



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Facultad de Química

“Diseño y preparación de una forma farmacéutica basada en un sistema nanoestructurado, para el transporte y liberación de siRNA”

Tesis para obtener el grado de
**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
FARMACÉUTICAS**

PRESENTA:

Q.F.B. Edith Bello Robles

Directores:

Dr. Enrique Morales Avila
Dra. Brenda Vianey Gibbens Bandala
Dr. Pedro Cruz Nova



Toluca de Lerdo, Estado de México; Agosto 2024.

*Este trabajo se realizó con financiamiento de CONACYT-SEP, como parte del **proyecto CF 2019- 263379**, bajo la dirección del Dr. Enrique Morales Avila, en la Facultad de Química de la UAEMex.*

Se recibió apoyo del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, bajo la dirección de la Doctora Brenda Vianey Gibbens Bandala y el Doctor Pedro Cruz Nova; y en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México el laboratorio de Teragnóstica, con la colaboración de la Doctora Liliana Aranda Lara.

“Si llegamos a descubrir una teoría completa, sería el triunfo definitivo de la raza humana porque entonces conoceríamos la mente de Dios”

Stephen Hawking

ÍNDICE

<i>Contenido</i>	<i>Pág.</i>
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	viii
1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Avances en la terapia mediante silenciamiento génico y siRNA.	4
2.2 Sistemas de liberación y entrega de ácidos nucleicos.	6
2.3 Sistemas particulados de transporte.....	7
2.4 Sistemas autonanoemulsificantes de liberación de fármacos (SNEDDS).....	10
2.5 Formas farmacéuticas de transporte y liberación de ARN.	12
2.6 Formas farmacéuticas orales.	15
2.6.1 Cápsulas de gelatina blanda.....	16
2.6.2 Excipientes poliméricos.....	16
2.7 Formas modificadas de liberación.....	19
3. DISEÑO METODOLÓGICO	20
3.1 Justificación.....	21
3.2 Pregunta de investigación.....	23
3.3 Hipótesis.....	23
3.4 Objetivos.....	23
Objetivo general.	23
Objetivos específicos.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODO	24
Diseño y formulación de la forma farmacéutica.	25
4.1 Preparación de núcleos nanoparticulados.....	26
4.2 Obtención del complejo Nanopartícula-siRNA.....	27
4.3 Selección de excipientes de formulación para la forma farmacéutica.....	28
4.4 Optimización de la formulación.	30
4.5 Formulación de la forma farmacéutica.	32
4.5.1 Caracterización Físicoquímica.	32
4.5.2 Evaluación de transporte y liberación.	33
4.6 Análisis estadístico.	35

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
5.1 Preparación de núcleos particulados.	37
5.2 Obtención del complejo Nanopartícula-siRNA.....	37
5.3 Selección de excipientes de formulación para la forma farmacéutica.....	39
5.4 Optimización de la formulación.	41
5.5 Formulación de la forma farmacéutica.	51
5.5.1 Caracterización fisicoquímica.	52
5.5.2 Evaluación de transporte y liberación.	56
6. CONCLUSIONES.....	61
7. PERSPECTIVAS	63
8. REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nanoacarreadores de ARN.	7
Tabla 2. Fármacos aprobados por la FDA basados en nanoacarreadores.....	9
Tabla 3. Fármacos con ARNi fase III de investigación clínica.	13
Tabla 4. Concentraciones iniciales de excipientes para la formulación.	29
Tabla 5. Selección de formulaciones para evaluación de apariencia (72 h; t.a.).....	30
Tabla 6. Cuantificación de ARN en SNEDDS para la determinación de eficiencia de carga 39	
Tabla 7. Apariencia de formulaciones en incubación preliminar (72h, t.a.).	42
Tabla 8. Resultados de termoestabilidad de formulaciones.	44
Tabla 9. Evaluación de tamaño de partícula y Potencial Z (variables dependientes).....	48
Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos de la formulación.	53
Tabla 11. Mediciones de parámetros fisicoquímicos de la forma farmacéutica.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. RISC. Mecanismo de silenciamiento génico.	5
Figura 2. Formación de SNEDDS y proceso de absorción.	11
Figura 3. Diagrama metodológico.	26
Figura 4. Preparación de curva de calibración de ARN para determinación de la eficiencia de carga.	28
Figura 5. Preparación de la curva de calibración de ARN para análisis de liberación.	34
Figura 6. Esquema de electroforesis.	35
Figura 7. Curva de calibración de ARN. Determinación por espectrofotometría de fluorescencia.	38
Figura 8. Diseño optimizado de formulaciones de HPMC.	40
Figura 9. Diseño optimizado de formulaciones de propilenglicol.	40
Figura 10. Diseño optimizado de formulaciones de sorbitol.	41
Figura 11. Termoestabilidad de muestras de HPMC sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).	45
Figura 12. Termoestabilidad de muestras de propilenglicol sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).	45
Figura 13. Termoestabilidad de muestras de sorbitol sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).	46
Figura 14. Termoestabilidad de muestras de sorbitol sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).	46
Figura 15. Termoestabilidad de muestras de sorbitol sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).	47
Figura 16. Termoestabilidad de muestras de sorbitol sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).	47
Figura 17. Distribución de tamaño de partícula. F6 HPMC.	49
Figura 18. Distribución de tamaño de partícula. F10 Propilenglicol.	50
Figura 19. Distribución de tamaño de partícula. F9 Sorbitol.	50
Figura 20. Microscopía estereoscópica de la cápsula sometida a la formulación final: a) Cápsula placebo, b) Cápsula blanco y c) Cápsula formulación.	52
Figura 21. Distribución de tamaño de partícula. FF Sorbitol/Propilenglicol.	54
Figura 22. Curva de calibración. Perfil de disolución.	56
Figura 23. Perfil de disolución de cápsulas cargadas con ARN.	57
Figura 24. Análisis ANOVA del perfil de disolución.	57
Figura 25. Ensayo de electroforesis.	59

ABREVIATURAS

Ago-02	Proteína argonauta
AB-729	Tratamiento para Hepatitis B
ABC	Super familia de casetes de ATP
Abs	Absorbancia
ALN-HBV	Tratamiento para Hepatitis B
ANOVA	Análisis de varianza
ARB-1467	Tratamiento para Hepatitis B
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNdc	Ácido ribonucleico de doble cadena
ARNnc	Ácido ribonucleico no codificante
ARO-HBV	Tratamiento para Hepatitis B
BCR-ALB	Proteína del cromosoma Philadelphia
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DICER	Ribonucleasa de la familia ARNasa III
DLS	Dispersión de luz dinámica
DsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
GalNAc	N-acetilgalactosamina
Gp-P	Glicoproteína P
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
LADME	Liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción.
LDL-C	Colesterol de baja densidad
LNP	Nanopartículas lipídicas
MGA	Método general de análisis
miRNA	Micro Ácido Ribonucleico
NAION	Neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica
NP	Nanopartícula
NP-PEG-FA/17-AAG	Nanopartículas de polietilenglicol cargadas con el inhibidor Hsp90
PCSK9	17-AGG
PCSK9	proteína convertasa subtilisina/ kexina tipo 9
PCSK9	Proteína convertasa subtilisina/ kexina
PDI	Índice de polidispersidad

PLGA	Ácido poliláctico glicólico
PLM	Diccionario de especialidades farmacéuticas
RAD51	Gen eucariota asociado a carcinoma familiar de ovario
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
SARS-CoV-2	Virus causante de enfermedad respiratoria por coronavirus 2019
SCA I	Ataxia espinocerebelosa tipo I
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SNEDDS	Sistemas Autonanoemulsificantes de Liberación de Fármacos
t.a.	Temperatura ambiente
T47d	Línea celular carcinoma de mama
TDAH	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1
UV-Vis	Espectroscopía de luz ultravioleta y luz visible
VIH	Virus de Inmunodeficiencia humana

1. RESUMEN

A pesar de los avances en el desarrollo de terapias con ácido ribonucleico (ARN), el principal problema sigue siendo la falta de capacidad traslacional, limitado por falta de formas farmacéuticas que permitan la liberación del material genético en el sitio blanco, por lo que hay un arduo trabajo de investigación y desarrollo de sistemas de liberación.

El desarrollo de nanopartículas como sistemas de transporte y liberación, tiene potenciales aplicaciones debido a su estructura y propiedades; además de ser una opción de terapia que reduce el riesgo de reacciones inmunogénicas, menores efectos adversos, menos invasivos y más eficaces. El uso de sistemas nanoparticulados en el diseño de formas farmacéuticas ha permitido el transporte y entrega de ácidos nucleicos para el desarrollo de fármacos utilizados en terapia génica.

En la presente investigación, se diseñó, desarrolló y evaluó un sistema nanoparticulado de siRNA en una formulación farmacéutica con el fin de obtener una opción viable de tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas.

Se preparó la formulación con sistemas auto-nanoemulsificantes de liberación de fármacos (SNEDDS), a partir de una formulación previamente establecida para transportar ARN. Se realizó un cribado de excipientes para la formulación de la forma farmacéutica mediante revisión bibliográfica, considerando principalmente que estos excipientes estuvieran reportados en formas farmacéuticas orales y que fueran capaces de brindar estabilidad a los SNEDDS. Las concentraciones se determinaron mediante un diseño factorial y pruebas de termoestabilidad. Finalmente, se seleccionó como forma farmacéutica una cápsula de gelatina blanda. Se realizaron pruebas de estabilidad y caracterización fisicoquímica y se evaluó la liberación de ARN mediante pruebas de disolución y electroforesis en gel.

En este estudio se formuló una cápsula de gelatina blanda como forma farmacéutica de liberación oral, capaz de transportar ARN incorporado en un sistema nanoestructurado (SNEDDS) que permitió una liberación modificada del ARN. Se demostró que puede mantener la estabilidad de la molécula a través de cambios de pH intestinales. Si bien en este estudio no fue posible determinar la cinética de liberación del ARN, se demostró que la formulación brinda estabilidad a los SNEDDS durante el transporte en el tracto gastrointestinal.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Avances en la terapia mediante silenciamiento génico y siRNA.

La terapia génica es el tratamiento de una enfermedad mediante la modificación de la información genética en una célula para modificar o sustituir un gen defectuoso (Laffon-Lage et al., 2015). El uso de la terapia génica ha mejorado debido a la capacidad para generar corrección de mutaciones mediante el silenciamiento o expresión de genes específicos a nivel de ARN o algunas proteínas; entre otros mecanismos (Amreddy et al., 2018; Cullis & Hope, 2017; Paunovska et al., 2022).

Algunas de las enfermedades que ya se han reportado en estudios mediante mecanismos de silenciamiento como opciones de terapia son la hepatitis B, cáncer de próstata, hígado o mama, fibrosis, enfermedades gastrointestinales (Amreddy et al., 2018; Chow et al., 2020; Mitchell et al., 2021; Tian et al., 2021; van den Berg et al., 2020; Wen et al., 2019).

El proceso de silenciamiento inicia mediante el ácido ribonucleico de interferencia (ARNi), que regula la expresión de genes mediante fragmentos cortos de ARN en las células (Cullis & Hope, 2017; Laffon-Lage et al., 2015). El ARNi, es un mecanismo natural que regula la expresión de genes mediante estructuras de ARN no codificante (ARNnc). Entre estas estructuras se encuentra el Ácido ribonucleico pequeño de interferencia (siRNA) y el micro-ARN (miRNA) (Buduru et al., 2018). El siRNA es un fragmento de ARN de doble cadena que contiene una secuencia específica para la degradación de su ARNm homólogo. Está formado por 19 a 23 pares de nucleótidos (Mitchell et al., 2021; Paunovska et al., 2022). Degradan cadenas de ARNm con secuencias complementarias para después interferir en la expresión del gen para el que codifica (Tian et al., 2021).

Los siRNA pueden insertarse por procesos químicos en la célula mediante sistemas de transporte (virales o no virales); o bien, formarse mediante la actividad de la proteína DICER, que actúa como helicasa para romper la cadena precursora de un ARN de doble cadena (ARNdc); formando un fragmento de 23 a 25 nucleótidos. Este fragmento se conoce como miRNA, y una vez que se ha formado se adhiere a la proteína argonauta (AGO2) para iniciar la formación del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). La AGO2 degrada

la hebra pasajera del miRNA o siRNA, y el RISC queda activado por la hebra antisentido. Así, el ARNm se une a la secuencia complementaria del siRNA que está unido al RISC para ser inactivado por la AGO2 e inhibir el proceso de traslación (Iwakawa & Tomari, 2022; Tian et al., 2021). En la figura 1 se observa una representación gráfica del proceso de silenciamiento génico.

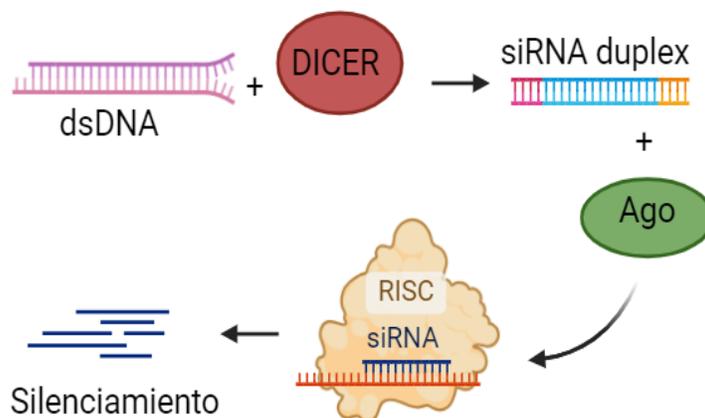


Figura 1. RISC. Mecanismo de silenciamiento génico.

El descubrimiento del siRNA permitió el desarrollo de nuevos enfoques para la inhibición de la expresión de diversos genes y con ello, desarrollar nuevas formas farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades genéticas o poco comunes (Massy & Drueke, 2022). El uso de siRNA resulta ideal para el tratamiento de una infección viral, debido a que pueden desarrollarse en un periodo corto de tiempo para virus que han sido recién aislados, y así evitar mutaciones una vez que se alojan en los hospederos (J. Blake et al., 2012).

El uso de siRNA y miRNA ha demostrado una eficaz inhibición de la replicación viral de diferentes subtipos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). El ARNi podría evitar la resistencia que presenta el genoma mutante del VIH a casi todos los agentes antivirales de los medicamentos (Kravatsky et al., 2016). Otra aplicación de tratamientos con ARNi son las infecciones virales de hepatitis. Se ha demostrado que el ARNi es capaz de reducir la carga viral mediante la degradación del ARN viral, evitando la expresión de las proteínas del virus. El ARNi puede estimular una fuerte respuesta inmune la cual puede ampliar la respuesta al tratamiento (Gane, 2017).

En algunos estudios se ha identificado que el uso de ARNi reduce la expresión de genes mutantes en enfermedades neurodegenerativas y trastornos de duplicación de poliglutamina. En ataxia espinocerebelosa tipo I (SCA I), los genes mutados de ataxina-1 promueven la disfunción cerebral y la muerte celular en algunas zonas del cerebelo y el tronco cerebral (Tian et al., 2021).

Recientemente se han sintetizado las vacunas para el tratamiento de infecciones producidas por SARS-CoV-2, mediante la incorporación de ARNm en nanopartículas lipídicas. El desarrollo de estas vacunas de administración intramuscular permitió de manera exitosa el silenciamiento de la glicoproteína S del virus al incorporar ARNm modificado; con lo cual se logra el transporte de gran cantidad de antígeno en las células inmunitarias para producir anticuerpos contra el virus (Mazayen et al., 2022).

