentes aspectos relacionados con las interacciones entre sistemas de liberación de fármacos y células. Por ejemplo, a través de ensayos de captación celular, se puede evaluar la potencial citotoxicidad de las NPs, los mecanismos de transporte celular y la liberación intracelular de medicamentos (176,177).

Estos estudios se realizaron con el fin de evaluar no solo la captación de las GC-PLGA-NPs por una línea celular, sino además para discriminar entre la capacidad de las NPs de interactuar con las membranas y/o atravesar las barreras biológicas y así prever su interacción y paso a través de la mucosa vaginal.

La evaluación de la captación de las GC-PLGA-NPs se llevó a cabo mediante análisis de citometría de flujo, para esto, se prepararon GC-PLGA-NPs cargadas con E1P47-FAM, usando como plataforma para su preparación, la formulación optimizada. Las características físicoquímicas de las NPsE1P47-FAM, se muestran en la Tabla 22. Las diferencias observadas en cuanto a Z-Ave, PI y EE con respecto a la formulación optimizada, se atribuyen a el acoplamiento de 5(6)-FAM a E1P47.

Los resultados obtenidos de los ensayos de captación, tras el tratamiento con NPsE1P47-FAM a células HeLa-env a diferentes tiempos demostraron que, durante las primeras 4 horas hubo un aumento en la intensidad de la señal fluorescente dependiente del tiempo, mientras que de 6 a 24 horas de tratamiento, la intensidad de la señal disminuyó significativamente. Para determinar si la señal provenía del interior de las células, como consecuencia de la captación o si por el contrario, era el resultado de la absorción de las NPs a la membrana externa de las células, se hizo un tratamiento a las células con azul de tripano, (TB). Los resultados demostraron que aproximadamente el 53 % de las NPsE1P47-FAM en las primeras 4 horas habían sido internalizadas por la células, y que el 47% restante estaban adsorbidas a la membrana. De tal manera, que la fluorescencia emitida se atribuyó a la NPs internalizadas, ya que la fluorescencia proveniente de las NPsE1P47-FAM adsorbidas en la membrana se apaga por efecto del TB. En la Figura 26 se muestra la cinética de captación de las NPsE1P47-FAM durante 1,2,4, 6 y 24 horas de tratamiento.

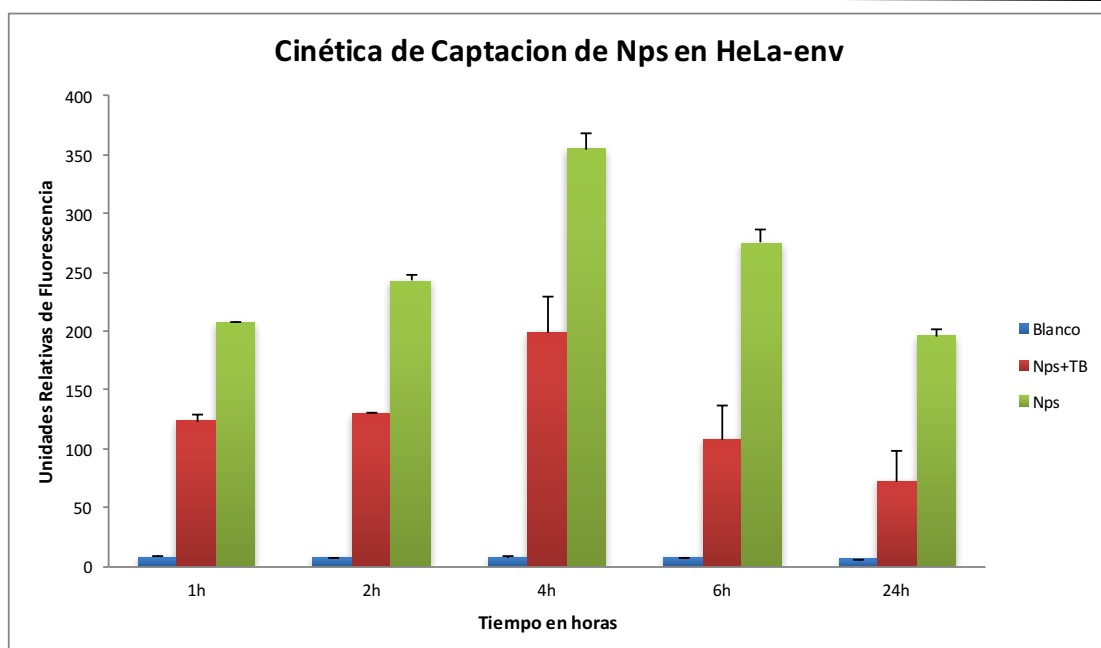


Figura 26. Cinética de Captación de las NPSE1P47-FAM

Como se había descrito anteriormente, los ensayos de captación celular constituyen una herramienta útil en la evaluación de la nanotoxicidad. Para determinar la citotoxicidad que pudieran provocar las NPSE1P47-FAM durante el estudio, se tuvieron en cuenta parámetros como el contenido celular (SS) y disminución de tamaño de las células (FS) evaluados por citometría de flujo. En términos generales un aumento de SS es indicativo de contenido granular, ya sea por captación de NPs o por la aparición de cuerpos apoptóticos. Por otro lado, la disminución de FS es indicativo de muerte celular (encogimiento de la célula).

Los resultados obtenidos de las evaluaciones realizadas por citometría de flujo de las células HeLa-Env, después del tratamiento con NPSE1P47-FAM, mostraron que hasta las 4 horas hubo un incremento tanto de SS como FS, indicativo de captación de las NPSE1P47-FAM. Después de las 6 horas hasta las 24 horas FS disminuyó significativamente y SS incremento levemente, esto se consideró indicativo de nanotoxicidad, (Figura 27).



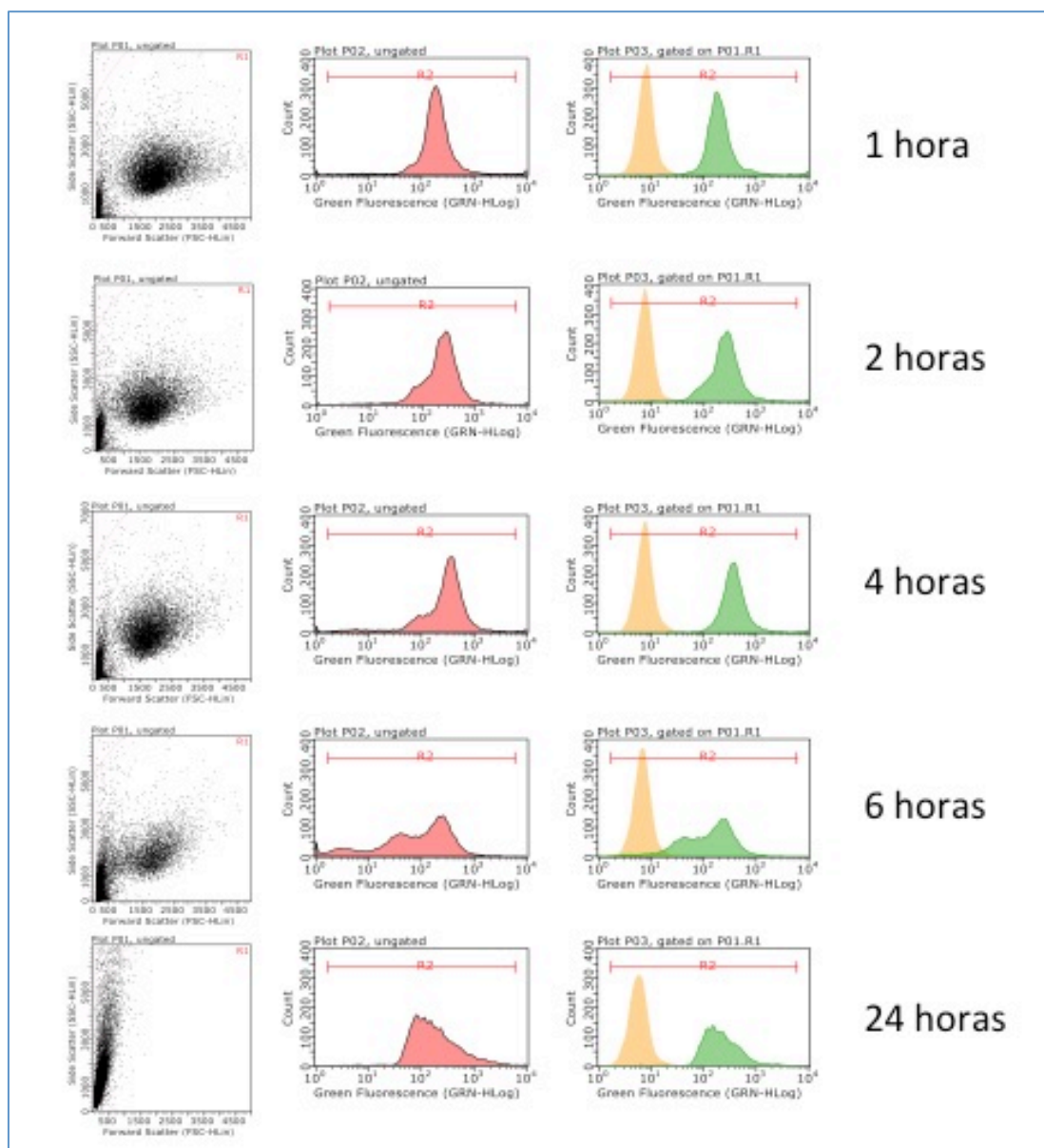


Figura 27. Análisis de citometría de flujo de HeLa-env después del tratamiento con NPsE1P47-FAM

Se ha demostrado que las células tienen mayor afinidad por la captación de NPs con cargas positivas, y que su captación se lleva a cabo por transporte pasivo, mediante la interrupción de las bicapas lipídicas provocando defectos a nanoescala que mejoran la conductancia a través de la membrana plasmática (178). Una vez se elimina el estímulo efectuado por las NPs, la integridad celular se restablece, mientras que si los estímulos persisten, pueden causar la desestabilización de la membrana plasmática, desencadenando señales apoptóticas que conducen a la muerte celular.

Mediante este estudio también se pudo determinar cual era el tiempo máximo que las NPs pueden quedarse adheridas a la membrana celular sin causar muerte celular. De las observaciones hechas se puede concluir que

entre 4 y 6 horas es el máximo de tiempo que las NPs pueden estar en contacto con la membrana externa de las células.

A otra importante conclusión a la que se pudo llegar, fue con respecto a la expresión de las proteínas de la envoltura del VIH en la membrana celular HeLa. Los resultados sugieren que las NPs podrían permanecer unidas a la proteína de envoltura del VIH, con lo cual las NPs podrían liberar el péptido inhibidor, y este a su vez interactuar rápidamente con el péptido de fusión del VIH e impedir la entrada del virus en la célula blanco.

### 4.4. ESTUDIOS *EX VIVO*

Los estudios *ex vivo* se realizaron tanto para determinar la capacidad de penetración como de permeabilidad de las GC-PLGA-NPs, en un modelo de mucosa vaginal y compararlos con estudios *in vivo*

#### 4.4.1. Evaluación de la permeación de NPsE1P47 y NPsP6-2

Mecanismos intrínsecos asociados a la permeación de NPs se pueden evaluar mediante los ensayos *ex vivo* (179). Los mecanismos de difusión dependen de las propiedades fisicoquímicas de los NPs, la naturaleza del fármaco, el coeficiente de partición entre lípido / agua de la moléculas y el grado de ionización de las moléculas permeadas a través del epitelio.

La mucosa vaginal de los cerdos es un modelo ampliamente utilizado en los estudios de permeación de fármacos, debido a las similitudes tanto estructurales como anatómicas con la mucosa vaginal humana. En cuanto a las propiedades fisicoquímicas del fármaco, se sabe que la permeación de moléculas hidrófilas a través de la mucosa vaginal de los cerdos es comparable a la permeación a través de la mucosa vaginal humana, no obstante la permeación de las moléculas lipófilas es ligeramente diferente.

El mecanismo de absorción del fármaco a través de la mucosa vaginal es un mecanismo de múltiples vías, similar al de las membranas biológicas. Los principales mecanismos de difusión son pasivos o activos. La difusión pasiva incluye una ruta transcelular a través de las membranas celulares y una vía paracelular a través del fluido intercelular o uniones estrechas, mientras que los mecanismos activos generan gradientes a través de las barreras y son mecanismos dependientes de ATP (180)

En este trabajo se evaluó la permeación de NPsE1P47, NPsP6-2 y E1P47 no formulado. Los resultados obtenidos de la permeación de NPsE1P47 indican que las NPs mejoran la permeación del péptido liberado a través de la mucosa vaginal en comparación con el péptido no formulado. El perfil de permeación, tanto de E1P47 no formulado como de NPsE1P47 se muestran en la Figura 28.

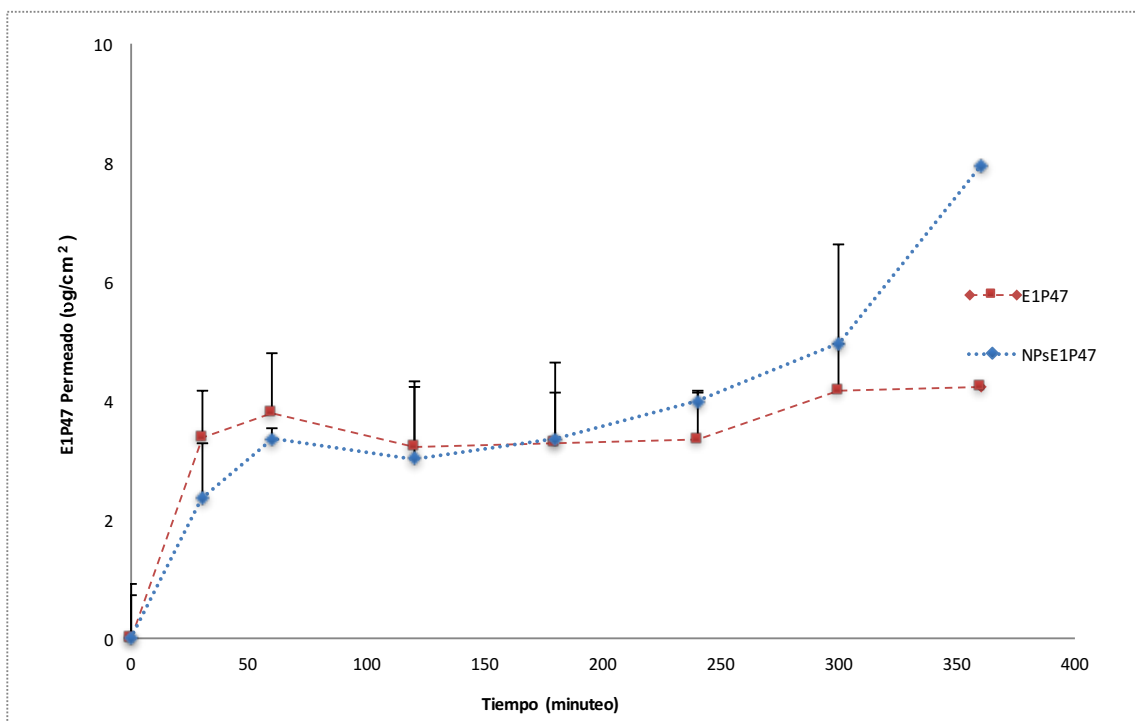


Figura 28. Perfil de permeacion de E1P47 no formulado y NPsE1P47

Con los resultados obtenidos de la cantidad permeada, se calculó el coeficiente de permeacion ( $P_{app}$ ) tanto para NPsE1P47 como para E1P47 no formulado. Los resultados se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Valores de  $P_{app}$  de NPsE1P47 y E1P47 permeado en la mucosa vaginal de cerdo

	$P_{aap}$ (cm/s) ( $\pm$ SD)
<b>NPsE1P47</b>	$8,88 \times 10^{-3}$ ( $\pm 8,85 \times 10^{-4}$ )
<b>E1P47</b>	$1,18 \times 10^{-3}$ ( $\pm 3,20 \times 10^{-4}$ )

Estos valores demuestran que las NPsE1P47 son más permeables que el péptido no formulado. De acuerdo con los estudios estadísticos de ANOVA y la prueba de Kruskal-Wallis, se observaron diferencias significativas entre  $P_{app}$  de NPsE1P47 y E1P47 no formulado ( $P < 0,05$ ), lo que sugiere que las características fisicoquímicas de los NPs mejoran la adherencia a las membranas y la difusión a través de la mucosa.

La permeacion de las NPsE1P47 se puede asociar a un proceso de difusión no específico y conducido por un gradiente de concentración, siendo importante tener en cuenta que la solubilidad del fármaco puede aumentar o disminuir la velocidad de permeacion.

También se determinó la cantidad retenida (Qr) de E1P47 no formulado y formulado en la mucosa vaginal y (Tabla 26).

Tabla 26. Valores de Qr de E1P47 formulado y liberado de NPs (*ex vivo*)

	Cantidad retenida $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{cm}^2) \pm (\text{SD})$
<b>NPsE1P47</b>	38,58 $\pm$ 1,60
<b>E1P47</b>	89,92 $\pm$ 2,07

Los resultados sugieren que la naturaleza anfipática de E1P47 y las condiciones del experimento fueron los principales factores que afectaron la retención en la mucosa tanto de E1P47 no formulado, como de NPsE1P47.

Es posible que al entrar en contacto E1P47 con la membranas celulares, adopte una estructura secundaria lo que aumentaría su interacción y la formación de enlaces de hidrógeno intermolecular en la interfase de membrana contribuyendo a una unión más fuerte (181).

Por otro lado, no hay que olvidar que el área de exposición de la mucosa es pequeña y que la cantidad de péptido liberado de las NPs, que entra en contacto con la mucosa, es mucho menor que la cantidad de péptido no formulado. Esto explica porque la cantidad de péptido extraído de la mucosa tratada con E1P47 no formulado es mayor, que la cantidad de péptido extraído de la mucosa tratada con NPsE1P47.

Con respecto a la permeación de NPsP6-2, las observaciones fueron distintas ya que el flujo de permeación de P6-2 a través de la mucosa vaginal no se calculó, debido a que el péptido se detectó después de 5 horas de experimento. La cantidad permeada de P6-2 a las 5 horas fue de  $2,07 \pm 0,65 \text{ ng}/\text{cm}^2$  y la cantidad retenida fue de  $26,66 \pm 7,23 \text{ ng}/\text{g}\cdot\text{cm}^2$ . Este fenómeno se puede atribuir a la solubilidad y a la posible formación de dímeros o agregados en los espacios intercelulares.

#### 4.4.2. Evaluación de la penetración de NPsP6-2-FAM

La evaluación de la penetración de las NPsP6-2-FAM se llevó a cabo con el fin de determinar cualitativamente si las NPs pueden atravesar la mucosa vaginal en condiciones *ex vivo*, ya que hasta la fecha no se conocen estudios sobre la capacidad de NPs con características similares, cargadas con péptidos inhibidores de la fusión para penetrar la mucosa vaginal. Sin embargo, Das Neves et al (134), describió la penetración de NPs poliméricas de 200 nm cargadas con un antirretroviral, en la mucosa vaginal de cerdo.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio las NPsP6-2-FAM alcanzaron un tamaño de 300 nm, su capacidad de penetración fue evaluada mediante microscopía confocal. Los resultados de las imágenes adquiridas muestran una señal fluorescente en la capa más superior del epitelio vaginal atribuido a las NPsP6-2-FAM (Figura 29), lo que sugiere que las NPs poseen características de bioadhesividad. También se observan agregados fluorescentes en zonas profundas de la mucosa, esto puede deberse a que el péptido liberado de las NPs o incluso las NPsP6-2-FAM, pueden atravesar el epitelio mediante un mecanismo de difusión pasiva. P6-2 es de naturaleza anfipática, con lo cual su difusión puede llevarse a cabo a través de las bicapas lipídicas o a lo largo de las regiones acuosas estrechas que están asociadas con grupos polares de los lípidos de membrana.

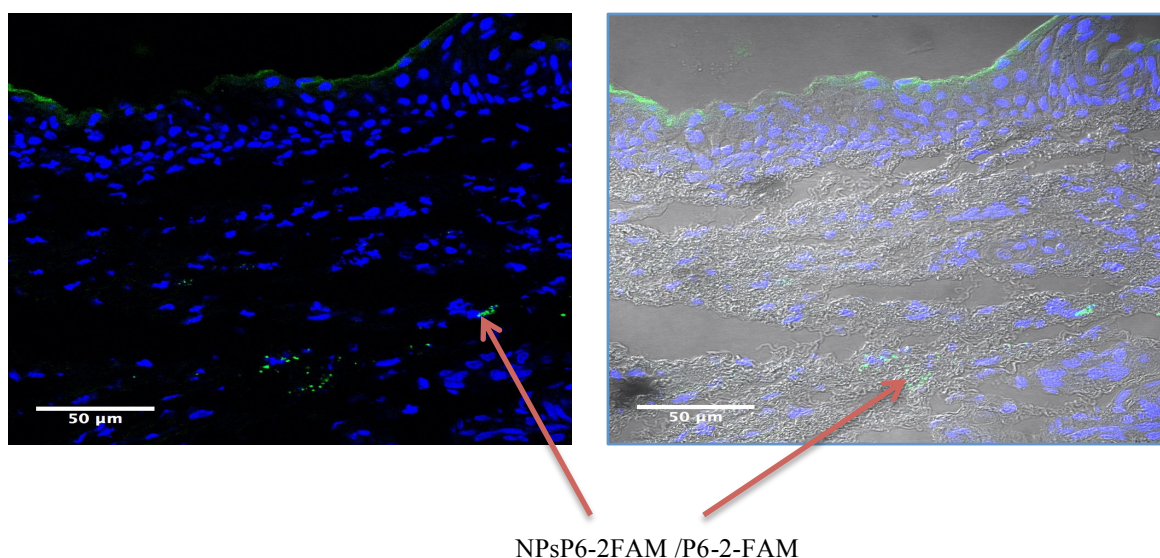


Figura 29. Imágenes de microscopía confocal de la mucosa vaginal de cerdo (ex vivo).

Las imágenes fueron adquiridas después del tratamiento con NPsP6-2-FAM. La señal emitida por las NPsP6-2-FAM/P6-2-FAM se localiza en la capa superior del epitelio (verde). Los núcleos teñidos con DRAQ5 (azul). Las imágenes de fluorescencia (columna izquierda) y sus respectivas imágenes de interferencia diferencial de contraste (DIC) (columna derecha) se adquirieron a 63X.

### 4.5. ESTUDIOS *IN VIVO*

Las características histofiológicas de la mucosa y las propiedades fisicoquímicas de los fármacos son los factores más importantes que determinan la permeación a través de la mucosa. El epitelio vaginal está revestido por un fluido viscoelástico acuoso (moco), que actúa como protección contra los agentes patógenos y los agentes externos. El moco puede ayudar a los fármacos a alcanzar el epitelio o a eliminarlos del sitio de acción.

(182). El moco está compuesto principalmente de glicoproteínas como la mucina, el agua y lactobacilos y se considera un impedimento estérico para biomoléculas (183).

### 4.5.1. Evaluación de la permeación de NPsE1P47

Uno de los aspectos con mayor relevancia en este estudio fue el desarrollo de NPs con propiedades de mucoadherencia. Para alcanzar este objetivo las NPs se recubrieron con GC, un biopolímero de origen natural y de bajo peso molecular y con propiedades de mucoadhesividad. Dicho recubrimiento aportó a las NPs una carga positiva superficial y gracias a sus propiedades de bioadhesividad, las NPs pueden interpenetrarse con las cadenas de mucina lo suficientemente fuerte como para crear una adhesividad semi-permanente (124).

Los resultados obtenidos de las permeaciones *in vivo* demostraron que las NPsE1P47 interactuaron con mayor facilidad con la malla de moco, alcanzando el epitelio vaginal en comparación con el péptido no formulado. La Qr de E1P47 detectado después de la exposición de las NPsE1P47 fue mayor que el Qr del E1P47 no formulado (Tabla 27). Esto indica que la presencia de diversas enzimas en el moco tales como las deshidrogenasas succínicas y lácticas, las fosfatasas ácidas y alcalinas, la  $\beta$ -glucuronidasa, la fosfoamidasa y las esterases pueden ser responsables de la degradación del péptido no formulado y su incapacidad para alcanzar el epitelio.