2.2 Sistemas de liberación y entrega de ácidos nucleicos.

Los virus han sido utilizados como vehículos de transporte de ARN, ya que tienen la capacidad de transportarse de una célula a otra para replicarse, teniendo algunos de ellos mecanismos específicos y selectivos para el reconocimiento celular y la inserción del material nuclear, algunas metodologías incluyen retrovirus, lentivirus y adenovirus (Amreddy et al., 2018; Chow et al., 2020; Cullis & Hope, 2017). Los lentivirus se han utilizado como vectores para tratamientos en enfermedades como Parkinson, Alzheimer y enfermedad de Huntington, ya que presentan una afinidad alta hacia las células del sistema nervioso (Lee et al., 2017). Por otra parte, los adenovirus se han estudiado en el tratamiento de enfermedades como la hemofilia B y fibrosis quística (Lee et al., 2017).

Debido a la toxicidad que pueden llegar a presentar los virus como vectores, algunos estudios en enfermedades pulmonares han reportado sistemas híbridos en los que se combinan polímeros o péptidos mediados por virus, los cuales han mostrado una alta capacidad de expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) con una toxicidad poco significativa (Chow et al., 2020).

Un estudio realizado por Wang, D. y colaboradores confirmó que un sistema compuesto de nanopartículas de sílica mesoporosa y polietilenglicol para transportar siRNA-MDR1 con doxorubicina es capaz de reducir significativamente la expresión del gen MDR1; con lo cual se indujo apoptosis celular y se redujo el tamaño del tumor (D. Wang et al., 2017).

2.3 Sistemas particulados de transporte.

Las nanopartículas son un medio eficiente para el transporte y liberación de fármacos, ya que brindan estabilidad a las moléculas, mayor dispersabilidad en agua, mejoran la captación celular del fármaco y lo protegen de la degradación enzimática (Mitchell et al., 2021).

Los sistemas nanoparticulados pueden ser utilizados como adyuvantes en los tratamientos contra el cáncer por su capacidad para mejorar la respuesta inmune ante células tumorales (Wen et al., 2019). Se usan también en la fabricación de vacunas como portadores de antígenos o adyuvantes para mejorar la respuesta inmune contra el cáncer (Wen et al., 2019). Algunos estudios también han recurrido al uso de micelas en la síntesis de nanopartículas, ya que permite una mayor permeabilidad en los tejidos (Mitchell et al., 2021). En la tabla 1 se muestran algunas estructuras nanoparticuladas que han sido implementadas para el transporte y liberación de ácidos nucleicos.

Tabla 1. Nanoacarreadores de ARN.

Nanopartícula	Propiedades	Aplicaciones	Ref.
Nanopartículas lipídicas (LNP)	Mejoran la estabilidad de la molécula. Aumentan la capacidad de atravesar la membrana celular. Mejoran la farmacocinética. Los liposomas catiónicos pueden formar complejos con siRNA.	Oncoterapia. Diseño de fármacos a partir de ácidos nucleicos.	(Amreddy et al., 2018; Cullis & Hope, 2017; Kim et al., 2019; Liu et al., 2020; M. M. Zhang et al., 2021; Zhongji Meng, 2017)
Nanotubos de carbono	Conductividad eléctrica única, afinidad electrónica, alta resistencia y propiedades térmicas y ópticas específicas. Biocompatibilidad.	Encapsulación y administración de fármacos e ingeniería de tejidos.	(Joudeh & Linke, 2022; Kofoed Andersen et al., 2021; Li & Al-

		Acarreadores de siRNA.	Jamal, 2021; Mazayen et al., 2022)
Dendrímeros	Son multi ramificados y se pueden controlar en cuanto a forma y superficie química. Mejoran la biodisponibilidad y el transporte en la mucosa.	Agentes teragnósticos, agentes de transfección. Transporte de ácidos nucleicos. Fabricación de vacunas.	(Mazayen et al., 2022; Mitchell et al., 2021)
Biopolímeros	Emplean polímeros sintéticos o naturales. Tienen la capacidad de interactuar electrostáticamente para formar las nanopartículas. Capacidad de encapsular genes, partículas pequeñas y péptidos. Son biocompatibles y de fácil formulación.	Nanotransportadores utilizados para entrega de siRNA. Forman complejos con siRNA y lo protegen debido a que pueden modificar sus propiedades.	(Amreddy et al., 2018; Mazayen et al., 2022; Mitchell et al., 2021; Morales-Becerril et al., 2022)
Nanopartículas de oro	Tamaño <10 nm. Capacidad para penetrar la célula. Alta eficiencia en la captación celular, estables en circulación sanguínea. Tienen propiedades eléctricas, magnéticas y ópticas específicas. Son biodegradables y biocompatibles.	Conjugadas con otros polímeros se emplean como sistemas de liberación de siRNA.	(Amreddy et al., 2018; Joudeh & Linke, 2022; Mitchell et al., 2021; Morales-Becerril et al., 2022)
Nanopartículas inorgánicas	Compuestas de partículas metálicas. Propiedades magnéticas, electrónicas y ópticas. Mejoran la biocompatibilidad.	Nanoacarreadores de siRNA.	(Mitchell et al., 2021; Morales-Becerril et al., 2022)
Micelas	Son nanoacarreadores compuestos de una fase acuosa, fase lipídica y un surfactante que se caracterizan por tener tamaños muy pequeños. Mejoran la solubilidad de los fármacos y la permeabilidad de la membrana.	Liberación de siRNA.	(Ghezzi et al., 2021; Morales-Becerril et al., 2022)

Además, se han desarrollado algunos fármacos en conjunto con estas tecnologías, los cuales se describen en la tabla 2:

Tabla 2. Fármacos aprobados por la FDA basados en nanoacarreadores

Medicamento	Activo	Nanosistema	Padecimiento	Laboratorio	Año de aprobación
INFeD	Hierro Dextrán	Nanopartículas inorgánicas	Anemia ferropénica	Allergan	1992
Oncaspar	Pegaspargasa	Nanopartículas poliméricas	Leucemia linfoblástica aguda	Enzon Pharmaceuticals	1994
Doxil	Doxorrubicina	Nanopartículas lipídicas.	Sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario, mieloma múltiple	Janssen	1995
Copaxone	Acetato de Glatiramer	Nanopartículas poliméricas	Esclerosis múltiple	Teva	1996
DepoCyt	Citarabina	Liposomas	Meningitis Linfomatosa	Sigma-Tau	1996
Ontak	Denileucina difitox	Nanopartículas basadas en proteínas	Linfoma de células T	Eisai Inc	1999
Ferrlecit	Gluconato férrico de sodio	Nanopartículas inorgánicas	Deficiencia de hierro en enfermedad renal crónica.	Sanofi	1999
Venofer	Sacarosa de hierro	Nanopartículas inorgánicas	Deficiencia de hierro en enfermedad renal crónica.	American Reagen	2000
Renagel	Sevelamer	Nanopartículas poliméricas	Enfermedad renal crónica	Sanofi	2000
Rapamune	Rapamicina	Nanocristales	Inmunosupresor	Wyeth Pharmaceuticals	2000
PegIntron	Interferón alfa-2b	Nanopartículas poliméricas	Hepatitis C	Merck	2001
Eligard	Leuprorelina	Nanopartículas poliméricas	Cáncer de próstata	Tolmar	2002
Pegasys	Peginterferón alfa-2 ^a	Nanopartículas poliméricas	Hepatitis tipo B y C	Genentech	2002
Ritalin LA	Metilfenidato	Nanocristales	TDAH	Novartis	2002
Somavert	Pegvisomant	Nanopartículas poliméricas	Acromegalia	Pfizer	2003

Estrasorb	Estradiol	Micelas	Menopausia	Spirit Pharma	2003
Vitoss	Fosfato de calcio	Nanopartículas de fosfato de calcio	Sustituto de injerto óseo	Stryker	2003
Ostim	P- fosfato tricálcico	Nanocristales	Sustituto óseo	Heraeus Kulzer	2004
Abraxane	Paclitaxel	Nanopartículas poliméricas	Cáncer de pulmón, cáncer metastásico de páncreas, cáncer metastásico de pecho.	Celgene	2005
Invega Sustenna	Palmitato de paliperidona	Nanopartículas poliméricas	Esquizofrenia	Janssen Pharms	2009
Nanotherm	Óxido de Hierro	Nanopartículas inorgánicas	Glioblastoma	MagForce	2010
Marqibo	Vincristina	Liposomas	Leucemia Linfoblástica aguda	Onc TCS	2012
Plegridy	Interferón beta-1b	Nanopartículas poliméricas	Esclerosis múltiple	Biogen	2014
Adynovate	Factor VIII Humano recombinante pegilado	Nanopartículas poliméricas	Hemofilia	Takeda	2015
Onivide	Irinotecán	Nanopartículas lipídicas	Cáncer de páncreas	Uvinova Pharma	2015
Onpattro	Patisiran	Nanopartículas lipídicas.	Amiloidosis mediada por transtirretina.	Alnylam Pharmaceuticals	2018
BNT162b2	Anti-S	Nanopartículas lipídicas	Covid-19	Pfizer	2020
Vacuna mRNA-1273	mRNA-1273	Nanopartículas lipídicas	Covid-19	Moderna	2020
<i>Referencias:</i> (Bobo et al., 2016; Mazayen et al., 2022; Mitchell et al., 2021; Rodríguez et al., 2022).					

2.4 Sistemas autonanoemulsificantes de liberación de fármacos (SNEDDS).

Los SNEDDS son mezclas isotrópicas, termodinámicamente estables de sustancias lipídicas que contienen surfactantes y co-surfactantes con un tamaño de aproximadamente 100 a 200 nm. Tienen la capacidad de autoemulsificarse (formar emulsiones por sí mismas) originando la formación de micelas con tamaños de partícula menores a 100 nm y se emplean en la

formulación de fármacos para mejorar su absorción y biodisponibilidad (Park et al., 2022; Singh, 2021; C.-Y. Wang et al., 2020). La formación de micelas protege a la molécula contenida en el interior del SNEDDS de procesos como hidrólisis u oxidación producidas en el tracto gastrointestinal (Nikam et al., 2024; Smith et al., 2018; C.-Y. Wang et al., 2020). Son una alternativa para la administración oral de nanopartículas empleadas en años recientes debido a la alta biodisponibilidad que presentan (Knaub et al., 2019; Plaza-Oliver et al., 2021; Singh, 2021; C.-Y. Wang et al., 2020). Mejoran la solubilidad de los fármacos en el medio gastrointestinal por su baja energía libre superficial. Protegen a las moléculas del fármaco durante el transporte reduciendo la actividad de eflujo. Presentan baja o nula toxicidad y promueven la absorción del fármaco a través de la célula y la linfa (Nikam et al., 2024; Smith et al., 2018).

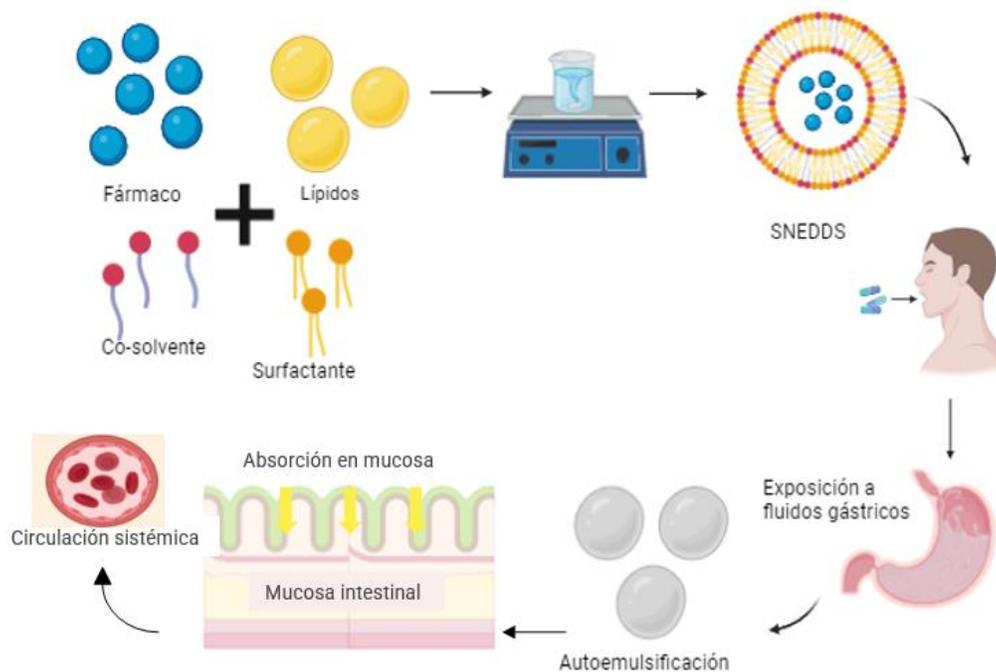


Figura 2. Formación de SNEDDS y proceso de absorción.

Pueden dosificarse mediante cápsulas por sus propiedades coloidales (Smith et al., 2018). Se ha demostrado que las nanoemulsiones poseen características muy favorables para la administración de fármacos orales, ya que aumentan la encapsulación del fármaco, mejoran la farmacocinética de este y promueven una mayor absorción. Permiten utilizar dosis precisas más bajas del fármaco; lo cual, facilita la predicción de la liberación e incremento del efecto

terapéutico (Nikam et al., 2024). Además, favorece a un mayor cumplimiento del tratamiento por parte del paciente y al mismo tiempo se pueden reducir efectos adversos y los niveles de toxicidad del fármaco (Chrastina et al., 2022; Nikam et al., 2024). En la figura 2 se muestra una representación de la formación de SNEDDS.

2.5 Formas farmacéuticas de transporte y liberación de ARN.

El avance del desarrollo de fármacos con nuevas tecnologías ha permitido la aprobación de algunos medicamentos que incluyen algún tipo de ARN en su formulación (Amreddy et al., 2018; Chow et al., 2020).

Recientemente la FDA aprobó la primera terapia con siRNA llamada ONPATTRO que encapsula siRNA en sistemas nanoparticulados lipídicos y lo libera para la inhibición de la expresión de transtiretinas malignas o mutantes para tratar la amiloidosis (Adams et al., 2018; H. Zhang et al., 2020; M. M. Zhang et al., 2021). En 2019, se aprobó otro fármaco de Alnylam Pharmaceuticals, registrado como Givosiran. Este medicamento consiste en un complejo de aminolevulinato sintasa-siRNA, que se encarga de liberar el siRNA en los hepatocitos y se emplea en el tratamiento de porfiria hepática aguda en adultos y en niños mayores de 12 años (Scott, 2020; M. M. Zhang et al., 2021).

En 2020 Alnylam Pharmaceuticals obtuvo la aprobación de la Unión Europea y de la FDA de otro fármaco a base de siRNA, denominado Lumasiran (Scott & Keam, 2021; M. M. Zhang et al., 2021). Se utiliza para el tratamiento de hiperoxaluria primaria tipo uno y se administra por vía subcutánea. Una vez liberado, el siRNA se dirige al ARNm del gen de hidroxilasa oxidasa 1 para agotar la glicolato oxidasa y con ello inhibir la síntesis de oxalato; que es un metabolito característico de la hiperoxaluria (Massy & Drueke, 2022; Scott & Keam, 2021). En diciembre de 2020 se aprobó el Inclisiran (Lamb, 2021), otro fármaco con siRNA que reduce los niveles de colesterol conjugado con carbohidratos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) y fue sintetizado por Novartis. El Inclisiran inhibe la proteína convertasa subtilisina/ kexina tipo 9 (PCSK9), esto produce que el receptor de colesterol de baja densidad (LDL-C) se reinserte con mayor frecuencia en la membrana plasmática para aumentar la unión de LDL-C y así, disminuyen los niveles en torrente sanguíneo (Lamb,

2021; M. M. Zhang et al., 2021). Se aprobó principalmente para el tratamiento de hipercolesterolemia primaria o dislipidemia mixta en adultos (Athanasios Valavanidis & Thomais Vlachogianni, 2016; Joudeh & Linke, 2022; Nikam et al., 2024). Finalmente, el Vutrisiran es un siRNA desarrollado por Alnylam Pharmaceuticals dirigido al tratamiento de amiloidosis tanto hereditaria como no hereditaria (Keam, 2022; Yadav et al., 2021; M. M. Zhang et al., 2021). Es el fármaco más recientemente aprobado, en 2022 en Estados Unidos (Keam, 2022).

Otro tipo de terapias farmacéuticas que podemos encontrar bajo estos principios son las vacunas. El desarrollo más reciente ha sido el tratamiento contra el virus SARS-CoV-2. Mediante el registro de la estructura y secuencia del genoma del coronavirus, empresas como Pfizer o Moderna lograron desarrollar vacunas a base de nanopartículas. De manera general, su mecanismo de acción depende de la incorporación de ARNm modificado para codificar la proteína S del virus por medio de nanopartículas lipídicas (Mazayen et al., 2022); en la tabla 3 se muestran algunos fármacos en fase tres de investigación clínica.

Tabla 3. *Fármacos con ARNi fase III de investigación clínica.*

Fármaco	Enfermedad	Mecanismo de acción	Laboratorio	Ref.
Tivanisiran	Síndrome de ojo seco	Silenciamiento del receptor TRPV1. Reduce el contenido celular de la proteína TRPV1.	Sylentis S.A.	(Moreno-Montañés et al., 2018; M. M. Zhang et al., 2021)
Fitusiran	Hemofilia A o B	Inhibe los niveles de factores de anticoagulación mediante la unión de ARNm a antitrombina. Una mayor producción de trombina genera un equilibrio mayor de la hemostasia.	Alnylam Pharmaceuticals y Sanofi Genzyme	(Pasi et al., 2021; M. M. Zhang et al., 2021)
Nedosiran	Hiperoxaluria	Reduce la expresión de Lactato deshidrogenasa mediante una conjugación de GalNAc-siRNA.	Dicerna Pharmaceutical.	(M. M. Zhang et al., 2021)

Teprasiran	Lesión renal aguda	Inhibe la muerte celular mediada por el gen p53, dando oportunidad a la reparación de las células lesionadas del túbulo renal.	Quark Pharmaceuticals & Novartis.	(Thielmann et al., 2021; M. M. Zhang et al., 2021)
Cosdosiran	Neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica (NAION) y glaucoma.	Inhibe la expresión de la caspasa 2 para proteger la pérdida de las células ganglionares de la retina.	Quark Pharmaceuticals	(Gangopadhyay & Gore, 2022; M. M. Zhang et al., 2021)

En el tratamiento contra el virus de hepatitis también hay algunos fármacos en desarrollo a base de siRNA, como el ARB-1467 y AB-729 desarrollados por Arbutus, ARO-HBV de Arrowhead, ALN-HBV de Alnylam e IONIS-HBVRx de Ionis (Cullis & Hope, 2017; Soriano, n.d.).

Algunos otros fármacos que se basan en sistemas nanoestructurados; aunque no precisamente en terapia con ARN, son el Doxil; que en 1995 la FDA aprobó y es uno de los medicamentos que incluyen un sistema nanoparticulado de liberación de doxorubicina; una fórmula que emplea un sistema de liberación liposomal (Amreddy et al., 2018). El Imatinib mesilato es un fármaco sintetizado por Novartis (Massy & Drueke, 2022; Mazayen et al., 2022; Moreno-Montañés et al., 2018; Pasi et al., 2021; M. M. Zhang et al., 2021), se aprobó para el tratamiento contra la leucemia mieloide crónica que expresan la proteína BCR-ALB del cromosoma Filadelfia (Mitchell et al., 2021; Waller, 2018). El desarrollo del Paclitaxel a base de dendrímeros, permite una mejor permeabilidad a través de las barreras celulares para la terapia de algunos tipos de cáncer (Athanasios Valavanidis & Thomais Vlachogianni, 2016). Se han utilizado nanopartículas de PLGA (ácido poliláctico glicólico) para el desarrollo de sistemas de transporte de medicamentos anticancerígenos, como la doxorubicina, 5-fluorouracilo y nuevamente paclitaxel (Mazayen et al., 2022).

2.6 Formas farmacéuticas orales.

Las formas farmacéuticas de administración oral son las más utilizadas; entre otras razones, porque son una vía cómoda para el paciente, diversos principios activos pueden formularse bajo estas formas farmacéuticas y su fabricación implica costos reducidos. La mayor dificultad que enfrentan los fármacos orales respecto a su absorción y estabilidad es el entorno gastrointestinal (Debotton & Dahan, 2017; Rehman et al., 2020).

Las nanoemulsiones son una opción para mejorar el transporte de los fármacos por el tracto gastrointestinal, ya que brindan mayor estabilidad ante la presencia de algunas enzimas o cambios de pH, mejoran la biodisponibilidad y absorción del fármaco y también pueden reducir su toxicidad (Rehman et al., 2020). En un estudio desarrollado por Yang y colaboradores, 2020, se demostró que la administración oral de nanopartículas de NP-PEG-FA/17-AAG tuvo un efecto mayor en la reducción de los síntomas de inflamación causados por colitis, en comparación con un tratamiento administrado por vía sistémica y con sólo una décima parte de la dosis (Yang et al., 2020).

Algunos de los fármacos orales que se han sometido a estudios de reformulación en nanoemulsiones son el paclitaxel que, como se mencionó anteriormente, se emplea en el tratamiento de cáncer y este tipo de formulación brinda mayor biodisponibilidad, mejor captación celular y potencia la actividad antitumoral. También se ha desarrollado el candesartán para el tratamiento de hipertensión, ciclovirobuxina D para el tratamiento de arritmias, etexilato de dabigatrán para accidente cerebrovascular y tromboembolismo; los cuales presentan un aumento de la biodisponibilidad bajo esta formulación. Otros fármacos que se han sometido a una reformulación basada en el desarrollo de nanoemulsiones son la aspirina, logrando mejorar su actividad antiinflamatoria y analgésica, la primaquina (tratamiento contra la malaria), para reducir la dosis, y la insulina, buscando un tratamiento menos invasivo y con el fin de mejorar su absorción y eficacia (Rehman et al., 2020).

2.6.1 Cápsulas de gelatina blanda.

Son formas farmacéuticas sólidas de administración oral, intravaginal o rectal, capaces de contener formulaciones líquidas, sólidas y semisólidas. Se componen de una cubierta de gelatina o de materiales poliméricos con plastificantes y la parte interna de una mezcla del fármaco y excipientes (Debotton & Dahan, 2017; Gullapalli & Mazzitelli, 2017; Koehl et al., 2021). Se utilizan principalmente para formulaciones líquidas o semisólidas, es necesario considerar para sus formulaciones la miscibilidad de los excipientes y evaluar la solubilidad de estos (Debotton & Dahan, 2017; Koehl et al., 2021).

En la formulación de una cápsula, es necesario considerar la compatibilidad de los componentes de la cubierta con los excipientes de la formulación (Koehl et al., 2021). En la formulación de la pared de la cápsula se emplean plastificantes hidrofílicos ya que promueven la retención de humedad de la gelatina. Entre los plastificantes más utilizados se encuentran el glicerol, manitol, sorbitol, propilenglicol y polietilenglicoles de bajo peso molecular (Gullapalli & Mazzitelli, 2017).

2.6.2 Excipientes poliméricos.

El papel de los excipientes en las formas farmacéuticas es crucial, ya que se ha demostrado que no sólo funcionan como vectores de los principios activos, sino también intervienen en el proceso de liberación e incluso en la eficiencia terapéutica (Debotton & Dahan, 2017; Rabasco Álvarez & González Rodríguez, 2010).

La selección de excipientes se mueve en función de las propiedades del principio activo y de las características de liberación deseadas. El uso de excipientes poliméricos permite modificar los parámetros farmacocinéticos de la molécula, ya que pueden aumentar la solubilidad, viscosidad, biodegradabilidad y mucoadhesión entre otras. Este tipo de excipientes funcionan como diluentes, disgregantes, aglutinantes y desintegrantes en una formulación de una forma farmacéutica oral. Pueden formar matrices poliméricas para lograr una liberación controlada de los fármacos (Debotton & Dahan, 2017).

Se ha demostrado que los polímeros hidrofílicos pueden utilizarse en la formulación de formas farmacéuticas de liberación controlada, pues las matrices que forman al hidratarse evitan la liberación inmediata del fármaco (Bermejo et al., 2020).

a. Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

La HPMC es un polímero de celulosa que se sintetiza a partir de celulosa alcalina al reaccionar con óxido de propileno y clorometano. Mantiene soluciones estables en un rango de pH de 3-11 y dependiente de la concentración, gelifica de 50 a 90 °C. En solución acuosa permite mantener estabilidad a largo plazo siendo resistentes a la acción de enzimas (Guarve & Kriplani, 2021). Es estable en soluciones en un rango de pH de 3 -11. Las soluciones de HPMC son resistentes a la degradación enzimática y a los cambios de temperatura, manteniendo una transformación gel/solución en función de la disminución o aumento de temperatura; sin embargo, no son resistentes a agentes microbianos (R. Rowe, 2006).

Se utiliza como excipiente en formas farmacéuticas orales, oftálmicas y tópicas (R. Rowe, 2006). Se integra en el proceso de fabricación de algunas cápsulas de gelatina dura porque actúa como un polímero formador de película gelificante (Gullapalli & Mazzitelli, 2017). Puede ejercer diferentes funciones en la formulación de tabletas y cápsulas; como aglutinante, bomba osmótica, matriz hidrofílica o desintegrante (Debotton & Dahan, 2017). La formación de matrices en comprimidos permite la formulación de formas farmacéuticas de liberación prolongada. Es un agente emulsionante, se utiliza en soluciones coloidales para evitar la formación de aglomerados (R. Rowe, 2006).

Se han desarrollado cápsulas de HPMC que, en comparación con las cápsulas de gelatina dura, tienen una mejor capacidad para contener formulaciones con mayores contenidos de agua, ya que presentan una mayor resistencia al intercambio de agua con excipientes hidrofílicos en la formulación lo cual, a su vez permite la incorporación de formulaciones de carácter lipídico (Koehl et al., 2021).

b. Propilenglicol.

Es un excipiente polimérico con propiedades antimicrobianas, es miscible en agua y buen estabilizador de vitaminas. Se utiliza en formas farmacéuticas orales como solvente o cosolvente, como conservante en formulaciones líquidas o semisólidas; y en formas farmacéuticas tópicas como humectante y solvente o cosolvente. Se ha utilizado en cápsulas masticables de gelatina blanda como vehículo hidrofílico en la formulación (ZHAO et al., 2016). También se utiliza como desinfectante y plastificante y se considera un excipiente menos tóxico que otros glicoles. Se ha empleado tanto para formulaciones parenterales como no parenterales. Es buen disolvente para moléculas como alcaloides, vitaminas, barbitúricos y algunos anestésicos (R. Rowe, 2006). Es un buen vehículo de emulsiones. Se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y se metaboliza bien en el hígado (ZHAO et al., 2016) (R. Rowe, 2006; Zhou et al., 2021).

Presenta estabilidad a bajas temperaturas, mientras se encuentre en recipientes herméticamente cerrados. A altas temperaturas puede oxidarse dando lugar a la formación de diferentes productos (R. Rowe, 2006).

c. Sorbitol.

El sorbitol es un alcohol de azúcar de 6 carbonos utilizado ampliamente como excipiente farmacéutico. Es enmascarador de sabor, y en algunas formulaciones orales funciona como endulzante para sustituir otro tipo de azúcares. Se incluye en algunas formulaciones inyectables por vía intramuscular y en formulaciones tópicas funciona como humectante. Es estable a temperaturas bajas y altas; y resistente a muchos microorganismos. Se considera inerte respecto a otros excipientes y en solución se puede almacenar en recipientes de plástico, vidrio o aluminio. También es higroscópico, por lo que debe almacenarse en recipientes herméticos (Dash et al., 2019; R. Rowe, 2006).

Se utiliza en tabletas como diluyente, como vehículo en formulaciones líquidas y suspensiones. Se utiliza en la preparación de jarabes para evitar la formación de cristales

alrededor de la tapa de los frascos. Actúa como estabilizador de algunos fármacos como vitaminas o antiácidos. Es un disolvente no iónico que se utiliza como excipiente en la pared de cápsulas de gelatina blanda; ya que promueve la formación de estructuras helicoidales en la gelatina y así, mejora la estabilidad en la estructura de la cápsula (Dash et al., 2019; Gullapalli & Mazzitelli, 2017; R. Rowe, 2006).

2.7 Formas modificadas de liberación.

La evolución de las formas farmacéuticas tiene como objetivo principal mejorar la acción terapéutica de los principios activos aumentando su potencia y especificidad para lograr mejores tratamientos a las enfermedades (Rabasco Álvarez & González Rodríguez, 2010). Tanto la elección de la forma farmacéutica como de los excipientes de la formulación pueden determinar el proceso de LADME de un fármaco; así, es posible generar diferentes opciones en el desarrollo de fármacos para obtener una liberación controlada (Debotton & Dahan, 2017; Rabasco Álvarez & González Rodríguez, 2010; Roost et al., 2021). Entre las ventajas que ofrecen los sistemas de liberación controlada es que pueden formularse para liberar en una sección específica del intestino. Esto a su vez permite que estas formulaciones se utilicen ampliamente en el tratamiento de enfermedades crónicas en las que se requieren dosis frecuentes (Bermejo et al., 2020).

En la formulación de formas farmacéuticas de liberación controlada se puede recurrir al uso de excipientes poliméricos, ya que la formación de matrices hace que el fármaco se difunda en ellas durante el transporte (Debotton & Dahan, 2017).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Justificación.

El principal objetivo del desarrollo de formas farmacéuticas es mejorar parámetros farmacocinéticos y reducir la toxicidad o los efectos secundarios que estos puedan originar. También es importante en la búsqueda de nuevas terapias para enfermedades en las que los tratamientos resultan invasivos o la eficacia no es suficiente para controlar o erradicar la enfermedad.

El descubrimiento del ARN de interferencia permitió el diseño e implementación de terapias que puedan ser utilizadas para disminuir la sobreexpresión de diversos genes y con ello desarrollar nuevas formas farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades genéticas o poco comunes. Sin embargo, las posibilidades que tienen los ácidos nucleicos de atravesar el sistema gastrointestinal sin perder su estabilidad son nulas debido al pH y la presencia de diversas enzimas y otros fluidos.

Se ha demostrado que los sistemas de liberación a base de nanomateriales son capaces de brindar mayor estabilidad al fármaco, protegiéndolo de fluidos o enzimas durante el transporte de la molécula y brindar mayor biodisponibilidad.