Tabla 27. Valores de Qr de E1P47 formulado y liberado de NPs (*in vivo*)

	<b>Qr <math>\mu\text{g} / (\text{g}\cdot\text{cm}^2) \pm (\text{SD})</math></b>
<b>NPsE1P47</b>	0,700 $\pm$ 0,173
<b>E1P47</b>	0,366 $\pm$ 0,018

La cantidad de E1P47 que se encontró en la mucosa vaginal de los cerdos tratados con el E1P47 no formulado, se atribuye a que el péptido se solubilizó con DMSO y éste se considera un potenciador de permeación (184).

En conjunto, los resultados *in vivo* y *ex vivo* permiten destacar el importante papel que tienen las NPs como un dispositivo efectivo, seguro y protector en las biomoléculas como péptidos.

### 4.5.2. Evaluación de la penetración de NPsP6-2-FAM

Para los estudios de penetración *in vivo*, se eligió el modelo de mucosa vaginal de cerdo porque las características anatómicas y fisiológicas de los cerdos son comparables a las del humano (185), es decir, ambos tejidos consisten en epitelio escamoso estratificado apoyados por el tejido conectivo y la lámina propia; ambos tienen una composición lipídica similar, que es un aspecto importante como barrera de defensa (186).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El NPsP6-2-FAM se aplicaron a lo largo del conducto vaginal y después de 2 y 5 horas los animales se sacrificaron y las vaginas se extrajeron por técnica quirúrgica. La Figura 30 muestra que a las 2 horas después del tratamiento, la señal fluorescente se distribuyó en la capa superficial del epitelio vaginal, sugiriendo que las NPsP6-2-FAM migran a través del moco llegando al epitelio y extendiéndose dentro de las capas epiteliales adyacentes. Sin embargo, a las 5 horas después del tratamiento, el perfil de penetración fue diferente con respecto a las 2 horas. La señal de fluorescencia menos intensa, se localizó en la primera capa epitelial (células planas), lo que sugiere que a las 5 horas, las NPsP6-2-FAM / P6-2-FAM puedan haberse difundido a través del tejido.

El péptido liberado desde las NPs, puede penetrar la mucosa a través de bicapas lipídicas e interactuar con las membranas celulares, aumentando su concentración cerca de los sitios de fusión dentro del espacio intercelular. En ausencia del virus, el péptido podría ser degradado por las enzimas presentes en la mucosa o eliminado por el sistema reticuloendotelial.

Adicionalmente, se observó una cantidad importante de NPsP6-2-FAM/P6-2 captadas por algunas células. Esto implica que posiblemente algunas células tipo Langerhans, que se encuentran distribuidas por todo el epitelio, podrían haber captado las NPsP6-2-FAM o el péptido liberado.

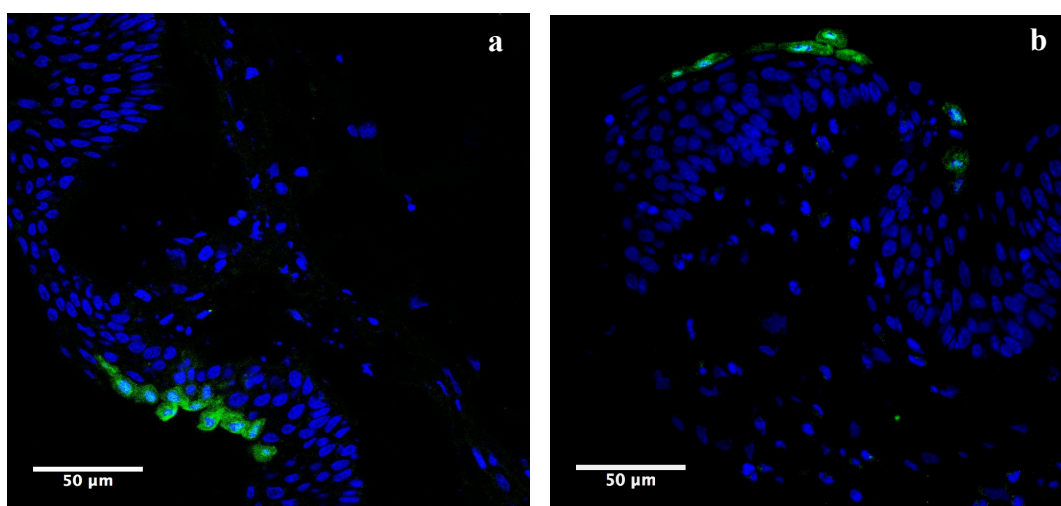


Figura 30. Imágenes de microscopía confocal de mucosas vaginales de cerdo tratadas con NPsP6-2-FAM (estudio *in vivo*).

En la Figura 30a se observa la mucosa después de 2 horas de tratamiento con NPsP6-2-FAM y la Figura 30b derecha se muestra la mucosa después de 5 horas de tratamiento. Las imágenes fueron adquiridas después del

tratamiento con NPsP6-2-FAM. La señal emitida por las NPsP6-2-FAM/P6-2-FAM se localiza en la capa superior del epitelio (verde). Los núcleos teñidos con DRAQ5 (azul). Las imágenes se adquirieron a 63X.

### 4.5.3. Evaluación de la toxicidad *in vivo* de las NPsP6-2-FAM

El objetivo de realizar este estudio, fue determinar el posible daño tisular o los efectos inflamatorios causados por la exposición prolongada de las GC-PLGA-NPs, en este caso cargadas con P6-2-FAM. Los análisis histológicos se han utilizado ampliamente como una herramienta para evaluar la toxicidad después de la aplicación vaginal de microbicidas. La pérdida de la estructura y la presencia de infiltrados inflamatorios en la lámina propia se han considerado como un problema de citotoxicidad relacionada con la exposición sostenida a los fármacos (187,188).

Para determinar el daño, la inflamación o el desprendimiento epitelial de la capa superior, causado por NPsP6-2-FAM o sus productos de degradación, varios cortes de mucosa se evaluaron mediante microscopía. La evaluación se realizó comparando el número de capas epiteliales en mucosas no tratadas con el número de capas epiteliales en la mucosa tratada con NPsP6-2-FAM. En todos los cortes observados, el número de capas epiteliales después de la administración fue el mismo que el número de capas epiteliales en la mucosa no tratada (n = 10). Los resultados mostraron que no había anomalías histopatológicas aparentes; infiltración de leucocitos a la lámina propia o lesiones epiteliales relacionadas con el tratamiento con NPsP6-2-FAM. La Figura 31 muestra una mucosa conservada con un epitelio multicapa seguido de tejido conectivo. Estas observaciones indicaron la seguridad NPsP6-2-FAM administrados en la mucosa vaginal.

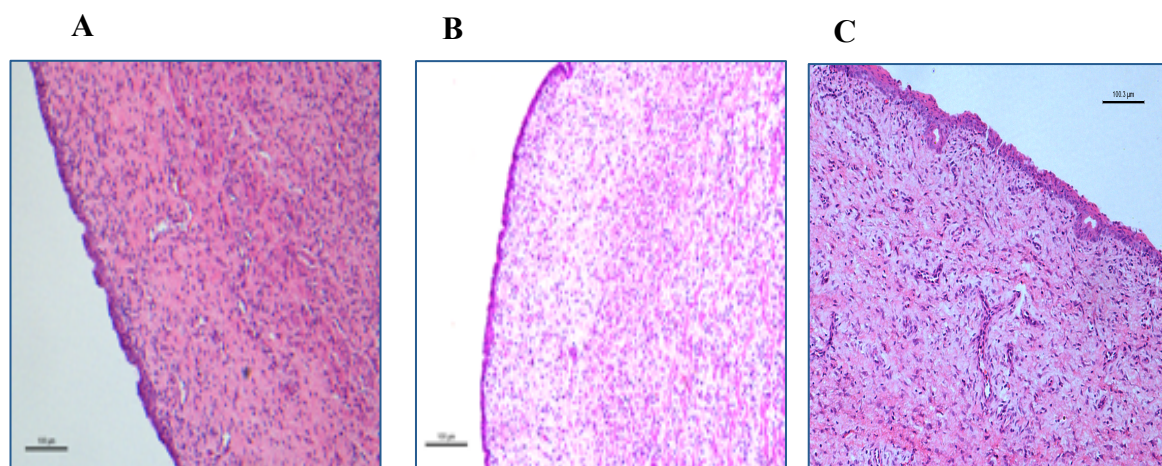


Figura 31. Cortes histopatológicos de mucosas tratadas con NPsP6-2-FAM. (A) mucosa no tratada, (B) mucosa tratada por 2 horas, (C) mucosa tratada por 5 horas. Las imágenes fueron adquiridas a 100 X.







## **5. DISCUSIÓN GENERAL**





## 5. DISCUSIÓN GENERAL

---

Durante casi tres décadas todos los estudios relacionados con la erradicación del VIH-1 se han centrado en el desarrollo de vacunas; aunque las expectativas a la espera de buenos resultados son altas, la inminente necesidad de detener la expansión del virus ha llevado a varios grupos a direccionar sus investigaciones hacia la utilización de las herramientas actualmente existentes, y emplearlas en la prevención de la transmisión, como una nueva estrategia en el tratamiento contra el VIH. Herramientas tales como el uso de antirretrovirales (ATR), han sido pioneras en el desarrollo de la idea de la prevención como tratamiento. En un estudio realizado en parejas de individuos sanos, portadores del VIH y que fueron sometidos a terapia temprana con ATR, demostró una importante disminución de la transmisión del virus (96 %) en comparación con individuos que tuvieron un tratamiento tardío (189). Esto se debe a que el tratamiento ATR reduce el número de copias virales activas en el organismo de los individuos infectados, ya que los ATR están diseñados para bloquear la replicación del virus y posterior expansión del virus. Con lo cual, una terapia regular y controlada del VIH da como resultado menos copias virales en sangre.

La terapia con ATR se centra en la interrupción de las diferentes etapas del ciclo de replicación del VIH en la célula diana. Dichas etapas incluyen la unión viral, la transcripción inversa, la integración en el genoma de la célula huésped, el procesamiento de proteínas y la maduración viral. Aunque la terapia ATR ha tenido un alto impacto en la reducción de la tasa de transmisión, a causa del frecuente abandono del tratamiento por parte de los pacientes que se ven afectados por las frecuencia y las molestias asociadas a la administración de los fármacos, se han generado cepas multiresistentes, con lo cual emergen cepas más virulentas y menos sensibles al tratamiento.

Sin embargo, como una alternativa a este problema, en la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos, IQAC-CSIC durante varios años, se ha venido desarrollando una nueva estrategia de lucha contra el HIV basado en la síntesis de péptidos derivados de las proteínas de envoltura, E1 y E2 del virus del GB-C. Este virus, lleva a cabo una regulación negativa del VIH, particularmente en la fusión del virus a la célula huésped. Se ha descrito, que la co-infección de ambos virus, particularmente en individuos con infección crónica por VIH, la tasa de supervivencia es mayor comparada con la tasa de supervivencia de pacientes VIH no co-infectados con el GB-C (190). Los mecanismos exactos mediante los cuales el GB-C es capaz de intervenir con la progresión del VIH a SIDA no son completamente conocidos, pero hallazgos realizados por el grupo demuestran que las proteínas de envoltura del GB-C tienen un importante papel en la inhibición de los primeros pasos de la fusión y entrada del VIH a la célula huésped (55,66,191,192).

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

---

La fusión y entrada del virus a la célula está mediada por la unión de la glicoproteína de envoltura gp120, al receptor de las células T CD4+, que posteriormente sufre cambios conformacionales de estructura que permiten que la región variable V3 del VIH en gp120 se una con los correceptores de quimosina; dependiendo del subtipo viral puede unirse ya sea a CCR5 o CXCR4. En base a dicho mecanismo, la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos, IQAC-CSIC, así como otros grupos de investigación, han sintetizado diferentes secuencias peptídicas derivadas de las proteínas E1 y E2 y evaluando su actividad anti-VIH. De estos estudios, dos potentes péptidos se han descrito y caracterizado su mecanismo de acción *in vitro*.

De la proteína E2, la secuencia peptídica que abarca la región que va desde el aa 45 al aa 64 del extremo N-terminal (P6-2), fue sintetizado y su actividad anti-VIH fue evaluada en diferente cepas. Los resultados demostraron con solo 4  $\mu$ M de P6-2 fue suficiente para inhibir el 50% de la replicación viral en células TZM-bl. Particularmente P6-2 contiene tres residuos de cisteína, que fueron substituidos por residuos de serina; dicha substitución disminuyó la capacidad inhibitoria del péptido. Esto sugirió que la formación de dímeros intermoleculares así o de oligómeros pueden ser un requisito imprescindible en la actividad anti-VIH de P6-2 (193).

En esta línea, Gomara et al, (67) describieron una secuencia peptídica derivada de la proteína E1, dicha secuencia que abarca desde el aa 139 al aa 156, denominada como E1P47, ha demostrado tener una actividad inhibitoria similar a la de péptidos que ya están en fase clínica como lo es VIR576. La actividad inhibitoria de E1P47 fue probada en un panel de virus del VIH de diferentes clades, contruidos mediante la substitución de la secuencia Env del VIH-1 NL4-3, con las secuencias de Env de los diferentes subtipos (A, B, C, D y AE), los resultados obtenidos indicaron que la envoltura viral determinó la actividad inhibitoria de E1P47. A diferencia de otros péptidos inhibidores de la fusión, que están dirigidos específicamente a las regiones repetidas HR del extremo N-terminal en gp41; E1P47 ha mostrado su actividad inhibitoria, interaccionando con el FP (péptido de fusión) en gp41, previniendo así su inserción en la célula diana.

En base a los hallazgos relacionados con los péptidos descritos, La Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos, IQAC-CSIC en colaboración con el Departamento de Tecnología Terapéutica y Físico Química de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona; han venido realizando diferentes acercamientos en el diseño de sistemas de liberación controlada, utilizadas como herramientas de transporte, protección y liberación de dichos péptidos en tejidos susceptibles a la infección por VIH-1. Como parte de dichas investigaciones, se generó el diseño y desarrollo del trabajo doctoral que se describe en este libro.

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

---

Como se ha descrito a lo largo de este texto, el principal objetivo de la presente investigación fue diseñar, desarrollar y optimizar NPs poliméricas para incorporar los péptidos P6-2 y E1P47, transportarlos y liberarlos en un modelo de mucosa vaginal. Se escogió la mucosa vaginal, por ser una de las puertas de entrada del VIH, adicionalmente la anatomía vaginal permite utilizar métodos de administración que favorecen la permanencia y residencia de los inhibidores, además la frecuencia de administración se reduce significativamente en comparación con las administraciones parenterales. Este último aspecto es de gran importancia, ya que los mayores fracasos en el tratamiento del VIH se relacionan con la resistencia viral a los fármacos, generada en muchos de los casos por el incumplimiento del régimen antirretroviral o el abandono del mismo, como consecuencia de las molestias que ocasiona en los pacientes, las repetidas administraciones parenterales de los fármacos.

En los últimos 10 años, las NPs se han utilizado como una alternativa en el desarrollo de las nuevas estrategias en la prevención y erradicación del VIH. Los antirretrovirales (ATR) fueron los primeros fármacos incorporados en NPs como un nuevo modelo de microbicidas anti-VIH. En este sentido, el Tenofovir ha sido el más utilizado para este propósito. Alukda et al., (194) diseñaron NPs lipídicas sólidas funcionalizadas con polilisina heparina como una plantilla de administración vaginal de Tenofovir para la prevención del VIH. La formulación fue optimizada usando un diseño factorial, mediante el cual se analizaron la influencia de tres factores. En dicho estudio, el modelo estadístico aplicado definió el tamaño de partícula como la variable más significativamente afectada por los factores seleccionados. Posteriormente Meng et al., (133) describió el diseño y optimización de NPs de Chitosan cargadas con Tenofovir, en este caso se evaluó la capacidad de mucoadhesión al tejido vaginal porcino. En este estudio se puso de relieve que NPs con tamaños entre 100 y 200 nm se adhieren con mayor facilidad al epitelio vaginal que NPs con tamaños mayores a 500 nm, sin embargo el EE% de las NPs pequeñas fue inferior al 10 %.

En los dos estudios mencionados, tanto el tamaño de partícula como el EE% fueron optimizados utilizando para ello un diseño factorial con un mínimo de experimentos, y así como en el presente estudio, fueron elegidos tres factores que afectan las propiedades fisicoquímicas de las NPs. La selección de los factores en cada caso se llevó a cabo de acuerdo con el método de fabricación y la composición de las NPs.

Para el desarrollo de la presente Tesis, las NPs se fabricaron utilizando el método de la doble emulsión (W/O/W), en el cual, la composición de la fase interna acuosa tuvo un papel relevante en la eficiencia de encapsulación. Para obtener una fase acuosa interna adecuada, es importante tener en cuenta que las gotas de la



fase interna acuosa pueden coalescer provocando una estructura “núcleo estructura”, que posteriormente puede coalescer con la superficie liberando el contenido a la fase externa acuosa. Por lo tanto es importante obtener una primera emulsión estable ( $W_1/O$ ). De acuerdo con la literatura, la estabilización de la primera emulsión se puede obtener utilizando surfactantes, con un balance hidrofóbico/hidrofílico bajo (HLB), estos surfactante son óptimos para estabilizar las gotas de la fase interna acuosa porque residen en la fase oleosa impidiendo la ruptura de las gotas de agua. Otro factor importante a tener en cuenta es que en la segunda etapa de emulsificación ( $W/O/W$ ), la fase interna acuosa se puede perder en la fase externa, ya que el rompimiento de la fase oleosa es inevitablemente y esto implica la exposición de la fase interna acuosa a la fase externa acuosa. La coalescencia de la fase externa acuosa se puede evitar mediante el uso de surfactantes hidrofílicos como el poly-vinyl alcohol (PVA), estos polímero residen solamente en la fase acuosa y en la interfase oleosa (195).

Ham et al., (129) desarrollaron NPs poliméricas incorporando un análogo peptídico de PSC-RANTES, citoquina que biológicamente actúa como ligando natural de los co-receptores CCR5. En dicho estudio, los autores utilizan el método de la doble emulsión para encapsular el análogo y emplean como surfactante PVA, tanto en la fase interna como en la fase externa acuosa. Las NPs de PSC-RANTES tuvieron tamaños entre 230 y 250 nm y una eficiencia de encapsulación de 82,23 %.

Por otro lado, Silva et al., (146) hacen énfasis en la optimización de la fase interna acuosa para incrementar la carga de las NPs con un péptido con propiedades anti-tumorales. Los autores probaron diferentes composiciones de la fase interna acuosa y seleccionaron la composición que mejoró el EE % del 1 % al 38 %, dicha composición se basó en la presencia sales que mantuvieran la suspensión con un pH básico (8,0).

Para el presente trabajo, tanto la cantidad de surfactante como la composición de la fase interna acuosa fueron los aspectos más importantes en el desarrollo de las GC-PLGA-NPs. Así como Silva et al., la fase interna acuosa fue optimizada previo al diseño factorial. Para la incorporación de E1P47 y P6-2 en las GC-PLGA-NPs, la presencia de sales a una concentración adecuada (50mM) mejoraron el EE % y las cantidades de PVA y GC usadas mejoraron tanto el tamaño como la carga superficial, otorgándole a la formulación optimizada propiedades de bioadhesividad y mucoadherencia

Los estudios de liberación in vitro de péptidos desde sistemas nanoparticulados es un tema que genera controversia, ya que el método por elección para definir el perfil de liberación de péptidos o proteínas es el método de la separación por centrifugación. Este método evita que péptidos o proteínas puedan adherirse a la membrana de diálisis y limitar así su paso hacia el medio receptor. Desafortunadamente, este método tiene

mayores inconvenientes con respecto a la diálisis, entre ellos es la constante manipulación de la muestra lo que genera detecciones erróneas, mientras que en el método de diálisis, la muestra no tiene que ser separada de los productos de degradación y puede ser analizada directamente. Independientemente del método que se use para cuantificar el péptido liberado, la detección y cuantificación de estas moléculas está asociado a problemas de adsorción a los materiales usados, a las pipetas y al mismo sistema de HPLC, lo que resulta en una respuesta insuficiente y en una correlación no lineal. Los problemas de adsorción son más críticos cuando se trabaja con concentraciones bajas de péptido especialmente en soluciones acuosas. Es recomendable utilizar agentes como tensoactivos para reducir la adsorción del péptido a las superficies (196). Para efectos de realizar unas detecciones que garantizaran la trazabilidad de los ensayos, se usó en el caso de P6-2 un agente reductor que minimizó la formación de oligómeros. También fue necesario en los ensayos de diálisis limitar el tiempo de los ensayos a 10 horas para P6-2 y a 24 horas para E1P47. En un análisis objetivo de los perfiles de liberación de P6-2 y E1P47, se puede destacar que las determinaciones se realizaron de manera inequívoca, también se debe tener en cuenta que la liberación desde un medio amortiguador no es comparable con la liberación que se puede llevar a cabo en un sistema metabólicamente activo como son las mucosas. Por lo tanto, los perfiles obtenidos nos permitieron no solo confirmar la liberación del péptido desde las NPs sino que además nos permitió hacer un acercamiento de cómo se realizaría la liberación del péptido en el tejido blanco.

Los estudios *in vitro* para evaluar la capacidad de las NPs para atravesar membranas así como la potencial nanotoxicidad. Respecto a la nanotoxicidad, tres mecanismos pueden ocurrir: 1) alteración física de las estructuras biológicas; (2) procesos de transferencia de electrones o de reacciones de óxido-reducción (3) por elementos tóxicos derivados de la disolución de una nanopartícula (197).

La superficie de las NPs poliméricas determinan su interacción tanto con las membranas biológicas como con los modelos lipídicos de membrana. En cuanto a los modelos de membrana, estos son sistemas simplificados en los que casi todos los parámetros físicos y químicos son controlables, estos sistemas son particularmente interesantes para evaluar la fijación de las NPs a la membrana y su posterior ruptura (198). Por otro lado mediante los estudios *in vitro* con cultivos celulares se puede determinar la efectiva interacción de las NPs con la membrana celular antes de la captación. Diversos estudios enfocan sus esfuerzos en determinar los mecanismos mediante los cuales las células son capaces de captar NPs hacia su interior.

Weissleder et al., (199) desarrollaron NPs modificadas en su superficie con el fin de dilucidar si dichas modificaciones podían incrementar la afinidad de unión específica y revelar nuevas propiedades biológicas de

los nanomateriales utilizados, los resultados demostraron que las pequeñas moléculas utilizadas para llevar a cabo modificaciones superficiales de las NPs tuvieron una alta especificidad por las células endoteliales, macrófagos activados y células derivadas de cáncer de páncreas. Musyanovych et al.,(83) diseñaron NPs con diferentes tipos de polímeros, entre ellos Policaprolactona (PLC), PLLA y PLGA, en dichas NPs se incorporó un marcador fluorescente hidrofílico para evaluar la eficiencia de retención y la difusión de las NPs. En el estudio se emplearon células Jurkat y HeLa. En los resultados de la cinética de captación revelaron que las NPs de PLLA y PLC fueron endocitadas mucho más rápido que las NPs de PLGA

La cuantificación de la captación celular de NPs es otro importante aspecto a valorar respecto a la capacidad de las NPs para atravesar barreras biológicas, así mismo es también importante evaluar el destino de las NPs en los tejidos, con el propósito de aumentar la administración de fármacos a través de estos nanovectores y además de diseñar NPs más seguras, ya que este último aspecto no es simplemente una cuestión de propiedades fisico-químicas que influyen los mecanismos que llevan a la captación (200).