El problema predominante de una forma farmacéutica es su capacidad de transporte y liberación controlada de biomoléculas. Es por ello que actualmente se recurre al uso de nanoestructuras en el diseño de los fármacos, pues sus propiedades confieren estabilidad durante su transporte y liberación, y con esto aseguran la entrega de la molécula en su sitio diana.

Para superar los problemas técnicos y biofarmacéuticos en la actividad de los fármacos a base de ácidos nucleicos, como su estabilidad y baja biodisponibilidad, se han explorado estrategias basadas en sistemas autonanoemulsificantes de liberación de fármacos (SNEDDS). Los SNEDDS son una nanoemulsión termodinámicamente estable de aceite en agua (menor a 100 nm), los cuales han mejorado la solubilidad, estabilidad, tiempo de residencia en fluidos gastrointestinales y permeabilidad pasiva de moléculas hidrofóbicas, péptidos y ADN/ARN. Sin embargo, se han desarrollado pocas formas farmacéuticas para la

liberación específica de ácidos nucleicos para su uso en terapia de primera línea, o adyuvante en patologías como el cáncer. Para aumentar la captación/ retención en regiones blanco, se requiere de sistemas inteligentes que tengan ligandos con alta afinidad y reconocimiento específico de moléculas sobreexpresadas en las células de cáncer. Los sistemas particulados representan estrategias útiles para estos fines, dado sus tamaños de partícula, permeabilidad y capacidad de funcionalización y modificaciones superficiales.

El presente proyecto se basa en el diseño y preparación de una forma farmacéutica basada en un sistema nanoestructurado para el transporte y liberación de siRNA, con el fin de obtener una opción viable de tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, además de una opción tecnológica adecuada y funcional para el transporte de ácidos nucleicos.

3.2 Pregunta de investigación.

¿Una forma farmacéutica de liberación modificada será capaz de transportar y liberar siRNA contenido en un sistema autonanoemulsificante de liberación de fármacos, como alternativa en el diseño de fármacos de la terapia génica?

3.3 Hipótesis.

La síntesis y preparación de una forma farmacéutica para el transporte y liberación de siRNA basada en un sistema autonanoemulsificante de liberación de fármacos es una alternativa útil y viable en el diseño de nuevos medicamentos para terapia génica.

3.4 Objetivos.

Objetivo general.

Diseñar y caracterizar una forma farmacéutica para vía oral basada en un sistema autonanoemulsificante de liberación de fármacos nanoestructurado para el transporte y liberación de siRNA.

Objetivos específicos.

- a. Diseñar una formulación oral que permita el transporte y liberación *in situ* del siRNA.
- b. Determinar las características fisicoquímicas de la forma farmacéutica con siRNA basada en una formulación nanoestructurada.
- c. Evaluar la estabilidad de la formulación mediante pruebas fisicoquímicas.
- d. Caracterizar el transporte y liberación de siRNA desde la formulación farmacéutica.

4. MATERIALES Y MÉTODO

Diseño y formulación de la forma farmacéutica.

Se prepararon SNEDDS a partir de una formulación previamente establecida con ARN para determinar la eficiencia de carga (Morales-Becerril, 2022). Se realizó un cribado de excipientes para la formulación de la forma farmacéutica en el que se consideraron como factores principales:

- a) que estuvieran reportados en formas farmacéuticas orales,
- b) que fueran compatibles con más de una forma farmacéutica de administración oral,
- c) que pudieran brindar estabilidad a los SNEDDS y
- d) pudieran mantener la estabilidad de la molécula en diferentes valores de pH.

Se realizó un diseño factorial para determinar las concentraciones de los excipientes y se sometieron 15 formulaciones al azar a evaluación visual para determinar la estabilidad coloidal. Se seleccionaron las formulaciones que fueron capaces de mantener soluciones homogéneas y se sometieron a estudios de termoestabilidad evaluando principalmente la estabilidad coloidal de la formulación. Se seleccionaron cápsulas de gelatina blanda como forma farmacéutica de esta formulación. La pared de las cápsulas está formada de gelatina, polietilenglicoles de bajo peso molecular y colorante. La composición final de la formulación se determinó mediante pruebas de estabilidad fisicoquímica después del llenado de cápsulas. Se realizó la caracterización fisicoquímica de las cápsulas mediante medición de tamaño de partícula, potencial Z, pH y conductividad. Se evaluó la liberación de ARN evaluando cambios de pH similares a los encontrados en fluidos gastrointestinales. En la figura 3 se observa un diagrama general del diseño metodológico.

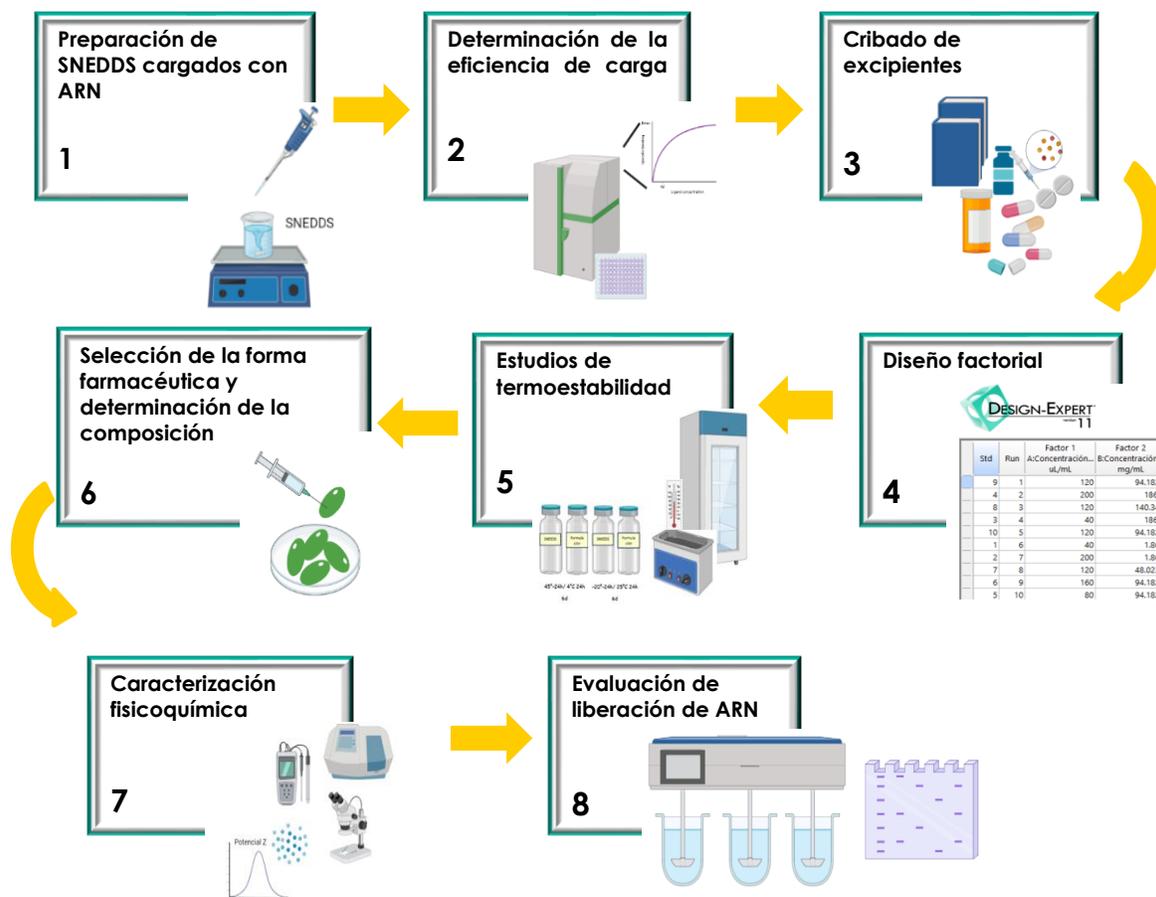


Figura 3. Diagrama metodológico.

4.1 Preparación de núcleos nanoparticulados.

La preparación de los SNEDDS se basó en la formulación previamente establecida por Morales-Becerril A. (Morales-Becerril, 2022), utilizando como excipientes un cosolvente (fosfatidilcolina), un surfactante (Cremophor RH40) y un compuesto lipídico (Labrafil). La preparación se realizó en las proporciones descritas a continuación:

Se mezcló una alícuota de 20 µL de quitosano al 0.25 % en ácido acético glacial al 1% con 80 µL de Phospholipon al 0.25 % en alcohol etílico y se agitó por 5 minutos en mezclador vórtex. Se adicionaron 148 µL de Labrafil y se agitó en vórtex durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 152 µL de Cremophor RH40 y se mezcló en vórtex durante 5 minutos. Finalmente, esta mezcla se agregó gota a gota en agua destilada mediante agitación

constante. La cantidad de agua destilada se determinó en función de las concentraciones de SNEDDS inicialmente seleccionadas para probar los excipientes (40, 80 y 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$); las cuales fueron consideradas como variables independientes; el tamaño de partícula, la resistencia a la coalescencia de la formulación y la termoestabilidad como variables dependientes (la concentración de los componentes se estableció con base en experimentos previos del grupo de investigación) (Morales-Becerril, 2022).

4.2 Obtención del complejo Nanopartícula-siRNA.

Para la carga de SNEDDS con ARN se formó el poliplejo con quitosano al 0.25 % en ácido acético 0.1 % mezclando en proporción 1:1 con ARN suspendido en agua libre de ARNasa como se indica a continuación:

Se mezclaron 10 μL de quitosano con 10 μL de ARN a diferentes concentraciones (6.4, 10, 15, 20 y 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Se agitó la mezcla durante 5 minutos en un vórtex y se colocó en un mezclador oscilante a 125 rpm durante 30 minutos. Al terminar, se centrifugó la muestra a 1500 rpm y 4 °C durante 30 minutos. La muestra se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se continuó la preparación de los SNEDDS conforme a la preparación descrita en el punto 4.1 a partir de la adición de Labrafil.

Para la determinación de la eficiencia de carga se extrajo el ARN de los SNEDDS con el método de TRIzol (Sambrook & Russell, 2001). Se realizó una curva de calibración con diluciones seriadas de ARN extraído de células T47D (línea celular de cáncer de mama) en agua libre de ARNasas en las siguientes concentraciones:

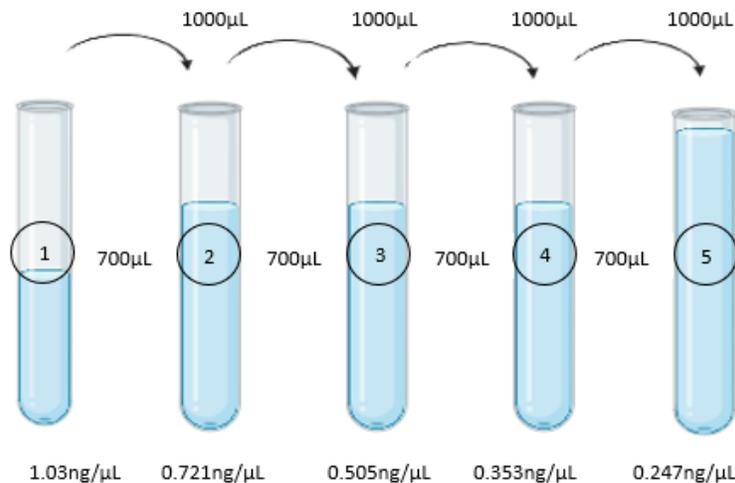


Figura 4. Preparación de curva de calibración de ARN para determinación de la eficiencia de carga.

Se realizó la cuantificación por espectrofotometría de fluorescencia considerando una longitud de onda de excitación 495 nm y una longitud de onda de emisión 500 nm.

4.3 Selección de excipientes de formulación para la forma farmacéutica.

Se realizó un cribado de excipientes mediante revisión bibliográfica, seleccionando como base de la formulación algunos polímeros para brindar estabilidad coloidal a la suspensión de nanopartículas y considerando como características principales excipientes que se han utilizado en formas farmacéuticas orales, de liberación controlada. Con lo anteriormente descrito, los excipientes seleccionados fueron Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), propilenglicol y sorbitol.

Se determinaron las concentraciones de los excipientes con base en las cantidades reportadas en formulaciones aprobadas (PLM, 2023a, 2023b, 2023c). El ajuste de las concentraciones se puede ver en la tabla 4:

Tabla 4. Concentraciones iniciales de excipientes para la formulación.

HPMC (mg/mL)	SNEDDS ($\mu\text{L/mL}$)
a) 36 b) 3.6 c) 0.36	40
a) 36 b) 3.6 c) 0.36	80
a) 36 b) 3.6 c) 0.36	200
Propilenglicol (mg/mL)	SNEDDS ($\mu\text{L/mL}$)
a) 72 b) 7.2 c) 0.72	40
a) 72 b) 7.2 c) 0.72	80
a) 72 b) 7.2 c) 0.72	200
Sorbitol (mg/mL)	SNEDDS ($\mu\text{L/mL}$)
a) 186.5 b) 18.65 c) 1.865	40
a) 186.5 b) 18.65 c) 1.865	80
a) 186.5 b) 18.65 c) 1.865	200

La afinidad de los excipientes se evaluó mediante la estabilidad termodinámica de la suspensión mediante ciclos de calentamiento/enfriamiento y congelación/descongelación (Morales-Becerril, 2022). Se midió la resistencia a la coalescencia por espectrofotometría UV-Vis y se evaluó la apariencia de la suspensión contrastando contra la apariencia de blancos de SNEDDS.

4.4 Optimización de la formulación.

Se elaboró un diseño de mezclas D-optimal utilizando el software Design-Expert 11, para determinar las concentraciones óptimas de cada excipiente. Se tomaron como variables independientes los excipientes y sus concentraciones, y como variables dependientes el tamaño de partícula; y la capacidad de preservar el carácter disperso de la nanoformulación.

Se seleccionaron algunas formulaciones al azar de cada diseño factorial y se prepararon con SNEDDS sin carga de ARN para evaluar la estabilidad fisicoquímica de los sistemas particulados con cada excipiente. En la tabla 5 se muestra la composición de las formulaciones.

Tabla 5. Selección de formulaciones para evaluación de apariencia (72 h; t.a.)

Formulación	SNEDDS ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	HPMC (mg/mL)	Propilenglicol ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Sorbitol al 70% ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Volumen de agua (mL)
FH2	120	9.27	-	-	880
FH3	40	36	-	-	960
FH6	200	0.36	-	-	800
FH9	80	18.18	-	-	920
FP2	40	-	72	-	888
FP4	120	-	36.36	-	843.64
FP6	120	-	18.54	-	861.46
FP8	160	-	36.36	-	803.64
FP10	200	-	72	-	728
FP11	80	-	36.36	-	883.64
FS1	120	-	-	134.54	745.46
FS6	40	-	-	2.66	957.34
FS7	200	-	-	2.66	797.34
FS8	120	-	-	68.6	811.4
FS9	160	-	-	134.54	705.46

FH: Formulaciones con HPMC, FP: formulaciones con propilenglicol, FS: formulaciones con sorbitol.

Nota: Las preparaciones descritas en esta tabla se llevaron a un volumen final de 1 mL para cada formulación.

Para la preparación de las formulaciones con HPMC se calentó agua destilada a 80 °C aproximadamente y se disolvió el HPMC correspondiente a cada muestra en el 50 % del agua destilada establecida para cada formulación (Guarve & Kriplani, 2021). De manera independiente se sintetizaron los SNEDDS conforme a la preparación descrita en el numeral 6.1 con el otro 50 % de agua destinado a la formulación y finalmente se adicionó al HPMC disuelto. Se mezcló con agitación lenta durante 2 minutos.

Las formulaciones con sorbitol se realizaron con el excipiente al 70 %, por lo que para las preparaciones se hizo un ajuste en la cantidad final a incorporar en la formulación (Ver tabla 5). Para las formulaciones con propilenglicol y sorbitol, se prepararon los SNEDDS de acuerdo con las proporciones indicadas en la tabla 5, en el total de agua destilada descrito para cada formulación y posterior a 5 minutos de agitación se adicionaron los excipientes. La agitación se continuó durante 2 minutos más.

Las muestras se mantuvieron en incubación durante 72 horas a temperatura ambiente (t.a.) y se evaluó la apariencia para seleccionar las formulaciones que se sometieron a ciclos de termoestabilidad.

Las formulaciones que se mostraron estables se prepararon nuevamente por duplicado a un volumen total de 1 mL. Los ciclos de temperatura fueron: a) 24 h a 45 °C/ 24 h a 4 °C, y b) 24 h a -20 °C/ 24 h a 25 °C, cada ciclo durante 6 días. Se preparó una muestra de SNEDDS como blanco de acuerdo con la concentración de la formulación respectiva a comparar; un blanco para cada ciclo de temperatura. Se evaluó la apariencia de las muestras cada 24 h, se tomaron muestras de 10 µL de cada una para hacer diluciones 1:10 y evaluar las muestras por espectrofotometría de luz UV-Vis. Se seleccionó una longitud de onda de 400 nm para evaluar estabilidad coloidal, debido a que todos los componentes del sistema se encuentran en un rango de 100 a 300 nm, incluyendo los excipientes a probar. Se determinó la capacidad para mantener la estabilidad coloidal mediante el cálculo de la desviación estándar.

4.5 Formulación de la forma farmacéutica.

Derivado del estudio de termoestabilidad, se determinaron las proporciones de los excipientes de la formulación, utilizando como excipientes sorbitol (52.8 % en la formulación) y propilenglicol (7.2 %). Las concentraciones para la formulación final se ajustaron conforme a las pruebas de estabilidad física de la cápsula. Para ello se preparó la formulación como se indica en el punto 4.1 hasta la adición del Cremophor (formación del poliplejo) en proporción a un volumen final de 200 μ L. La mezcla se agregó gota a gota a 200 μ L de buffer de fosfatos 20 mM pH 7.4 (se utilizó el buffer como fase acuosa para mantener el pH de la formulación en un rango de 7). Se agregaron 528 μ L de sorbitol mediante agitación constante durante 1 minuto y se adicionaron 7.2 μ L de propilenglicol. Se mantuvo la agitación durante 1 minuto más y con esta formulación se realizó el llenado de las cápsulas por inyección y una vez selladas se evaluó la estabilidad física de estas. Las cápsulas se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente en periodos de 24 horas y 30 días, y se evaluó el aspecto de la cápsula. Se midió la conductividad, pH y absorbancia y se utilizó una cápsula placebo vacía y una cápsula rellena sólo con agua. De cada cápsula se tomaron pequeños cortes de la pared y se analizó la textura de las cápsulas en un microscopio estereoscópico.

4.5.1 Caracterización Físicoquímica.

Una vez definida la formulación con los excipientes, se realizó el llenado de cápsulas de gelatina blanda (placebo de gelatina y polietilenglicol) para evaluar la cápsula y realizar la caracterización. Después de la evaluación de la estabilidad de las cápsulas, se inyectaron otras más con la formulación preparada con siRNA para la evaluación de la liberación.

Se realizó la medición de pH, conductividad eléctrica y medición de la absorbancia por espectrofotometría de luz UV-Vis a una longitud de onda de 400 nm para evaluar la estabilidad coloidal comparando los datos obtenidos con los resultados de absorbancia de las pruebas preliminares de formulación. Se realizó la evaluación del tamaño hidrodinámico de la forma farmacéutica, en comparación con el sistema nanoparticulado NP's-siRNA-

SNEDDS por DLS (dispersión de luz dinámica). La evaluación de la estabilidad de la molécula se realizó por medio de la determinación de potencial Z.

4.5.2 Evaluación de transporte y liberación.

Se preparó la formulación final incorporando ARN extraído de células T47d, unido al fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) en los SNEDDS, a partir de un estándar de ARN con una concentración de 1260.217 ng/ μ L. Considerando una proporción para la preparación de 300 μ L del lipoplejo, se tomaron 1.8 μ L del estándar y se mezclaron con 5.7 μ L de Buffer de ensayo DAPI y 7.5 μ L de quitosano al 0.25 % en ácido acético al 1 %. La preparación se continuó como se indica en el numeral 4.1.

El Buffer de ensayo DAPI se preparó a partir de un Buffer de NaCl 10 mM: EDTA 10 mM: Tris 10 mM, pH 7.0. Se diluyó Reactivo DAPI 1 mg/mL en el Buffer antes mencionado para obtener una concentración final de 0.1 mg/mL de DAPI (Thermo Scientific, 2023). El buffer de ensayo se conservó en refrigeración (4 °C) protegido de la luz.

Se evaluó la liberación de ARN con una prueba de disolución de las cápsulas de acuerdo con los métodos *MGA 0291 Disolución* y *MGA 0521 Liberación controlada* de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) (Secretaría de Salud, 2021). Se utilizó como medio de disolución ácido clorhídrico 0.1 N, pH 1.2 y solución amortiguadora de fosfato tribásico de sodio 0.2 M; pH 7.4, que fueron filtrados inmediatamente al vacío mediante un filtro de 45 μ m y desgasificados mediante calentamiento a 45 °C por sonicación (Secretaría de Salud, 2018). La prueba se ejecutó en un disolutor Erweka 600. Cada vaso fue llenado con 550 mL de medio de ácido clorhídrico 0.1 M previamente llevado a 37 °C y desgasificado por sonicación. Se colocó en cada canastilla una cápsula (n=5); la prueba se realizó a una temperatura de 37 °C y velocidad de 100 rpm. Se tomó la primera muestra mediante una alícuota de 2 mL de medio después de 1.5 h, a partir de este punto se tomaron muestras cada 0.5 h hasta un tiempo total de la prueba equivalente a 3 h (total de muestras: 4). Se continuó en medio ácido 0.5 h más y se tomó una segunda muestra. En seguida se adicionaron 200 mL de Buffer de fosfatos 0.2 M a pH 7.4, y 50 mL de NaOH 1 M para ajustar el pH a 6.8 aproximadamente y se continuó la prueba durante una hora más.

Las muestras se analizaron por espectrofotometría de fluorescencia a una longitud de excitación de 341 nm y longitud de emisión de 452 nm. Se tomaron 100 μL para realizar diluciones 1:2 y se compararon con una curva de ARN preparada con agua libre de ARNasa y utilizando DAPI 1 mg/mL. La curva se preparó por diluciones seriadas a partir de un estándar de ARN con una concentración de 1260.217 ng/ μL . Se tomaron 1.2 μL y se diluyeron en 100 μL de agua libre de ARNasa. Se adicionaron 1398.8 μL de Buffer de ensayo DAPI para llegar a un volumen total de 1500 μL y obtener una concentración de 1 ng/ μL . La solución se agitó durante 2 minutos en un mezclador vórtex. A partir de este punto se prepararon los siguientes puntos de la curva como se muestra en la figura 5. Se tomaron 100 μL de cada punto y se diluyeron en proporción 1:1 con agua libre de ARNasa.

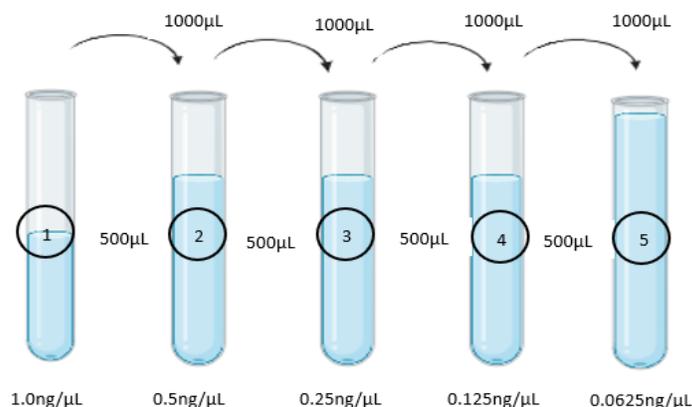


Figura 5. Preparación de la curva de calibración de ARN para análisis de liberación.

Se realizó un ensayo de electroforesis en gel de agarosa al 1 %, para lo cual se emplearon 6 cápsulas que fueron procesadas en un perfil de disolución con las características de la metodología antes descrita. Se utilizaron las muestras tomadas de los tiempos 2 (2 h) y 4 (3 h) para confirmar la presencia de ARN. Para ello se tomaron 500 μL de cada muestra y se añadieron 1000 μL de agua destilada a cada una. Se midió el pH de las muestras y se ajustó a pH 10. Las muestras se concentraron por evaporación y se reconstituyeron a 50 μL con agua destilada. Se tomaron 15 μL de muestra mezclados con 15 μL de Buffer de corrida (6X *TriTrack DNA Loading Dye*; *Thermo Scientific*, preparado a 1X con agua libre de ARNasa) y se colocaron 20 μL de cada muestra en los pozos de corrida. Como controles se utilizó

siRNA Cy3 (C= 60 ng/ μ L), ARN extraído de células T47d, incorporado en la formulación farmacéutica extraído por centrifugación (3000 rpm, 30 min, 4 °C). Se utilizó TAE 1x como Buffer de corrida, las muestras se colocaron en el gel como se muestra en la figura 6:

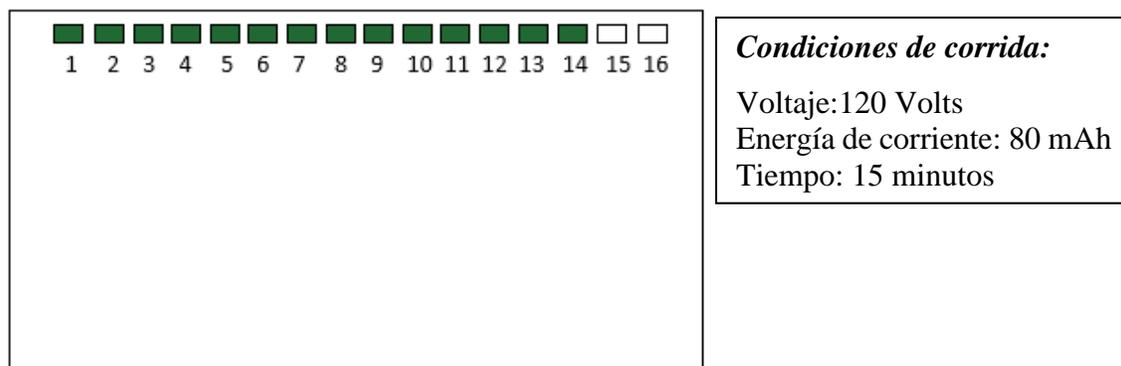


Figura 6. Esquema de electroforesis.

Las muestras se colocaron en las siguientes posiciones: 1: siRNA Cy3, 2: ARN FF, 3: C1M2, 4: C2M2, 5: C3M2, 6: C4M2, 7: C5M2, 8: C6M2, 9: C1M4, 10: C2M4, 11: C3M4, 12: C4M4, 13: C5M4, 14: C6M4

4.6 Análisis estadístico.

Los resultados se reportaron como media \pm desviación estándar (DE). Las diferencias significativas entre grupos se determinaron y evaluaron mediante pruebas de ANOVA y análisis de medias. Se utilizó el Software *OriginLab* para el análisis matemático de los datos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Preparación de núcleos particulados.

Las formas farmacéuticas orales ofrecen múltiples ventajas en la administración de medicamentos, principalmente porque son más cómodas para el paciente y esto permite completar los tratamientos terapéuticos con mayor eficiencia. Sin embargo, la formulación de formas farmacéuticas de administración oral se vuelve complicada para fármacos poco solubles en agua. Para ello se ha recurrido a diferentes tipos de formulación entre las cuales destacan las que están basadas en lípidos principalmente por mejorar la biodisponibilidad (Koehl et al., 2021).

Los sistemas nanométricos son sistemas que brindan propiedades específicas en la formulación de formas farmacéuticas para su administración, ya que se internalizan fácilmente en las células y facilitan el transporte de los fármacos (Rathod et al., 2022). A diferencia de otros sistemas nanoparticulados como los liposomas, los SNEDDS confieren una estabilidad mayor a moléculas que son poco solubles o presentan baja permeabilidad, lo cual permite una mayor biodisponibilidad del fármaco (Nikam et al., 2024).

En el experimento que se realizó para la optimización de la formulación se observaron soluciones homogéneas de SNEDDS. La característica principal del aspecto visual en las soluciones fue que las más concentradas se observaron más blanquecinas que las menos concentradas. Esto puede deberse a la naturaleza lipídica de las nanopartículas y a la concentración del poliplexo en cada concentración.

5.2 Obtención del complejo Nanopartícula-siRNA.

En el desarrollo del proyecto se utilizó ARN para evitar problemas de manipulación respecto a un estándar de siRNA y por reducción de costos en insumos. Para la determinación de la eficiencia de carga se tomaron los puntos 2, 4, 5 y un punto cero (sólo agua libre de ARNasas) de las preparaciones por diluciones seriadas para realizar la curva de calibración. Para optimizar la cuantificación de la carga máxima, se tomó la parte oleosa de la separación de fases en la extracción con TRIzol para hacer una segunda separación y así tratar de recuperar

todo el ARN posible. Se cuantificó el ARN de las muestras preparadas con las concentraciones probadas, tanto en la fase acuosa como de la fase oleosa. La curva de calibración y los resultados de cuantificación se muestran en la figura 7 y la tabla 6.

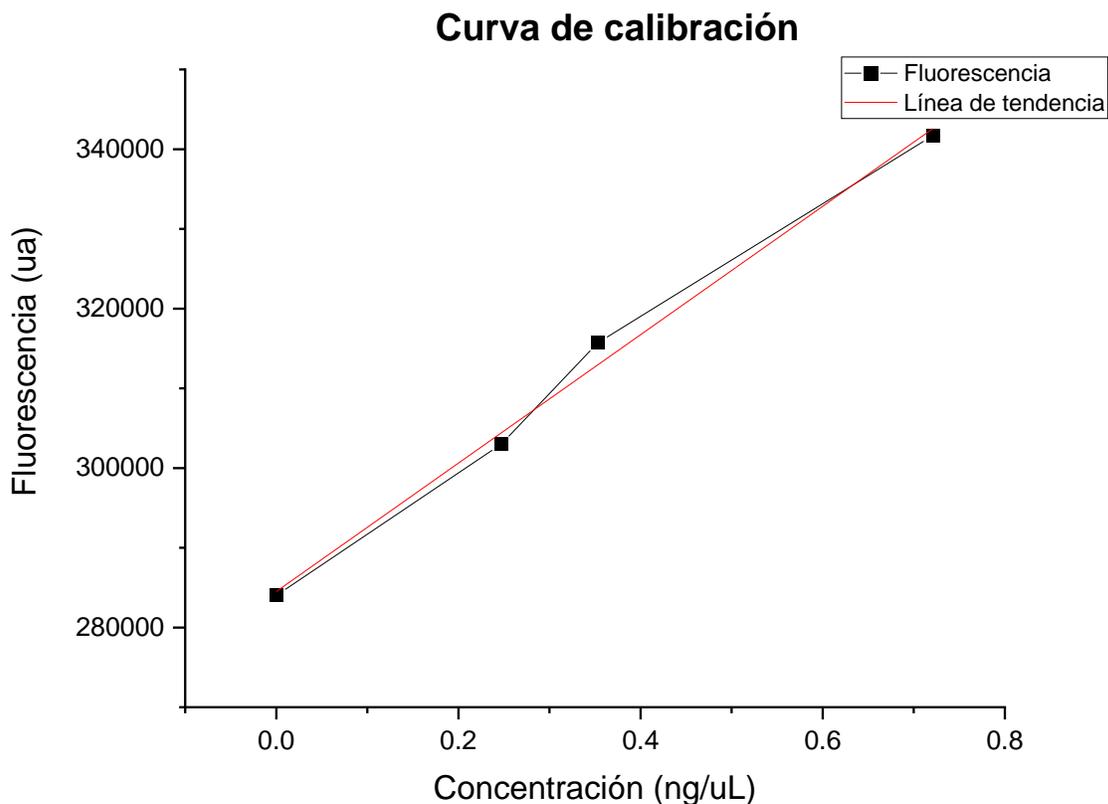


Figura 7. Curva de calibración de ARN. Determinación por espectrofotometría de fluorescencia.