También es importante caracterizar la captación de las NPs para comprender los mecanismos de nanotoxicidad, sin embargo, la captación real de las NPs sigue siendo un aspecto difícil de evaluar, debido a que las NPs adheridas y las captadas no son fácilmente diferenciables. Para superar este inconveniente, Vranic et al., (156) usaron dos enfoques para distinguir las NPs fluorescentes adheridas de las internalizadas. Uno de ellos fue mediante el uso del colorante azul de tripano que apaga la señal fluorescente y el otro fue el análisis de las NPs fluorescente internalizadas usando citometría de flujo por imágenes. Esta técnica permite definir el interior de la célula para estudiar con precisión la captación de las NPs y descifrar la vía endocítica implicada en la adsorción y captación de las NPs.

Teniendo en cuenta los estudios mencionados y otras experiencias, nosotros utilizamos la citometría de flujo como una herramienta para determinar la captación de las NPsE1P47-FAM por células HeLa que expresan la proteína de envoltura del VIH (Env-VIH). Desde este enfoque, pudimos examinar la nanotoxicidad y discriminar aquellas NPs adheridas de las internalizadas. Para el desarrollo de este estudio, el poder profundizar en aspectos como la posible afinidad que pudieran tener las GC-PLGA-NPs hacia Env-VIH, fue importante para de alguna manera poder entrever el posible comportamiento de la formulación en el epitelio vaginal y así de manera objetiva determinar si el propósito para el cual fueron diseñadas las NPs es alcanzable.

En primera instancia es importante mencionar que las características fisico-químicas como tamaño y carga fueron manipuladas para obtener NPs con rangos de tamaño que pudieran atravesar la malla de proteínas

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

---

presentes en el moco que recubre el epitelio vaginal, además realizamos una pequeña modificación de la superficie de las NPs cubriéndolas con un polímero por naturaleza mucoadherente como lo es el GC, que además de otorgarles una carga positiva, reduce sustancialmente el perfil de toxicidad. Además, los estudios fueron realizados por diferentes periodos de tiempo desde 1 hasta 24 horas, teniendo en cuenta que el máximo de tiempo en el que se puede realizar un estudio *ex vivo* con mucosas vaginales no puede ser mayor a 6 horas.

Nosotros observamos que después de 4 horas de incubación de las HeLa-Env con las NPsE1P47-FAM, aproximadamente el 50 % de ellas estaba adherida a la superficie y el 50 % se encontraban internalizadas, también determinamos que después de 6 horas de incubación, las NPsE1P47-FAM fueron citotóxicas, con lo cual ensayos *in vivo* por más de 5 horas no son apropiados, ya que podrían dar falsos resultados.

Con respecto a afinidad que las NPsE1P47-FAM pudieran tener hacia Env-VIH, es muy posible, ya que se debe tener en cuenta que la interacción entre NPs y membranas está gobernada por un microambiente formado por proteínas; como es bien sabido que en medios biológicos, las NPs son inicialmente rodeadas por una corona de proteínas que dependiendo de su afinidad pueden determinar si las NPs pueden cruzar las membranas o no, con lo cual el hecho que la Env-VIH pueda tener cierta afinidad hacia las NPsE1P47-FAM no es una idea que se pueda descartar (201).

Algunas de las estrategias de lucha contra la expansión del VIH se han direccionado hacia el desarrollo de microbicidas vaginales. La interacción de nanotransportadores con el moco cervical es de suma importancia, porque el moco puede ser considerado como un medio para mejorar la residencia y potencial biodisponibilidad. Sin embargo, también plantea una importante barrera que tiene que ser superada para permitir que vectores como las NPs alcancen el revestimiento epitelial subyacentes y penetren el tejido mucoso. En el caso que se plantea en este trabajo, el superar el fluido cervicovaginal es una condición esencial para liberación vaginal de los péptidos inhibidores de la fusión del VIH, en primera medida, los nanotransportadores deben ser retenidos en el moco para evitar fugas vaginales y posteriormente migrar a través del moco hacia la superficie de la mucosa. Para lograr alcanzar estos objetivos, es necesario utilizar en el desarrollo de las NPs, polímeros que posean características de adherencia y mucoadhesividad y optimizar los tamaños a rangos no superiores de 500 nm, que les permita atravesar la malla de proteínas presentes en el moco. Contando con estas premisas, nosotros desarrollamos las NPs poliméricas con tamaños entre 285 y 326 nm, recubiertas con GC para mejorar su residencia e interacción con la malla de mucina propia del moco cervical.

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

---

Los principales acercamientos hacia la prevención del VIH se han realizado usando explantes de mucosa de animales, así mismo el modelo animal se ha definido como el modelo elegido para valorar la habilidad de diferentes nanovectores, de alcanzar el epitelio vaginal. Das Neves et al., (202) reportaron que NPs de poly( $\epsilon$ -policaprolactona) (PLC) cargadas con Dapivirina, podían mejorar la actividad antiviral y reducir la toxicidad del fármaco. Posteriormente (134), los mismos autores describieron la preparación y caracterización de NPs de PLC cargadas con el mismo ATR y evaluaron su influencia en la penetración y retención de Dapivirine en modelos celulares de monocapa derivados de la mucosa cervical y rectal. Los autores probaron NPs de poly( $\epsilon$ -policaprolactona) (PLC) revestidas con poly (etileno-oxido) (PEO), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y lauril sulfato de sodio (SDS). Las NPs revestidos con PEO se mostraron capaces de reducir la permeabilidad a través de las monocapas / tejidos, mientras que la modificación de nanosistemas con CTAB mejoraron el transporte. En el caso de recubrimiento NPs con SLS, la permeabilidad a la Dapivirina no presente cambios. Todos los NPs aumentaron la retención de fármaco en la monocapa / tejido en comparación con la dapivirina no formulada. Siguiendo en la misma línea, Cuhna-Reis et al., (203) desarrollaron un nuevo sistema de liberación intravaginal que comprendió la incorporación de NPs cargadas con dos diferentes ATR (Tenofovir,TFV y Efavirenz, EFV), en una base de película polimérica o film. Las NPs de PLGA libres y en film fueron caracterizadas y evaluadas tanto su distribución genital, farmacocinética local y sistémica de 24 horas, así como su seguridad tras la administración en un modelo murino. Las NPs en film, fueron capaces de aumentar las concentraciones de EFV, mostrando valores 10 veces más altos que el fármaco libre; mientras que la exposición sistémica de ambos fármacos fue más baja que la exposición a los fármacos libres. Así mismo, se comprobó que las NPs en film eran seguras a la administración vaginal una vez al día, sin presentar cambios histológicos genitales significativos.

Como se puede apreciar, las NPs poliméricas administradas intravaginalmente son una propuesta prometedora en la prevención del VIH. Siguiendo con la idea de los autores, nosotros hemos querido incorporar en las GC-PLGA-NPs los péptidos inhibidores de la fusión, como una nueva estrategia de prevención. Hasta el momento, no se sabe de otros estudios similares al desarrollado en este trabajo, plantándose este como una idea innovadora y de alto impacto en el control de la infección por VIH.

Los estudios tanto *ex vivo* como *in vivo* llevados a cabo con péptidos incorporados en las GC-PLGA-NPs y los péptidos no formulados dejan entrever, que las propiedades fisicoquímicas de las GC-PLGA-NPs, así como su revestimiento otorgaron a la formulación capacidad para interactuar con el moco cervicovaginal y alcanzar la capa más superficial de la mucosa vaginal. Por otro lado, valorando los niveles retenidos en la mucosa vaginal

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

---

de cada uno de los péptidos usados en este estudio, tanto en su forma formulada como no formulada, nos permite postular que la naturaleza anfifílica y la estructura propia de cada molécula pueden modular tanto su permeación como su penetración. Al comparar los resultados obtenidos de las permeaciones *ex vivo* de NPsP6-2 con los estudios *ex vivo* de NPsE1P47, se puede inferir que la estructura de P6-2, particularmente la presencia estratégica de cisteínas hacen que el péptido adquiera conformaciones cíclicas debido a la formación de oligómeros o dímeros intermoleculares provocando que el péptido se quede retenido en las capas más superficiales debido posiblemente a la interacción con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana, con lo cual la permeación hacia la submucosa y posible exposición sistémica sea casi imperceptible. En contraste con lo ocurrido con las NPsE1P47. En condiciones formuladas y no formuladas el péptido pudo permear hasta alcanzar la submucosa y atravesarla, pudiendo valorarse su presencia en el medio receptor, esto nos indica que el péptido puede permear con mayor facilidad, sin embargo la cantidad retenida del péptido no formulado fue mayor a la cantidad del péptido formulado, este comportamiento se atribuye a que las NPs liberan el péptido de manera sostenida y controlada, mientras que en condiciones no formuladas, existe una mayor cantidad de moléculas que interactúan a la vez con la mucosa, reteniendo mayor cantidad de péptido. Controversialmente, en los estudios *in vivo*, se encontró mayor cantidad de E1P47 formulado que no formulado, esto se atribuyó a que el péptido no formulado fue degradado por las enzimas presentes en el moco mientras que el péptido formulado pudo alcanzar el epitelio e interactuar con los espacios intercelulares.

Este trabajo plantea un primer acercamiento en el desarrollo de nanosistemas como vectores de péptidos inhibidores de la fusión del VIH y su liberación en tejidos susceptibles a la infección como lo es la mucosa vaginal. Sería interesante explorar nuevas plataformas para la incorporación de estas prometedoras moléculas o de las mismas NPs cargadas con los péptidos y optimizar nuevos sistemas de estudios *in vivo-ex vivo* que permitan evaluar no sólo la capacidad de permeación y penetración de los vectores sino además evaluar la eficacia de los mismos.







## **6. CONCLUSIONES**





- Los péptidos lineales P6-2 y E1P47 y sus derivatizados fluorescentes, fueron sintetizados con éxito siguiendo la metodología de síntesis en fase sólida (SPPS), empleando la estrategia Fmoc/tBu. La caracterización analítica por RP-HPLC y espectrometría de masas, confirmó que los péptidos sintetizados correspondieron a las secuencias deseadas.
- Tanto las modificaciones realizadas al método de la doble emulsión, como la selección de los factores más relevantes empleados para el diseño y fabricación de las GC-PLGA-NPs, fueron los aspectos más importantes en el desarrollo de NPs con propiedades fisicoquímicas y morfológicas, óptimas para la encapsulación y liberación de los péptidos sintéticos utilizados para este estudio. Los estudios de interacción péptido-polímero pusieron de relieve que las NPs de GC-PLGA- optimizadas, no mostraron interacciones entre componentes ni daños en la estructura del péptido encapsulado como consecuencia del método de fabricación.
- Los métodos utilizados para cuantificar el péptido tanto encapsulado como liberado fueron lineales, precisos y exactos.
- La carga superficial, así como las características de mucoadhesividad de las GC-PLGA-NPs fueron cruciales para la interacción con las membranas celulares y su posterior captación por las células. Esto fue indicativo de la capacidad de las GC-PLGA-NPs para atravesar barreras biológicas.
- Los estudios de permeación *ex vivo* y penetración pusieron de relieve que las GC-PLGA-NPs, cargadas con P6-FAM, son capaces de atravesar la barrera que recubre la mucosa vaginal y alcanzar la capa más superior del epitelio, difundándose a la capa subyacente, mediante un mecanismo de difusión pasiva, liberando el péptido inhibidor de la fusión del VIH, en el lugar donde se inicia la propagación del virus.
- Las GC-PLGA-NPs protegen de la degradación enzimática y de las modificaciones que pueden sufrir los péptidos a causa de los componentes del fluido vaginal. Así mismo, no producen irritaciones ó inflamaciones del epitelio vaginal, en este sentido, se consideran sistemas seguros.
- Por las propiedades fisicoquímicas, morfológicas, de bioadherencia y por la ausencia de toxicidad las GC-PLGA-NPs pueden considerarse como una plataforma útil para el desarrollo de un microbicida anti-VIH.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**