Así, las concentraciones de carga de las muestras se calcularon a partir de la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y - 284510.9}{80538.5}$$

Se obtuvieron los siguientes resultados, con lo cual se determinó que la eficiencia de carga es de 1.14 ng/ μ L considerando el promedio de las cargas obtenidas para cada muestra.

Tabla 6. Cuantificación de ARN en SNEDDS para la determinación de eficiencia de carga

Muestra**	Fase acuosa		Fase oleosa		Carga total
	Fl*	ARN (ng/ μ L)	Fl*	ARN (ng/ μ L)	ARN (ng/ μ L)
SNEDDS 6.4	315170	0.3807	313544	0.3605	0.7412
SNEDDS 10	393926	1.3585	318036	0.4163	1.7751
SNEDDS 15	327576	0.5347	332231	0.5925	1.1272
SNEDDS 20	316867	0.4017	314779	0.3758	0.7775
SNEDDS 25	343183	0.7285	329849	0.5629	1.2914
Promedio					1.1424
SD					0.4233
<i>Fl*: Intensidad de fluorescencia</i>					
<i>**Unidad de carga de las muestras: ng/μL</i>					

5.3 Selección de excipientes de formulación para la forma farmacéutica.

En la formulación de formas farmacéuticas orales, una de las características a considerar es mejorar la solubilidad del fármaco, pues uno de los principales problemas que presentan algunos fármacos es la baja solubilidad en fluidos gastrointestinales (Debotton & Dahan, 2017). Los surfactantes no iónicos se caracterizan por ser menos tóxicos, ayudan a mantener el pH fisiológico y son menos agresivos en las superficies celulares. Son capaces de llegar a la membrana plasmática. Se utilizan ampliamente como aditivos en formulaciones farmacéuticas, mejoran la solubilidad de los fármacos y; por lo tanto, también la absorción. Promueven una mayor toxicidad en células cancerosas cuando son expuestas a fármacos citotóxicos (Rathod et al., 2022).

En las figuras 8, 9 y 10 se muestran los resultados del diseño factorial de las formulaciones para cada excipiente.



Std	Group	Run	Factor 1 a:Concentración... uL/mL	Factor 2 B:Concentración... mg/mL	Response 1 Coalescencia mV	Response 2 Termoestabilidad nm
11	1	1	120	27.09		
10	1	2	120	9.27		
2	2	3	40	36		
1	2	4	40	0.36		
4	3	5	200	36		
3	3	6	200	0.36		
5	4	7	120	18.18		
7	5	8	80	18.18		
6	5	9	80	18.18		
9	6	10	160	18.18		
8	6	11	160	18.18		

Figura 8. Diseño optimizado de formulaciones de HPMC.



Std	Run	Factor 1 A:Concentración... uL/mL	Factor 2 B:Concentración... uL/mL	Response 1 Termoestabilidad ABS	Response 2 Coalescencia mV
1	1	40	0.72		
3	2	40	72		
2	3	200	0.72		
10	4	120	36.36		
11	5	120	36.36		
7	6	120	18.54		
12	7	120	36.36		
6	8	160	36.36		
8	9	120	54.18		
4	10	200	72		
5	11	80	36.36		
9	12	120	36.36		

Figura 9. Diseño optimizado de formulaciones de propilenglicol.



Std	Run	Factor 1 A:Concentración... uL/mL	Factor 2 B:Concentración... mg/mL	Response 1 Coalescencia mV	Response 2 Termoestabilidad ABS
9	1	120	94.1825		
4	2	200	186.5		
8	3	120	140.341		
3	4	40	186.5		
10	5	120	94.1825		
1	6	40	1.865		
2	7	200	1.865		
7	8	120	48.0237		
6	9	160	94.1825		
5	10	80	94.1825		

Figura 10. Diseño optimizado de formulaciones de sorbitol.

5.4 Optimización de la formulación.

Una suspensión se mantiene estable cuando las fuerzas repulsivas entre moléculas impiden la formación de aglomerados. Esto se explica por efecto del movimiento browniano; las partículas de un sistema coloidal están expuestas a fuerzas de atracción y repulsión, en el que debe existir un equilibrio entre dichas fuerzas. Si las fuerzas de repulsión predominan las partículas permanecen separadas; en tanto que, si dominan las fuerzas de atracción, las partículas empiezan a aglomerarse (Champagne et al., 2018; Matusiak & Grządka, 2017). La teoría de Derjaguin-Landau Verwey-Overbeek (DLVO); que predice el comportamiento de suspensiones coloidales, explica este equilibrio mediante fuerzas de Vander Wals (atracción) y fuerzas electrostáticas de doble capa (repulsión). Así, una suspensión se mantiene estable cuando estas fuerzas se mantienen en equilibrio (Champagne et al., 2018; Matusiak & Grządka, 2017). El criterio de evaluación para estas muestras fue la capacidad de mantener una solución homogénea (una sola fase) y que no se presentara precipitación o formación de aglomerados.

Se utilizaron preparaciones blanco sólo con SNEDDS para realizar una comparación de la estabilidad de las muestras con las formulaciones que contenían los diferentes excipientes. En las preparaciones blanco, para los ciclos de -20 a 25 °C, se observa un cambio en la apariencia de las muestras de translúcidas a blanquecinas.

En la separación de fases de un sistema coloidal interfieren diferentes factores como la cinética del sistema estabilidad termodinámica, interacciones electrostáticas y estéricas. La literatura reporta que la estabilidad de un coloide puede aumentar con la adición de macromoléculas como tensoactivos o polímeros, ya que estos ayudan a mejorar las propiedades en la interfase del sistema (Matusiak & Grządka, 2017).

Para las muestras de HPMC, sólo la formulación 6 se mantuvo en una sola fase. Respecto a las muestras de propilenglicol, sólo la formulación 10 mantuvo estabilidad al presentar una sola fase y homogeneidad de la suspensión. Las 6 muestras de sorbitol presentaron estabilidad coloidal al mantener una sola fase. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Para todos los excipientes, las formulaciones que presentaron estabilidad coloidal no presentaron partículas en suspensión, turbidez en la formulación, ni separación de fases.

Para realizar los estudios de termoestabilidad se tomaron las preparaciones estables de cada excipiente conforme a las formulaciones mencionadas anteriormente. Se realizaron mediciones de absorbancia al término de cada ciclo (cada 24 h), la apariencia de las muestras y los resultados de absorbancia se describen en la tabla 8.

Tabla 7. Apariencia de formulaciones en incubación preliminar (72h, t.a.).

<p>Estabilidad de formulaciones de HPMC a 72h t.a.</p> <p>En las formulaciones 3 y 10 se formaron geles, imposibles de manipular. La formulación 2 presentó separación de fases. La formulación 6 presentó una apariencia homogénea, libre de aglomeraciones o precipitados y consistencia líquida.</p>	
---	--

Estabilidad de formulaciones de propilenglicol a 72h t.a.

Las formulaciones 2, 4, 6, 8 y 11 presentaron formación de precipitados.

La formulación 10 se mantuvo homogénea, con apariencia ligeramente opalescente.



Estabilidad de formulaciones de sorbitol a 72h t.a.

Todas las formulaciones se muestran homogéneas con una apariencia translúcida.



La espectrofotometría UV-Vis es muy útil para predecir el comportamiento de un sistema coloidal, pues la interacción del haz de luz con la materia puede presentar efectos de absorción, reflexión o refracción de la luz. Mediante la medición de la absorbancia se puede analizar la estabilidad de las suspensiones a través del tiempo. Si la absorbancia disminuye, podemos asumir que el sistema pierde estabilidad, pues las partículas sólidas empezarán a flocularse y precipitar (Matusiak & Grządka, 2017).

En la tabla 8 se observan los resultados promedio de las absorbancias medidas de cada ciclo para las diferentes formulaciones. La desviación estándar para todos los ciclos es menor a 1, por lo que podemos inferir que las muestras mantienen el sistema coloidal a lo largo del tiempo resistiendo al cambio de temperatura. De manera general se observa que el promedio de las absorbancias de los ciclos de congelación/descongelación es mayor a la de los ciclos de calentamiento/enfriamiento.

Tabla 8. Resultados de termoestabilidad de formulaciones.

Form*	μL/mL				Ciclos 45 a 4°C			Ciclos -20 a 25°C		
	X1	X2	X3	X4	ABS	D.V.	Ap*	ABS	D.V.	Ap*
1	200	-	-	-	0.024	0.0163	1	0.56	0.254	2
2	200	0.36	-	-	0.085	0.027	1	1.02	0.48	3
3	200	-	72	-	0.021	0.015	3	0.019	0.016	3
4	120	-	-	134.54	0.021	0.0219	3	0.25	0.105	2
5	40	-	-	2.66	0.013	0.0159	3	0.11	0.054	3
6	200	-	-	2.66	0.026	0.0188	3	0.501	0.226	2
7	120	-	-	68.6	0.021	0.0221	3	0.229	0.191	2
8	160	-	-	134.54	0.022	0.0186	3	0.302	0.133	2

Form*: Formulación
 Ap*: Apariencia
 Resultados de la evaluación de termoestabilidad: X₁=SNEDDS, X₂= HPMC, X₃=Propilenglicol, X₄=Sorbitol. 1=Solución homogénea blanquecina, 2=Solución blanca homogénea, 3=Solución translúcida, ligeramente blanca.

La tendencia de estabilidad de las muestras por excipiente se observa en las figuras 11-16. Como lo indican los gráficos en la figura 11, el HPMC muestra una tendencia muy similar a la estabilidad presentada por los SNEDDS blanco. La formulación de propilenglicol mostró la misma tendencia en ambos ciclos que los SNEDDS en el ciclo de calentamiento. Las

formulaciones preparadas con sorbitol mostraron tendencias similares a las preparaciones de los SNEDDS sin excipiente.

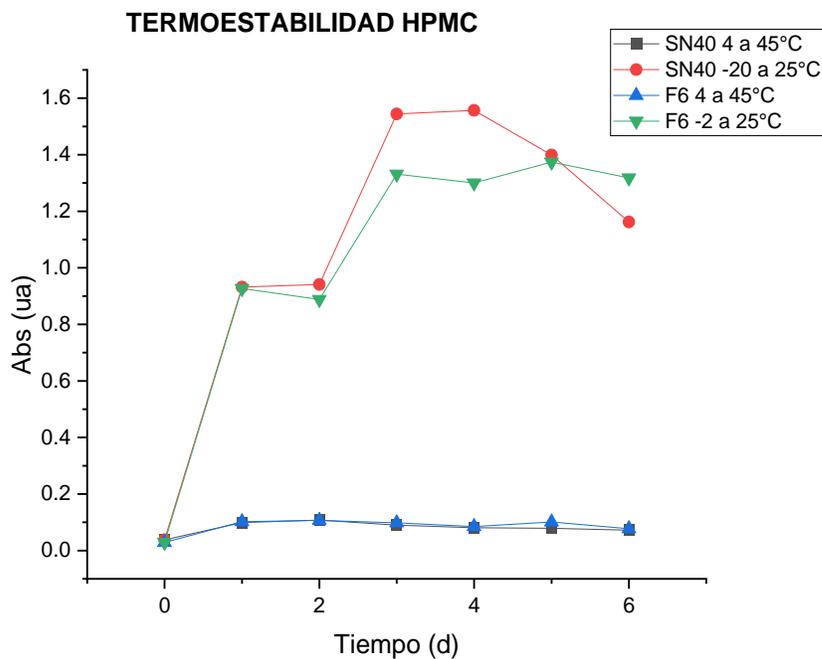


Figura 11. Termoestabilidad de muestras de HPMC sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).

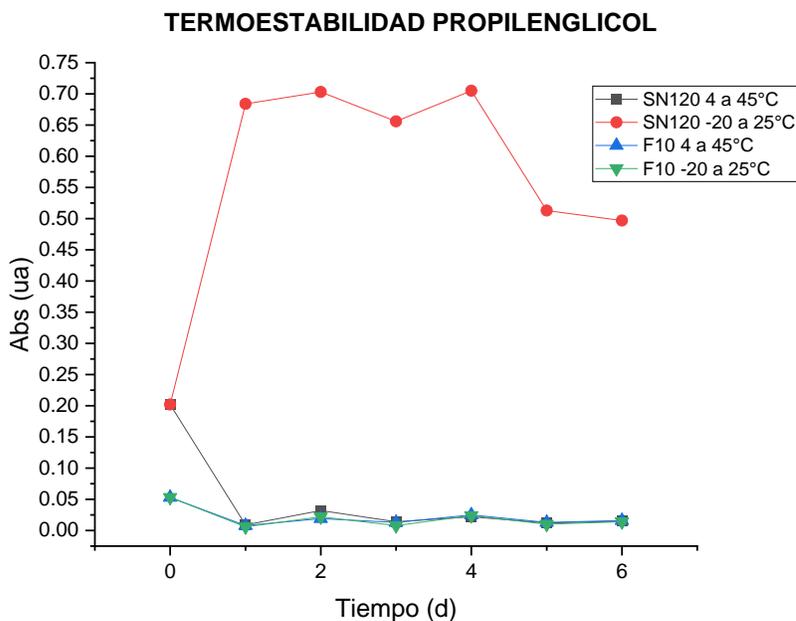


Figura 12. Termoestabilidad de muestras de propilenglicol sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).

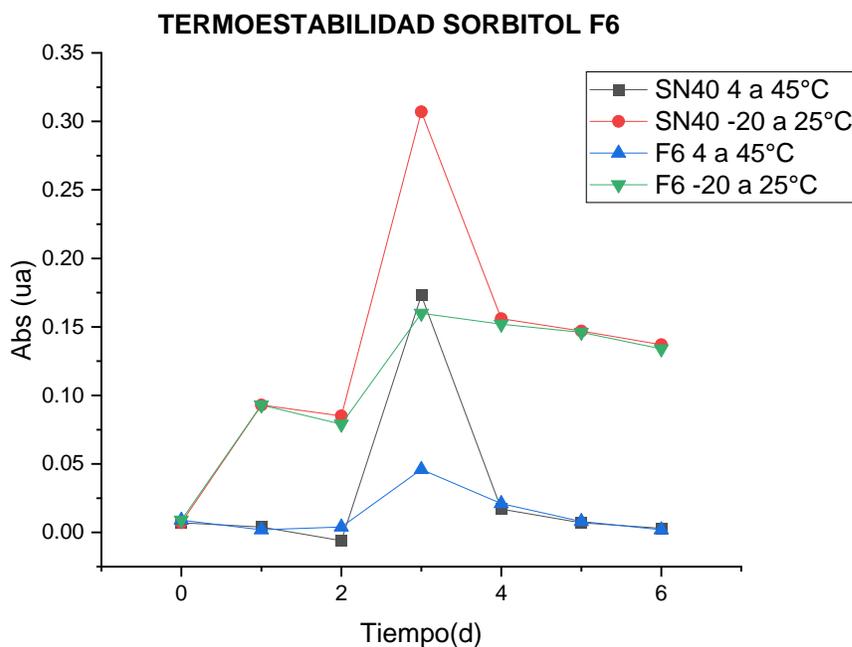


Figura 13. Termoestabilidad de muestras de sorbitol sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).

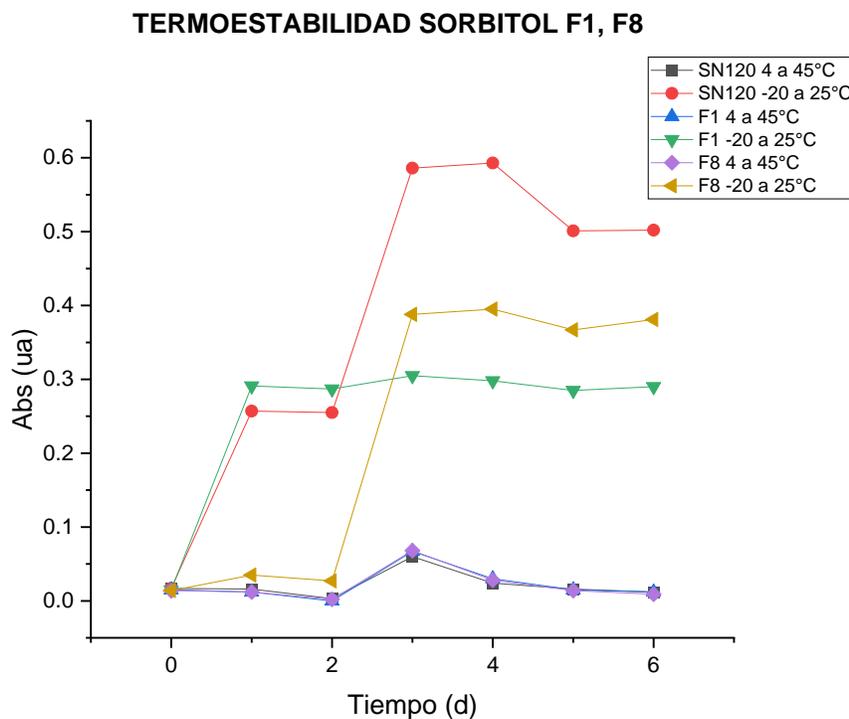


Figura 14. Termoestabilidad de muestras de sorbitol sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).

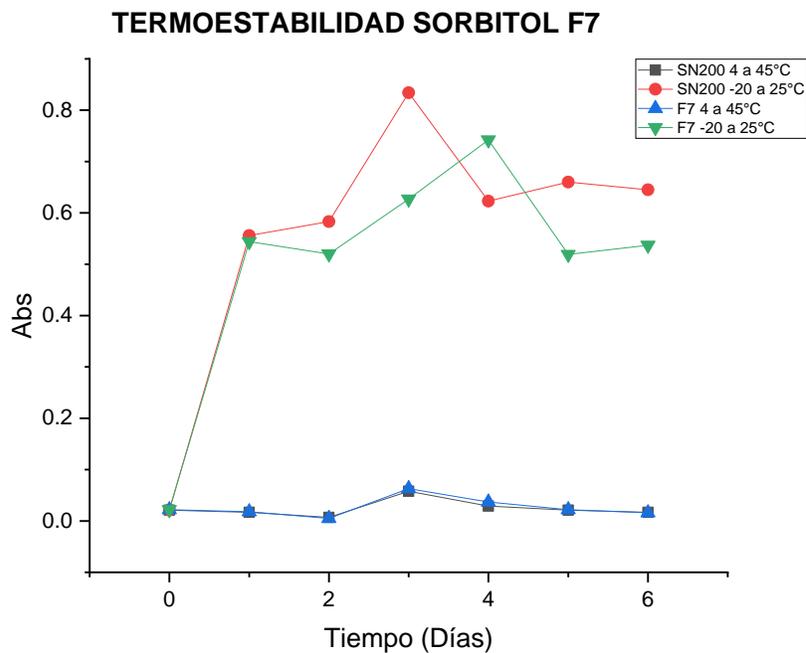


Figura 15. Termoestabilidad de muestras de sorbitol sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).

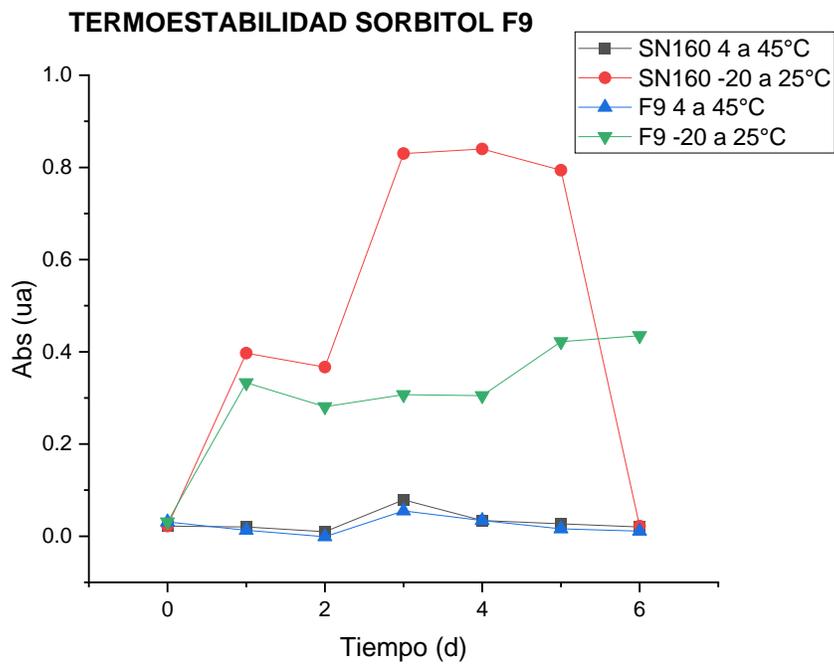


Figura 16. Termoestabilidad de muestras de sorbitol sometidas a ciclos de temperatura (4 a 45 °C; 20 a 25 °C).

La tendencia de estabilidad de las muestras por excipiente se observa en las figuras 11-16. Como lo indican los gráficos en la figura 11, el HPMC muestra una tendencia muy similar a la estabilidad presentada por los SNEDDS blanco. La formulación de propilenglicol mostró la misma tendencia en ambos ciclos que los SNEDDS en el ciclo de calentamiento. Las formulaciones preparadas con sorbitol mostraron tendencias similares a las preparaciones de los SNEDDS sin excipiente.

De manera general puede apreciarse en todas las formulaciones que la estabilidad coloidal sigue la misma tendencia que las preparaciones de SNEDDS sin excipiente. Se consideraron estables todas las formulaciones tomando en cuenta que se mantuvo la apariencia en las formulaciones a pesar de los cambios de temperatura, mantuvieron una sola fase sin formación de aglomerados y que estadísticamente no hay diferencias significativas en las mediciones de las absorbancias, considerando estas mediciones como una determinación de la resistencia a la coalescencia.

Tabla 9. Evaluación de tamaño de partícula y Potencial Z (variables dependientes).

Forma	Excipiente	Tamaño de partícula (nm)	Vol* (%)	PDI	Potencial Z (mV)	Viscosidad (cp)
F6	HPMC	44.1	100	0.880	+30.5	0.988
F10	Propilenglicol	326	1.1	0.329	+56.6	0.986
		43.1	98.9			
F9	Sorbitol	44.5	100	0.214	+31.0	0.988

Vol:* Volumen, porcentaje de la muestra referente al tamaño de gota.

Respecto a los valores reportados de viscosidad, podemos apreciar que no hay variación entre formulaciones. Esto tiene relación con el tamaño de gota de las formulaciones, ya que la adición de un tensoactivo reduce la tensión interfacial evitando que las moléculas en suspensión se fusionen. A menor tamaño de gota, mayor área superficial y; por tanto, la viscosidad aumentará (Ramírez-Nieto et al., 2019). El potencial Z para todas las formulaciones presenta valores positivos por encima de los 30 mV, estos valores nos muestran una estabilidad de las suspensiones ya que, a mayor carga en el plano de

deslizamiento, mayor repulsión entre las partículas y por consiguiente, hay mayor resistencia a la formación de aglomerados (Champagne et al., 2018; Matusiak & Grządka, 2017).

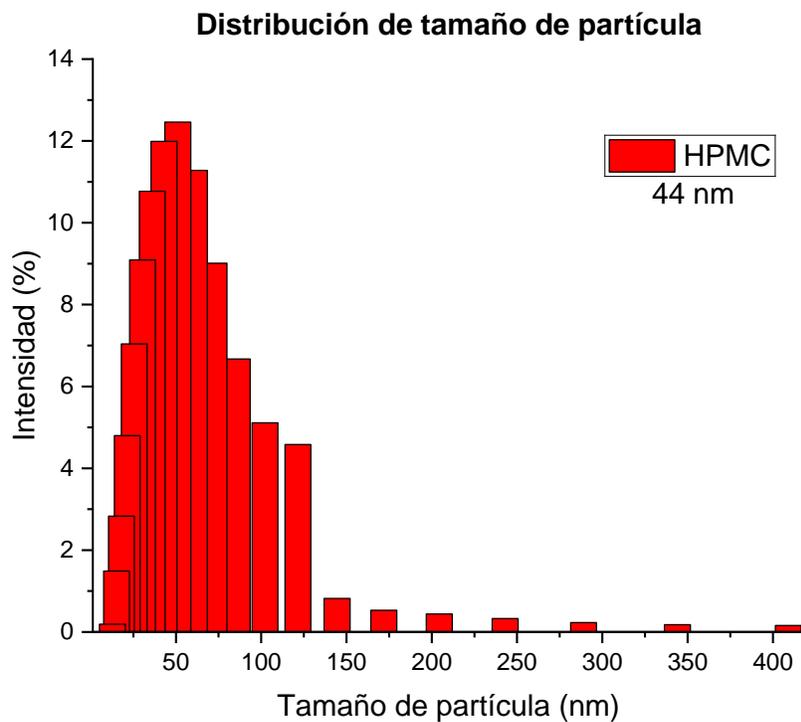


Figura 17. Distribución de tamaño de partícula. F6 HPMC.

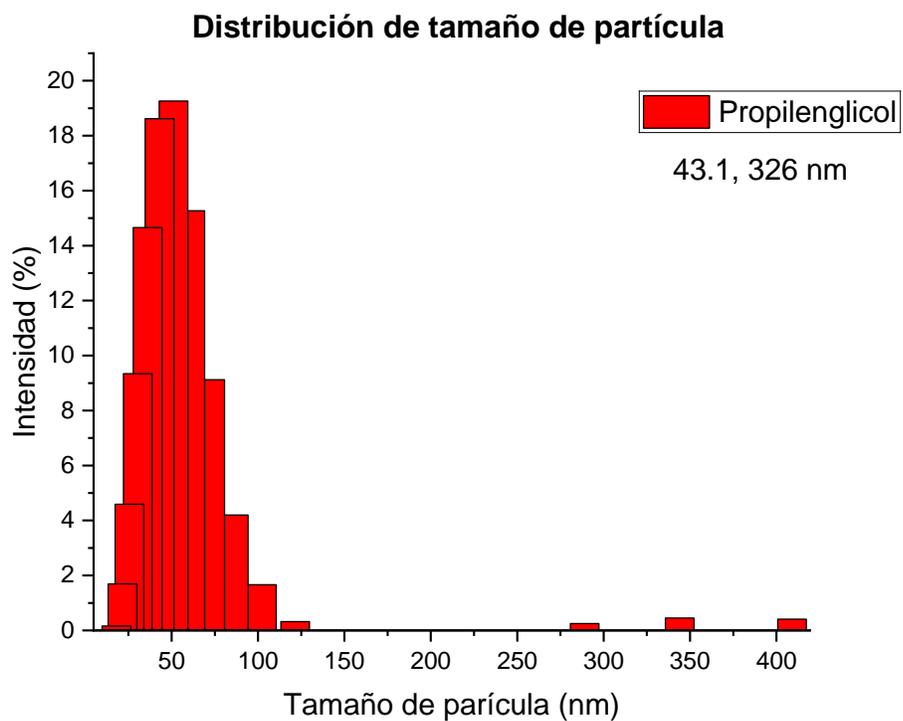


Figura 18. Distribución de tamaño de partícula. F10 Propilenglicol.

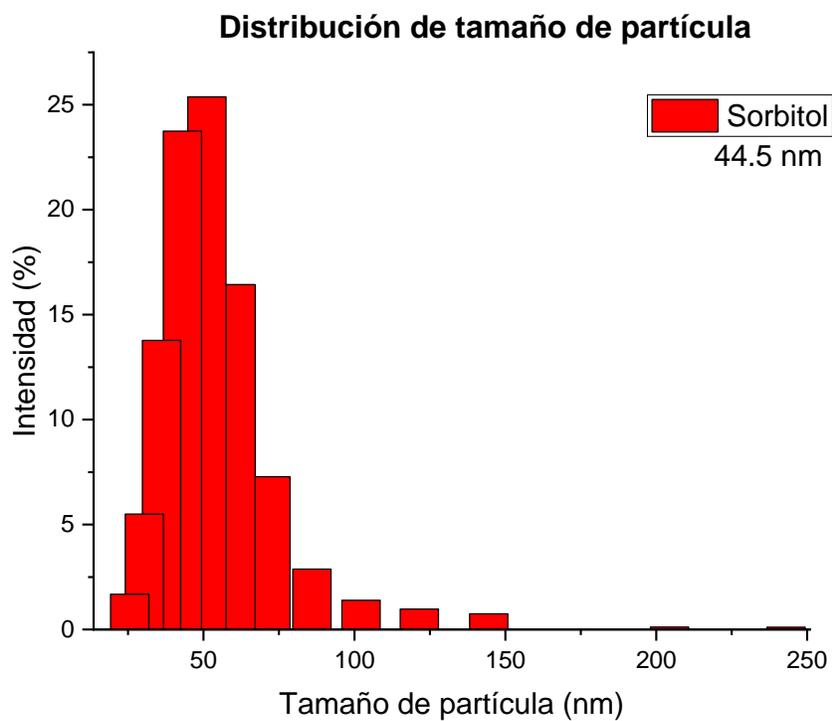


Figura 19. Distribución de tamaño de partícula. F9 Sorbitol.

5.5 Formulación de la forma farmacéutica.

La formulación final se determinó a partir de las concentraciones óptimas obtenidas de las pruebas de termoestabilidad. Se evaluó la estabilidad de la cápsula a 7 días del llenado con la formulación, para la cual, se mantuvo un pH cercano a 7 en la formulación mediante la inspección visual de las cápsulas y el análisis de la estructura de la gelatina en las paredes.