1. Zanetti AR, Tanzi E, Romano L, Galli C. GBV-C/HGV: a new human hepatitis-related virus. *Res Virol.* 1997;148(2):119–22.
2. Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med.* 1995;1(6):546–51.
3. Maidana Giret MT, Kallas EG. GBV-C: State of the art and future prospects. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2012;9(1):26–33.
4. Van der Bij AK, Kloosterboer N, Prins M, Boeser-Nunnink B, Geskus RB, Lange JM, et al. GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: The Amsterdam Cohort Study. *J Infect Dis* [Internet]. 2005;191(5):678–85. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15688280](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15688280)
5. Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepat* [Internet]. 2009;16(11):757–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2893.2009.01194.x>
6. Kim JP, Fry KE. Molecular characterization of the hepatitis G virus. *J Viral Hepat* [Internet]. 1997;4(2):77–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9097262>
7. Reshetnyak VI, Karlovich TI, Ilchenko LU. Hepatitis G virus. *World J Gastroenterol.* 2008;14(30):4725–34.
8. Sathar MA, Soni PN, York D. GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV): Still looking for a disease. *Int J Exp Pathol.* 2000;81(5):305–22.
9. Linnen J, WJ J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science.* 1996;271:505–8.
10. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Wai-Kuo J, et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *A New Engl J Med.* 1997;747–54.
11. Slimane, Albrecht, Fang, Goodman, Mizokami, Qian, et al. Clinical, virological and histological implications of GB virus-C/hepatitis G virus infection in patients with chronic hepatitis C virus infection: a multicentre study based on 671 patients. *J Viral Hepat* [Internet]. 2000;7(1):51–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2893.2000.00188.x>
12. Kanda T, Yokosuka O, Ehata T, Maru Y, Imazeki F, Saisho H, et al. Detection of GBV-C RNA in patients with non-A-E fulminant hepatitis by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Hepatology* [Internet]. 1997;25(5):1261–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.510250534>
13. Tameda Y, Kosaka Y, Tagawa S, Takase K, Nakao H, Tsuda F, et al. Infection with GB virus C (GBV-C) in patients with fulminant hepatitis. *J Hepatol.* 1996;25(0146–6615 SB–M):842–7.
14. Fogeda M, Lopez-Alcorocho JM, Bartolome J, Arocena C, Martin MA, Carreno V. Existence of Distinct GB Virus C/Hepatitis G Virus Variants with Different Tropism. *J Virol* [Internet]. 2000;74(17):7936–42. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.74.17.7936-7942.2000>

15. Seipp S, Hofmann WJ, Tax U, Theilmann L, Goeser T. Hepatotropism of GB virus C (GBVC): GBVC replication in human hepatocytes and cells of human hepatoma cell lines. *J Hepatol*. 1999;30(19):570–9.
16. Tucker TJ, Smuts HEM, Eedes C, Knobel GD, Eickhaus P, Robson SC, et al. Evidence That the GBV-C / Hepatitis G Virus Is Primarily a Lymphotropic Virus. *J Med Virol*. 2000;61(September 1999):52–8.
17. Kisiel E, Cortez KC, Pawełczyk A, Ośko IB, Kubisa N, Laskus T, et al. Hepatitis G virus/GBV-C in serum, peripheral blood mononuclear cells and bone marrow in patients with hematological malignancies. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2013;19:195–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713481300275X>
18. Agnello V, Rg Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang Q-X, Lefkowitz RJ. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Pnas*. 1999;96(22):12766–71.
19. Xiang J, Klinzman D, McLinden J, Schmidt WN, LaBrecque DR, Gish R, et al. Characterization of hepatitis G virus (GB-C virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *J Virol* [Internet]. 1998;72(4):2738–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109717&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Meckes DG, Raab-Traub N. Microvesicles and Viral Infection. *J Virol* [Internet]. 2011;85(24):12844–54. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.05853-11>
21. Chivero ET, Bhattarai N, Rydze RT, Winters MA, Holodniy M, Stapleton JT. Human pegivirus RNA is found in multiple blood mononuclear cells in vivo and serum-derived viral RNA-containing particles are infectious in vitro. *J Gen Virol*. 2014;95(PART 6):1307–19.
22. Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*. 2006;87(10):2755–66.
23. Chojnacki J, Grgacic EVL. Enveloped viral fusion: insights into the fusion of hepatitis B viruses. *Future Virol*. 2008;3(6):543–52.
24. Mohr EL, Xiang J, McLinden JH, Kaufman TM, Chang Q, Montefiori DC, et al. GB virus type C envelope protein E2 elicits antibodies that react with a cellular antigen on HIV-1 particles and neutralize diverse HIV-1 isolates. *J Immunol* [Internet]. 2010;185(7):4496–505. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3544363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
25. Prose NS, Cunningham CK. HIV infection. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2015;15060. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201560>
26. Kovarova M, Shanmugasundaram U, Baker CE, Spagnuolo RA, De C, Nixon CC, et al. HIV pre-exposure prophylaxis for women and infants prevents vaginal and oral HIV transmission in a preclinical model of HIV infection. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(11):3185–94.
27. Saphire ACS, Bobardt MD, Zhang Z, Gallay P a, Zhang ZHE, David G. Syndecans Serve as Attachment Receptors for Human Immunodeficiency Virus Type 1 on Macrophages. *J Virol*. 2001;75(19):9187–200.
28. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW, Walker B, Mcmichael A, Wilen CB, et al. HIV : Cell Binding and Entry. *Cold spring Harb Perspect Med*. 2012;2:1–14.
29. Doms RW, Moore JP. HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol* [Internet].

- 2000;151(2):F9-14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11038194><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2192632>
30. Sherer NM, Jin J, Mothes W. Directional Spread of Surface-Associated Retroviruses Regulated by Differential Virus-Cell Interactions. *J Virol* [Internet]. 2010;84(7):3248–58. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02155-09>
  31. Melikyan GB. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* [Internet]. 2008;5(1):111. Available from: <http://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4690-5-111>
  32. Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008;8(6):447–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2302>
  33. Zhang Z-Q, Schuler T, Zupanic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reinhart KA, et al. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4 + T cells. *Sci Rep*. 1999;286(12):1353–7.
  34. Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, et al. Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection , in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. *J Virol*. 2009;83(8):3719–33.
  35. Ronald H, Maria J, Nelson K. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous. *Lancet*. 2001;14:1149–53.
  36. Zhu J, Hladik F, Woodward A, Klock A, Peng T, Johnston C, et al. Persistence of HIV-1 receptor – positive cells after HSV-2 reactivation is a potential mechanism for increased HIV-1 acquisition. *Nat Med*. 2009;15(8):886–93.
  37. McLaren PJ, Ball TB, Wachihi C, Jaoko W, Kelvin DJ, Danesh A, et al. HIV-Exposed Seronegative Commercial Sex Workers Show a Quiescent Phenotype in the CD4 + T Cell Compartment and Reduced Expression of HIV-Dependent Host Factors. *J Infect Dis*. 2010;3(Suppl 3):339–44.
  38. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition : a meta-analysis of published studies. *AIDS*. 2008;22(March):1493–501.
  39. Joseph SB, Swanstrom R, Kashuba ADM, Cohen MS. Bottlenecks in HIV-1 transmission: insights from the study of founder viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(7):414–25.
  40. Boeras DI, Hraber PT, Hurlston M, Evans-strickfaden T, Bhattacharya T, Giorgi EE, et al. Role of donor genital tract HIV-1 diversity in the transmission bottleneck. *PNAS*. 2011;108(15):E1156–63.
  41. Cynthia A, Julie M, John L. Envelope-Constrained Neutralization-Sensitive HIV-1 After Heterosexual Transmission. *Sci Rep*. 2004;303(26):2019–22.
  42. Ping L, Joseph SB, Anderson JA, Abrahams M, Salazar-gonzalez JF, Kincer LP. Comparison of Viral Env Proteins from Acute and Chronic Infections with Subtype C Human Immunodeficiency Virus Type 1 Identifies Differences in Glycosylation and CCR5 Utilization and Suggests a New Strategy for Immunogen Design. *J Virol*. 2013;87(13):7218–33.
  43. Parrish NF, Gao F, Li H, Giorgi EE, Barbian HJ, Parrish EH, et al. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013;110(17):6626–33. Available

from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1304288110>

44. Toyoda H, Fukuda Y, Tetsuo H, Takamatsu J, Hidehiko Saito. effect of GB virus C/Hepatitis G Virus Coinfection on the Course of HIV Infection in Hemophilia Patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology*. 1998;17(3):209–13.
45. Lefrère JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, Lerable J, Thauvin M, et al. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis*. 1999;179(4):783–9.
46. Xiang J, Wünschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med*. 2001;345(10):707–14.
47. Björkman P, Flamholz L, Molnegren V, Marshall A, Güner N, Widell A. Enhanced and resumed GB virus C replication in HIV-1-infected individuals receiving HAART. *AIDS*. 2007;21(12):1641–51.
48. Zhang W, Chaloner K, Tillmann HL, Williams CF, Stapleton JT. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: A meta-analysis. *HIV Med*. 2006;7(3):173–80.
49. Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Kaufman TM, Stapleton JT. An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4<sup>+</sup> Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;1–6.
50. Chang Q, McLinden JH, Stapleton JT, Sathar MA, Xiang J. Expression of GB virus C NS5A protein from genotypes 1, 2, 3 and 5 and a 30 aa NS5A fragment inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in a CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte cell line. *J Gen Virol*. 2007;88(12):3341–6.
51. Hazenberg MD, Stuart JWTC, Otto SA, Borleffs JCC, Boucher CAB, de Boer RJ, et al. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: A longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood*. 2000;95(1):249–55.
52. Jung S, Eichenmüller M, Donhauser N, Neipel F, Engel AM, Hess G, et al. HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. *Aids*. 2002;21(5):645–7.
53. Koedel Y, Eissmann K, Wend H, Fleckenstein B, Reil H. Peptides derived from a distinct region of GB virus C glycoprotein E2 mediate strain-specific HIV-1 entry inhibition. *J Virol*. 2011;85(14):7037–47.
54. Galatola R, Vasconcelos A, Pérez Y, Cruz A, Pujol M, Alsina MA, et al. A cyclic GB virus C derived peptide with anti-HIV-1 activity targets the fusion peptide of HIV-1. *Eur J Med Chem*. 2014;86:589–604.
55. Herrera E, Tenckhoff S, Gómara MJ, Galatola R, Bleda MJ, Gil C, et al. Effect of synthetic peptides belonging to E2 envelope protein of GB virus C on human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Med Chem*. 2010;53(16):6054–63.
56. Jiang S, Lin K, Strick N, Neurath AR. HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature*. 1993;365(6442):113.
57. Matthews TJ, Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, Mcdanal CB. Peptides corresponding to a

- predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(21):9770–4.
58. Jiang S, Siddiqui P, Liu S. Blocking viral entry: A complementary strategy for HIV therapy. *Drug Discov Today Ther Strateg*. 2004;1(4):497–503.
  59. Lazzarin A, Clotet B, Cooper D, Reynes J, Arastéh K, Nelson M, et al. Efficacy of Enfuvirtide in Patients Infected with Drug-Resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* [Internet]. 2003;348(22):2186–95. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa035211>
  60. Greenberg ML, Cammack N. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(2):333–40.
  61. Esté JA. Virus entry as a target for anti-HIV intervention. *Curr Med Chem* [Internet]. 2003;10(17):1617–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871111>
  62. Antimisiaris SG, Mourtas S. Recent advances on anti-HIV vaginal delivery systems development. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;92:123–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.015>
  63. He Y, Xiao Y, Song H, Liang Q, Ju D, Chen X, et al. Design and evaluation of sifuvirtide, a novel HIV-1 fusion inhibitor. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11126–34.
  64. Münch J, Ständker L, Adermann K, Schulz A, Schindler M, Chinnadurai R, et al. Discovery and Optimization of a Natural HIV-1 Entry Inhibitor Targeting the gp41 Fusion Peptide. *Cell*. 2007;129(2):263–75.
  65. Koedel Y, Eissmann K, Wend H, Fleckenstein B, Reil H. Peptides Derived from a Distinct Region of GB Virus C Glycoprotein E2 Mediate Strain-Specific HIV-1 Entry Inhibition □. *J Virol*. 2011;85(14):7037–47.
  66. Fernández L, Chan WC, Egido M, Gómara MJ, Haro I. Synthetic peptides derived from an N-terminal domain of the E2 protein of GB virus C in the study of GBV-C/HIV-1 co-infection. *J Pept Sci*. 2012;18(5):326–35.
  67. Gómara MJ, Sánchez-Merino V, Paús A, Merino-Mansilla A, Gatell JM, Yuste E, et al. Definition of an 18-mer Synthetic Peptide Derived from the GB virus C E1 Protein as a New HIV-1 Entry Inhibitor. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;1860(6):1139–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.008>
  68. K.Jain K. Drug Delivery System [Internet]. Second Edi. K.Jain K, editor. Springer Protocols; 2014. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0363-4>
  69. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;75(1):1–18.
  70. Mohanraj V, Chen Y, Chen M&. Nanoparticles – A Review. *Trop J Pharm Res Trop J Pharm Res* [Internet]. 2006;5(June):561–73. Available from: <http://www.tjpr.freehosting.net>
  71. Díaz A, Katsarava R, Puiggalí J. Synthesis, properties and applications of biodegradable polymers derived from diols and dicarboxylic Acids: From Polyesters to poly(ester amide)s. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):7064–123.
  72. Vert M. Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything†. *Biomacromolecules* [Internet]. 2005;6:538–46. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm0494702>

73. Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour Technol.* 2010;101(22):8493–501.
74. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci.* 2007;32(8–9):762–98.
75. Makadia HK, Steven J Siegel. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *J Polym Sci Part B Polym Phys.* 2011;3(3):1377–97.
76. Narang AS, Boddu SH. Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery. Narang AS, Boddu SH, editors. Springer International Publishing Switzerland; 2015. 333-336 p.
77. Heller J, Barr J, Ng SY, Schwach K, Gurny R. Poly ( ortho esters ): synthesis , characterization , properties and uses. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54:1015–39.
78. Kumar N, Langer RS, Domb AJ. Polyanhydrides : An overview Polyanhydrides : an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(November):889–910.
79. Mitova V, Hristova T, Cherkezova R, Koseva N, Yusa S, Troev K. Polyphosphoester-based paclitaxel complexes. *J Appl Polym.* 2015;42772:1–7.
80. Quintanar-guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017;9045(June):1113–28.
81. Anton N, Benoit J, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates — A review. *J Control Release.* 2008;128:185–99.
82. Bilati U, Allémann E, Doelker E, Doelker E, Bilati U, Alle E. Sonication Parameters for the Preparation of Biodegradable Nanocapsules of Controlled Size by the Double Emulsion Method Sonication Parameters for the Preparation of Biodegradable Nanocapsules of Controlled Size by the Double Emulsion Method. *Pharm Dev Technol.* 2017;7450(June):1–9.
83. Musyanovych A, Schmitz-wienke J, Maila V, Walther P, Landfester K. Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions. *Macromol Biosci.* 2008;8:127–39.
84. Ganachaud F, Katz JL. Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect : Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices. *ChemPhysChem.* 2005;6:209–16.
85. Delie F, Blanco-Príeto MJ. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules.* 2005;10(1):65–80.
86. Hornig S, Heinze T, Becer CR, Schubert US. Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation. *J Mater Chem [Internet].* 2009;19(23):3838. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b906556n>
87. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci.* 2011;36(7):887–913.
88. Lorber B, Fischer F, Bailly M, Roy H, Kern D. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochem Mol Biol Educ.* 2012;40(6):372–82.
89. Li Y, Barron AR. Dynamic Light Scattering. OpenStax-CNX. 2014;m50236:1–13.

90. Gabor F. "Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery" [Internet]. *Scientia Pharmaceutica*. 2011. 701-702 p. Available from: <http://www.scipharm.at/download.asp?id=1043>
91. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM V., Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater* [Internet]. 2009;8(7):543–57. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmat2442>
92. Wang J, Quershi WA, Li Y, Xu J, Nie G. Analytical methods for nano-bio interface interactions. *Sci China Chem*. 2016;59(11):1467–78.
93. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007;104(7):2050–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0608582104>
94. Chung EJ. Targeting and therapeutic peptides in nanomedicine for atherosclerosis. *Exp Biol Med* [Internet]. 2016;241(9):891–8. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370216640940>
95. Crombez L, Morris MC, Deshayes S, Heitz F, Divita G. Peptide-based nanoparticle for ex vivo and in vivo drug delivery. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2008;14(34):3656–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075741>
96. Tan ML, Choong PFM, Dass CR. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*. 2010;31(1):184–93.
97. Liu Y, Chen C. Role of nanotechnology in HIV/AIDS vaccine development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;103:76–89.
98. Banga AK. Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. *Am J Pharm Educ*. 2006;70(4):1–3.
99. Gupta S, Jain A, Chakraborty M, Sahni JK, Ali J, Dang S. Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: a review on recent developments. *Drug Deliv* [Internet]. 2013;20(6):237–46. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2013.819611>
100. Mathias NR, Hussan MA. Non-invasive Systemic Drug Delivery: Developability Considerations for Alternate Routes of Administration. *J Pharm Sci*. 2009;99(1):1–20.
101. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2006;2(2):53–65.
102. Lee ES, Park E, Lee KC. Long-acting inhalable chitosan-coated poly(lactic- co-glycolic acid) nanoparticles containing hydrophobically modified exendin-4 for treating type 2 diabetes. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2975–83.
103. Lundquist P, Artursson P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;106(15):256–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.07.007>
104. Tian X, Li H, Zhang D, Shen J, Jia L, Zheng D, et al. Parenteral nanosuspension of a novel synthesized antitumor candidate: Investigation of tissue biodistributions and plasma pharmacokinetics. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2013;436:868–72.



105. Hu K, Shi Y, Jiang W, Han J, Huang S, Jiang X. Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: Preparation, characterization and efficacy in Parkinsons disease. *Int J Pharm*. 2011;415(1–2):273–83.
106. Huile G, Shuaiqi P, Zhi Y, Shijie C, Chen C, Xinguo J, et al. A cascade targeting strategy for brain neuroglial cells employing nanoparticles modified with angiopep-2 peptide and EGFP-EGF1 protein. *Biomaterials*. 2011;32(33):8669–75.
107. Smyth HD., Hickey AJ. *Controlled Pulmonary Drug Delivery*. Smyth HD., Hickey AJ, editors. Springer; 2011. 5-560 p.
108. Herwadkar A, Banga AK. Peptide and protein transdermal drug delivery. *Drug Discov Today Technol*. 2012;9(2):147–54.
109. Rastogi R, Anand S, Koul V. Electroporation of polymeric nanoparticles: an alternative technique for transdermal delivery of insulin. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2010;36(11):1303–11. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03639041003786193>
110. Patel A, Patel M, Yang X, Mitra AK, City K. Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles. *Protein Pept Lett*. 2014;21(11):1102–20.
111. Schnell JD. *Citología y microbiología de la vagina: atlas y guía resumida para médicos y estudiantes* [Internet]. : Ancora; 1982 [cited 2017 Jun 16]. 89 p. Available from: [http://catalog.ub.edu/record=b1187349~S1\\*cat](http://catalog.ub.edu/record=b1187349~S1*cat)
112. Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, Karck U, Miller L, Zampaglione E. Why consider vaginal drug administration? *Fertil Steril*. 2004;82(1):1–12.
113. Choudhury A, Das S, Kar M. A review on novelty and potentiality of vaginal drug delivery. *Int J PharmTech Res*. 2011;3(2):1033–44.
114. Blaskewicz CD, Pudney J, Anderson DJ. Structure and Function of Intercellular Junctions in Human Cervical and Vaginal Mucosal Epithelia1. *Biol Reprod* [Internet]. 2011;85(1):97–104. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/2530426/Structure>
115. Martinez MN, Amidon GL. A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals. *J Clin Pharmacol* [Internet]. 2002;42(6):620–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1177/00970002042006005>
116. Machado A, Neves J das. Tissue-based in vitro and ex vivo models for dermal permeability studies [Internet]. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies*. 2016. 325-342 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081000946000183>
117. Machado RM, Palmeira-de-Oliveira A, Gaspar C, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015. p. 14–26.
118. Neves J das, Sarmento B. *Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals*. Neves J das, Sarmento B, editors. Springer; 2014. 1-600 p.
119. Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang Y-Y, Cone R, et al. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007;104(5):1482–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0608611104>
120. Farokhzad OC, Langer R. *Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic*

- modalities. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(14):1456–9.
121. Katz DF, Dunmire EN. Cervical mucus. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 1993 Sep [cited 2017 Mar 24];11(3):385–401. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169409X9390017X>
122. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(2):75–85.
123. Khutoryanskiy V V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromol Biosci.* 2011;11(6):748–64.
124. Boddupalli B, Mohammed Z., Nath R, Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010;1(4):381.
125. Derjaguin BV, Toporov YP, Aleinikova IN, Burta-Gapanovitch LN. Investigation on the adhesion of polymer particles to the surface of a semiconductor. *Prog Surf Sci* [Internet]. 1994 Jan [cited 2017 Jun 17];45(1–4):124–30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0079681694900434>
126. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):1556–68.
127. Takeuchi H, Thongborisute J, Matsui Y, Sugihara H, Yamamote H, Kawashima Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2005 Nov 3 [cited 2017 Jun 17];57(11):1583–94. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X05001419>
128. Rohan LC, Sassi AB. Vaginal drug delivery systems for HIV prevention. *AAPS J* [Internet]. 2009;11(1):78–87. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2664883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
129. Anthony S. Ham, Cost MR, Sassi AB, Dezzutti CS, Rohan1 LC. Targeted Delivery of PSC-RANTES for HIV-1 Prevention using Biodegradable Nanoparticles. *Pharm Res.* 2014;26(3):502–11.
130. Das Neves J, Sarmento B. Precise engineering of dapivirine-loaded nanoparticles for the development of anti-HIV vaginal microbicides. *Acta Biomater.* 2015;18:77–87.
131. Lakshmi YS, Kumar P, Kishore G, Bhaskar C, Kondapi AK. Triple combination MPT vaginal microbicide using curcumin and efavirenz loaded lactoferrin nanoparticles. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(1):25479. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep25479>
132. Giri N, Oh B, Lee CH. Stimuli-sensitive nanoparticles for multiple anti-HIV microbicides. *J Nanoparticle Res.* Springer Netherlands; 2016;18(5):1–16.
133. Meng J, Sturgis TF, Youan BBC. Engineering tenofovir loaded chitosan nanoparticles to maximize microbicide mucoadhesion. *Eur J Pharm Sci.* 2011;44(1–2):57–67.
134. Das Neves J, Araújo F, Andrade F, Michiels J, Ariën KK, Vanham G, et al. In vitro and Ex Vivo evaluation of polymeric nanoparticles for vaginal and rectal delivery of the anti-HIV drug dapivirine. *Mol Pharm.* 2013;10(7):2793–807.
135. R. B. Merrifield. Solid Phase Solid Phase Peptide Synthesis. *J Am Chem Soc.* 1963;85(14):2149–54.