A pesar de que la formulación de SNEDDS mostró una gran estabilidad en HPMC, se descartó este excipiente de la formulación final debido a que las cápsulas no reaccionaron de manera favorable a este polímero. La estabilidad física de las cápsulas de gelatina blanda depende en gran medida de la humedad, tanto externa como interna de la cápsula. Se ha comprobado que la gelatina sufre degradación hidrolítica en medio acuoso y que el tiempo de degradación depende principalmente del pH y la temperatura (Gullapalli & Mazzitelli, 2017). Algunos estudios han demostrado que en un rango de pH de 4-7 la cápsula mantiene mayor estabilidad respecto a este tipo de degradación (Courts, 1954; Ling, 1978).

En la figura 20 se pueden apreciar las estructuras de la pared de las cápsulas que se sometieron a evaluación de estabilidad física. En la figura 20a se muestra la estructura de una cápsula placebo; en la cual se observa un estriado característico de la estructura helicoidal de la gelatina; en la figura 20b se muestra la estructura de una cápsula llena sólo con agua, donde se puede observar la formación de burbujas en la pared. Cuando la gelatina se expone a condiciones de humedad y temperatura altas, puede reaccionar con algunos de los excipientes de la formulación como polímeros (aniónicos y catiónicos) azúcares o iones y formar reticulación. Finalmente, la figura 20c muestra la estructura de la cápsula que contenía la formulación, en ella podemos apreciar un estriado similar al de la cápsula placebo. El uso de sorbitol como componente principal permite mantener la estabilidad de la forma farmacéutica, ya que es un polisacárido que ha sido utilizado como excipiente en la síntesis de la pared de cápsulas de gelatina blanda debido a que mantiene las estructuras de gelatina (Gullapalli & Mazzitelli, 2017).

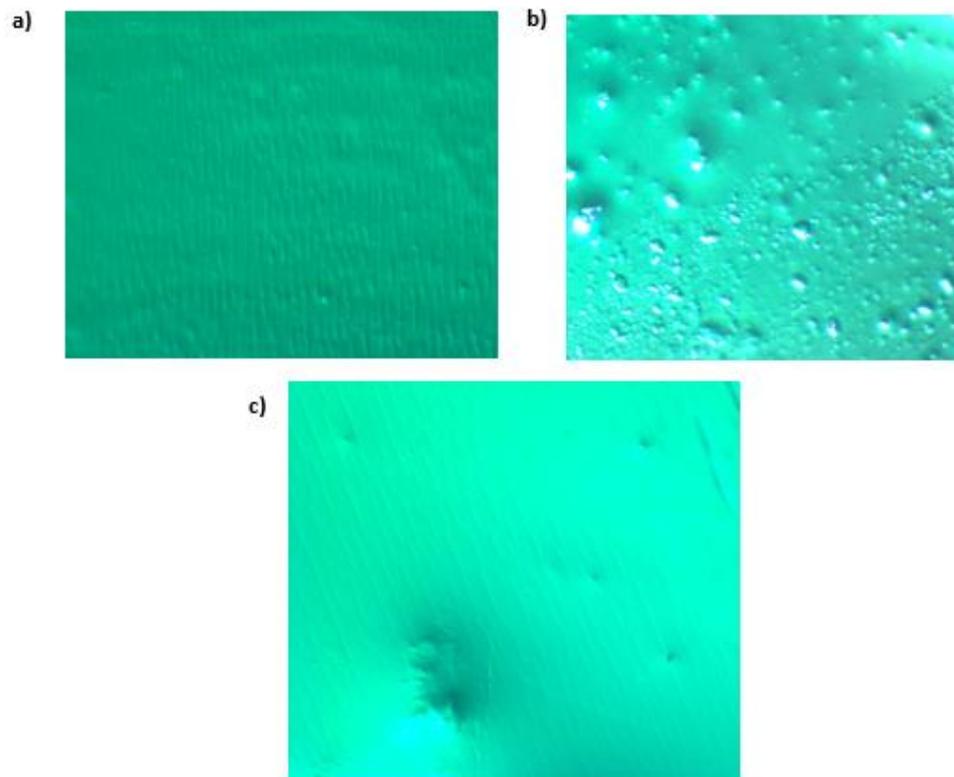


Figura 20. Microscopía estereoscópica de la cápsula sometida a la formulación final: a) Cápsula placebo, b) Cápsula blanco y c) Cápsula formulación.

5.5.1 Caracterización fisicoquímica.

Al ser un surfactante no iónico, el sorbitol brinda mayor estabilidad a los SNEDDS durante el transporte del principio activo, ya que tiende a resistir mejor los cambios de pH y así permite liberar a nivel de intestino, promueve una mayor difusión en las capas mucosas del intestino y mejora la absorción de los fármacos mediante mecanismos de difusión pasiva (Rathod et al., 2022; Smith et al., 2018). En la tabla 10 se observa que el tamaño de partícula obtenido por dispersión de luz dinámica es de 67.6 nm. Esto es favorable para la emulsión; ya que, a menor tamaño el área de superficie específica de los lípidos aumenta y esto promueve la acción de lipasas pancreáticas (Smith et al., 2018).

Para la fase acuosa en la que se formularon los SNEDDS, se utilizó buffer de fosfatos en lugar de agua destilada; esto con el objetivo de mantener un pH cercano a 7 en la formulación. El porcentaje de agua se redujo a una proporción 1:1 agua: políplejo para evitar daños en la

pared de la cápsula, ya que el agua puede migrar hacia las paredes y producir daños en la estructura (Koehl et al., 2021).

<i>Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos de la formulación.</i>						
Composición (%):		Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	Vol	Viscosidad
SNEDDS:	20	67.6	0.120	+0.6	100	0.983
Agua:	20					
Propilenglicol:	7.2					
Sorbitol:	52.8					

De manera independiente, los excipientes probados mostraron una buena estabilidad coloidal. De acuerdo con los datos presentados en la tabla 9, los valores de potencial Z de todas las formulaciones fueron superiores a ± 30 mV; sin embargo, la formulación final tuvo un valor de potencial Z de 0.6 mV. Se sabe que la adición de macromoléculas interviene en el desplazamiento del campo eléctrico, lo cual produce que el valor del potencial Z sea menor (Matusiak & Grządka, 2017). A pesar de que los tensoactivos no iónicos presentan valores de potencial negativos cercanos a cero, es probable que la concentración de sorbitol en la formulación modifique el valor del potencial; pues a mayor concentración de tensoactivo, el potencial Z tendrá una carga positiva baja (Vergara et al., 2022). También podemos observar que el valor del índice de polidispersidad (PDI) de la formulación final se redujo respecto a los valores de PDI de las formulaciones con los excipientes de manera individual. Esto es indicativo de que, en la formulación las partículas se encuentran monodispersas, por lo que la estabilidad coloidal se mantiene (Raval et al., 2019). Respecto al tamaño de partícula, la formulación final es ligeramente mayor a los tamaños de partícula presentados por las formulaciones con los excipientes individuales. No obstante, es menor a 200 nm; el tamaño ideal para mantener las características de la nanoemulsión que le permitan tener una mejor absorción (C.-Y. Wang et al., 2020).

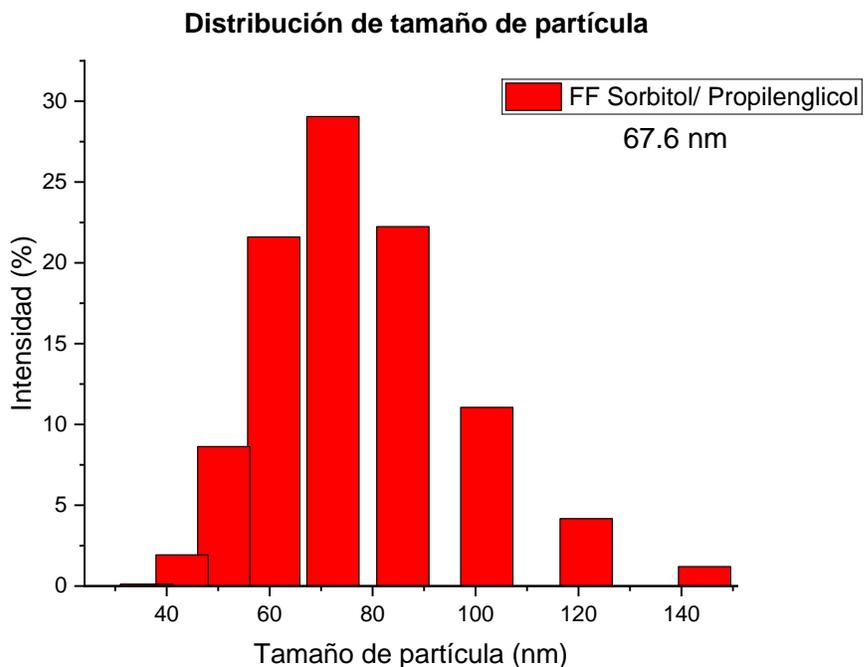


Figura 21. Distribución de tamaño de partícula. FF Sorbitol/Propilenglicol.

Se realizó la medición de algunos parámetros a diferentes tiempos de incubación para evaluar la estabilidad de las cápsulas (ver tabla 11):

Tabla 11. Mediciones de parámetros fisicoquímicos de la forma farmacéutica.

Muestra	ABS	pH	Conductividad (mV)
Cápsula libre	0.087	6.36	16
Cápsula Blanco	0.022	7.68	-31
Formulación t 0	0.021	7.25	-29
Formulación t 24 h	0.116	7.66	-30
Formulación t 30 d	0.220	6.93	3
Promedio	0.09	7.38	-21.75
Desviación Estándar	0.09	0.36	16.52

La conductividad eléctrica se evaluó mediante la medición de la diferencia de potencial. En la tabla 11 podemos observar que los valores son negativos, esto es indicativo de que la formulación es estable debido a que la repulsión de cargas es mayor considerando que los valores de diferencia de potencial son cercanos a ± 30 mV. Adicional a ello, a una mayor concentración de agua aumenta la conductividad eléctrica debido a que hay una mayor movilidad de iones, por lo que los cambios en la conductividad después de un periodo de tiempo pueden generarse por la concentración de agua que hay en la formulación (Ramírez-Nieto et al., 2019).

Durante la evaluación de la estabilidad de la cápsula se observó que el pH se mantuvo estable. Esto es relevante por varias razones: el potencial de hidrógeno (pH) influye en la carga superficial de las partículas; si el pH aumenta, las fuerzas electrostáticas disminuyen y esto favorece la formación de aglomerados (Champagne et al., 2018). Mantener un pH cercano a 7 brinda estabilidad al siRNA (Izquierdo-Rojo, 2014).

Con los valores obtenidos anteriormente y la evaluación física de las paredes de la cápsula, podemos predecir que la forma farmacéutica es estable al menos 30 días. Es necesario realizar pruebas posteriores a este estudio a partir de una evaluación de estabilidad acelerada.

5.5.2 Evaluación de transporte y liberación.

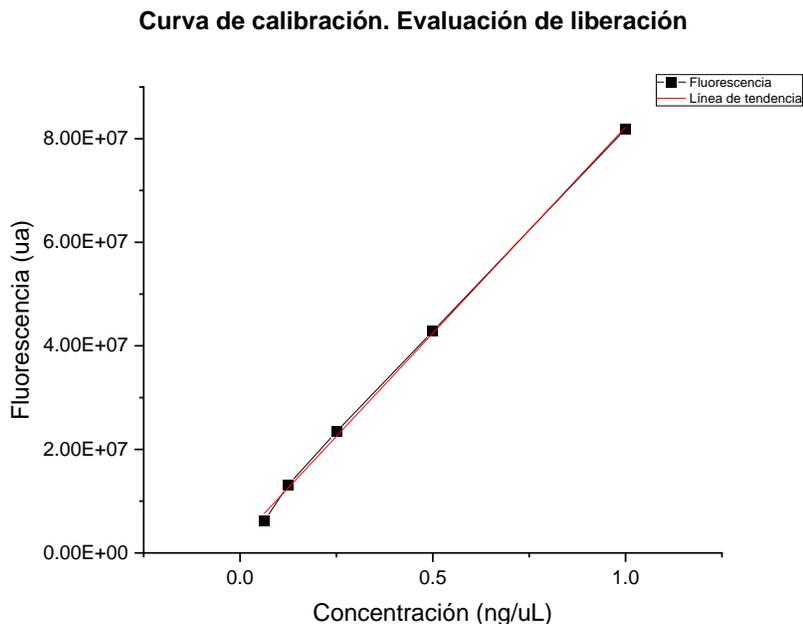


Figura 22. Curva de calibración. Perfil de disolución.

Debido a que en el ensayo de disolución no fue posible una cuantificación significativa debido a que la muestra representativa del medio contenía una cantidad nanométrica de ARN, se realizó un ensayo de electroforesis para asegurar la presencia de ARN en la muestra, confirmar la liberación y que no hubiese degradación. Sin embargo, se tomaron las mediciones de intensidad de fluorescencia para realizar el análisis estadístico de varianza (Ver figura 24) y las diferencias entre grupos son significativas; por lo que la prueba de disolución sugiere que la liberación de siRNA se obtiene mayoritariamente en condiciones similares a las del intestino. La tendencia de liberación se puede observar en la figura 23.

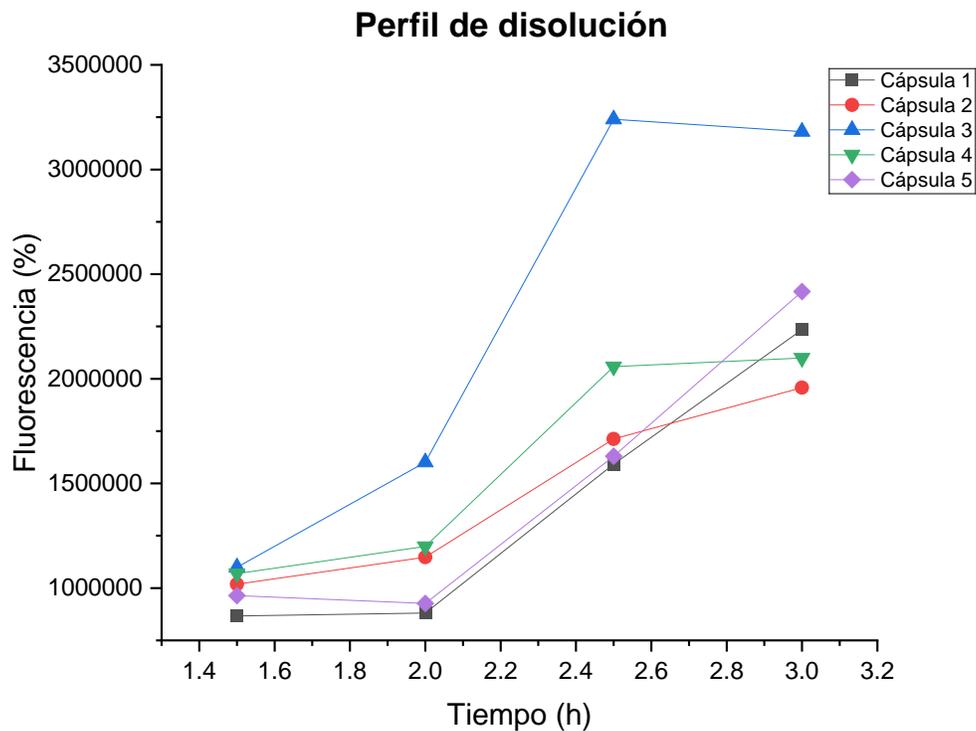


Figura 23. Perfil de disolución de cápsulas cargadas con ARN.