136. Kaiser E, Colecott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* [Internet]. 1970 Apr [cited 2017 Jun 18];34(2):595–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269770901466>
137. Thorkild Chritensen. Test for Monitoring Coupling Completeness in Solid-Phase Peptide-Synthesis Using Chloranil. *Acta Chem Scand*. 1979;33:763–6.
138. Hancock WS, Battersby JE. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 Mar [cited 2017 Jun 18];71(1):260–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776900348>
139. Ogawa Y, Yamamoto M, Okada H, Yashiki T, Shimamoto T. A New Technique to Efficiently Entrap Leuprolide Acetate into Microcapsules of Polylactic Acid or Copoly (Lactic/Glycolic) Acid. *Chem Pharm Bull*. 1980;36(3):1095–103.
140. Leardi R. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Anal Chim Acta*. 2009;652(1–2):161–72.
141. Grace Vydac. *The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC*. Third edit. Vydac G, editor. Grace Vydac group; 2002. 1-62 p.
142. Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, et al. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev*. 2003;24(February):3–12.
143. Technologies A. *Espectrometría de masas Fundamentos y Teoría*. Academic&institutional research. 2016. p. 1–43.
144. (ICH) V of AP and MQ. International Conference on Harmonisation. In: (ICH)Harmonised Tripartite Guideline. 2005.
145. Ma H, Shieh K, Qiao TX. Study of Transmission Electron Microscopy ( TEM ) and Scanning Electron Microscopy ( SEM ). *Nat Sci*. 2006;4(3):14–22.
146. Silva AL, Rosalia RA, Sazak A, Carstens MG, Ossendorp F, Oostendorp J, et al. Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles: Low-burst release is crucial for efficient CD8+ T cell activation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;83(3):338–45.
147. Nguyen JT, Inouye H, Baldwin MA, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB, et al. X-ray Diffraction of Scrapie Prion Rods and PrP Peptides. *J Mol Biol* [Internet]. 1995 Sep [cited 2017 Mar 28];252(4):412–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283685705074>
148. Kong Shaoning J. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assign-. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007;39(8):549–59.
149. Mengual O, Meunier G, Cayré I, Puech K, Snabre P. TURBISCAN MA 2000: Multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*. 1999;50(2):445–56.
150. Levy MY, Benita S. Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. *Int J Pharm* [Internet]. 1990 Dec [cited 2017 Jun 20];66(1–3):29–37. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037851739090381D>

151. Moore S, Spackman DH, Stein WH. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal Biochem.* 1958;30(4):1190–206.
152. Cohen SA, Michaud DP. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry.* 1993. p. 279–87.
153. Herzenberg L a L a, Parks D, Sahf B, Perez O, MarioRoederer, Herzenberg L a L a. The History and Future fo the Fluorescence Activated Cell Sorter and FlowCytometry: A View from Stanford. *Clin Chem.* 2002;48:1819–27.
154. Ibuki Y, Toyooka T. Nanotoxicity. 2012;926:157–66. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-002-1>
155. Suzuki H, Toyooka T, Ibuki Y. Simple and Easy Method to Evaluate Uptake Potential of Nanoparticles in Mammalian Cells Using a Flow Cytometric Light Scatter Analysis.pdf. *Environ Sci Technol.* 2007;41(8):3018–24.
156. Vranic S, Boggetto N, Contremoulins V, Mornet S, Reinhardt N, Marano F, et al. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part an Fibre Toxicol.* 2013;10(2):1–16.
157. Chattaraj SC, Swarbrick J, Kanfer I. A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms. *Int J Pharm [Internet].* 1995 Jun [cited 2017 Jun 20];120(1):119–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378517394004266>
158. Amores S, Domenech J, Colom H, Calpena AC, Clares B, Gimeno Á, et al. An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells. *Eur J Pharm Sci.* 2014;60:49–54.
159. Haseman JK, Allen DG, Lipscomb EA, Truax JF, Stokes WS. Using fewer animals to identify chemical eye hazards: Revised criteria necessary to maintain equivalent hazard classification. *Regul Toxicol Pharmacol [Internet].* 2011 Oct [cited 2017 Jun 21];61(1):98–104. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230011001346>
160. Larios C, Min J, Haro I, Alsina MA, Busquets MA. Study of Adsorption and Penetration of E2 ( 279-298 ) Peptide into Langmuir Phospholipid Monolayers. *Langmuir.* 2006;2:23292–9.
161. Larios C, Casas J, Alsina MA, Mestres C, Gómara MJ, Haro I. Characterization of a putative fusogenic sequence in the E2 hepatitis G virus protein. *Arch Biochem Biophys.* 2005;442(2):149–59.
162. Sánchez-martín MJ, Hristova K, Gómara MJ, Haro I, Alsina MA, Busquets MA. Analysis of HIV-1 fusion peptide inhibition by synthetic peptides from E1 protein of GB virus C. *J colloid Interface Sci.* 2011;360:124–31.
163. Gómara MJ, Pérez-Pomeda I, Gatell JM, Sánchez-Merino V, Yuste E, Haro I. Lipid raft-like liposomes used for targeted delivery of a chimeric entry-inhibitor peptide with anti-HIV-1 activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med [Internet]. Elsevier B.V.;* 2016;1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.023>
164. Gonzlez-choa H, Ibarra-bracamontes L, Arauz-lara JL. Two-Stage Coalescence in Double Emulsions. *Langmuir.* 2003;19(19):7837–40.
165. Hino T, Shimabayashi S, Tanaka M, Nakano M, Okochi H. Improvement of encapsulation efficiency of water-in-oil-in-water emulsion with hypertonic inner aqueous phase. *J*

- Microencapsul. 2001;18(November):19–28.
166. Nam HY, Kwon SM, Chung H, Lee SY, Kwon SH, Jeon H, et al. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *J Control Release*. 2009;135(3):259–67.
  167. Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Maincent P, Dellacherie E, Alonso MJ. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly ( lactic acid ) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Control Release*. 1998;50:31–40.
  168. En L, Tout A, Energy E, Spectroscopy L, Spectrometry EDX, Spectrometry WDX, et al. ( Met ) T Ransmission E Lectron M Icroscopy. In: nanoComposix. 2012. p. 1–11.
  169. Modi S, Anderson BD. Overcoming Pitfalls of the Dynamic Dialysis Method. *Mol Pharm*. 2013;10:3076–89.
  170. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *Int J Pharm [Internet]*. Elsevier B.V.; 2011;415(1–2):34–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>
  171. Mulye N V., Turco SJ. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices. *Drug Dev Ind Pharm*. 1995;21(8):943–53.
  172. Berkland C, King M, Cox A, Kim K, Pack DW. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. *J Control Release*. 2002;82(1):137–47.
  173. Berchane NS, Carson KH, Rice-Ficht AC, Andrews MJ. Effect of mean diameter and polydispersity of PLG microspheres on drug release: Experiment and theory. *Int J Pharm*. 2007;337(1–2):118–26.
  174. Gómara MJ, Pérez-Pomeda I, Gatell JM, Sánchez-Merino V, Yuste E, Haro I. Lipid raft-like liposomes used for targeted delivery of a chimeric entry-inhibitor peptide with anti-HIV-1 activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2016;1–9.
  175. Samaha D, Shehayeb R, Kyriacos S. Modeling and comparison of dissolution profiles of diltiazem modified-release formulations. *Dissolution Technol*. 2009;16(2):41–6.
  176. Nkabinde LA, Shoba-Zikhali LNN, Semete-Makokotlela B, Kalombo L, Swai H, Grobler A, et al. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Uptake by epithelial cells and cytotoxicity. *Express Polym Lett*. 2014;8(3):197–206.
  177. Lai Y, Chiang PC, Blom JD, Li N, Shevlin K, Brayman TG, et al. Comparison of in vitro nanoparticles uptake in various cell lines and in vivo pulmonary cellular transport in intratracheally dosed rat model. *Nanoscale Res Lett*. 2008;3(9):321–9.
  178. Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, Han G, Rotello VM, McNerny DQ, et al. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Lett*. 2008;8(2):420–4.
  179. Machado RM, Palmeira-de-Oliveira A, Gaspar C, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Adv Drug Deliv Rev [Internet]*. Elsevier B.V.; 2015;92:14–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.003>
  180. Almeida\* PF. Membrane-active peptides: binding, translocation, and flux in lipid vesicles. *Biophys Chem*. 2005;257(5):2432–7.

181. Chalovich JM, Eisenberg E. FOLDING AMPHIPATHIC HELICES INTO MEMBRANES: AMPHIPHILICITY TRUMPS HYDROPHOBICITY. *Biophys Chem.* 2005;257(5):2432–7.
182. Machado A, Das Neves J. Tissue-based in vitro and ex vivo models for vaginal permeability studies. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue based In Vitro Culture Models.* 2015. 273-308 p.
183. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: A review. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;190:500–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.033>
184. Marren K. Dimethyl sulfoxide: an effective penetration enhancer for topical administration of NSAIDs. *Phys Sport* [Internet]. 2011;39(3):75–82. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3810/psm.2011.09.1923%5Cnhttp://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3810/psm.2011.09.1923>
185. Van Eyk AD, Van Der Bijl P. Porcine vaginal mucosa as an in vitro permeability model for human vaginal mucosa. *Int J Pharm.* 2005;305(1–2):105–11.
186. Van Eyk AD, Van Der Bijl P. Comparative permeability of various chemical markers through human vaginal and buccal mucosa as well as porcine buccal and mouth floor mucosa. *Arch Oral Biol.* 2004;49(5):387–92.
187. Catalone BJ, Kish-catalone TM, Lynn R, Neely EB, Ferguson M, Fred C, et al. Mouse Model of Cervicovaginal Toxicity and Inflammation for Preclinical Evaluation of Topical Vaginal Microbicides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(5):1837–47.
188. Fernández-Romero JA, Teleshova N, Zydowsky TM, Robbiani M. Preclinical assessments of vaginal microbicide candidate safety and efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;92:27–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.12.005>
189. Hosseinipour MC, Kumarasamy N, Hakim JG, Mehendale S, Chariyalertsak S, Santos BR, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med.* 2011;365(6):493–505.
190. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Rockstroh JK. Role of GB virus C in modulating HIV disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(5):563–72.
191. Sánchez-Martín MJ, Hristova K, Pujol M, Gómara MJ, Haro I, Asunción Alsina M, et al. Analysis of HIV-1 fusion peptide inhibition by synthetic peptides from E1 protein of GB virus C. *J Colloid Interface Sci.* 2011;360(1):124–31.
192. Asuncio M, Haro I, Larios C, Christiaens B, Jose M. Interaction of synthetic peptides corresponding to hepatitis G virus ( HGV / GBV-C ) E2 structural protein with phospholipid vesicles. 2005;272:2456–66.
193. Eissmann K, Mueller S, Sticht H, Jung S, Zou P, Jiang S, et al. HIV-1 Fusion Is Blocked through Binding of GB Virus C E2D Peptides to the HIV-1 gp41 Disulfide Loop. *PLoS One.* 2013;8(1).
194. Alukda D, Sturgis T, Youan BC. Formulation of Tenofovir-Loaded Functionalized Solid Lipid Nanoparticles Intended for HIV Prevention. *J Pharm Sci.* 2011;100(8):3345–56.
195. Pagels RF, Prud RK. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides , biologics , and soluble therapeutics. *J Control Release.* 2015;219:519–35.
196. van den Broek I, Sparidans RW, Schellens JHM, Beijnen JH. Quantitative bioanalysis of

- peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2008;872(1–2):1–22.
197. Hong BS, Jessica A, Banaszak MM, Leroueil P, Mecke A, Orr BG. Physical interactions of nanoparticles with biological membranes : The observation of nanoscale hole formation. *Chem Health Saf.* 2005;(2):0–4.
  198. Rascol E, Devoisselle J, Chopineau J. The relevance of membrane models to understand nanoparticles – cell membrane interactions. *R Soc Chem.* 2016;4780–98.
  199. Weissleder R, Kelly K, Sun EY, Shtatland T, Josephson L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nat Biotechnol.* 2005;23(11):1418–23.
  200. Cho EC, Au L, Zhang Q, Xia Y. The Effects of Size , Shape , and Surface Functional Group of Gold Nanostructures on Their Adsorption and Internalization by Cells \*\*. *Small.* 2010;6(4):517–22.
  201. Pietroiusti A, Campagnolo L, Fadeel B. Interactions of Engineered Nanoparticles with Organs Protected by Internal Biological Barriers. *Small.* 2013;9(9–10):1557–72.
  202. Neves J, Michiels J, Ariën KK, Vanham G, Amiji M, Bahia MF, et al. Polymeric Nanoparticles Affect the Intracellular Delivery , Antiretroviral Activity and Cytotoxicity of the Microbicide Drug Candidate Dapivirine. *Pharm Res.* 2012;29:1468–84.
  203. Cunha-Reis C, Machado A, Barreiros L, Ara??jo F, Nunes R, Seabra V, et al. Nanoparticles-in-film for the combined vaginal delivery of anti-HIV microbicide drugs. *J Control Release.* 2016;243:43–53.









## **8. ANEXOS**





Artículo científico

**Penetration of polymeric nanoparticles loaded with an HIV-1 inhibitor peptide derived from GB virus C in a vaginal mucosa model**

Ariza-Sáenz Martha<sup>a, b</sup>, Espina Marta<sup>a</sup>, Bolaños Nuria<sup>a, c</sup>, Calpena Ana Cristina<sup>a</sup>, Gomara María José<sup>b</sup>, Haro Isabel<sup>b</sup>, García María Luisa<sup>a</sup>

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics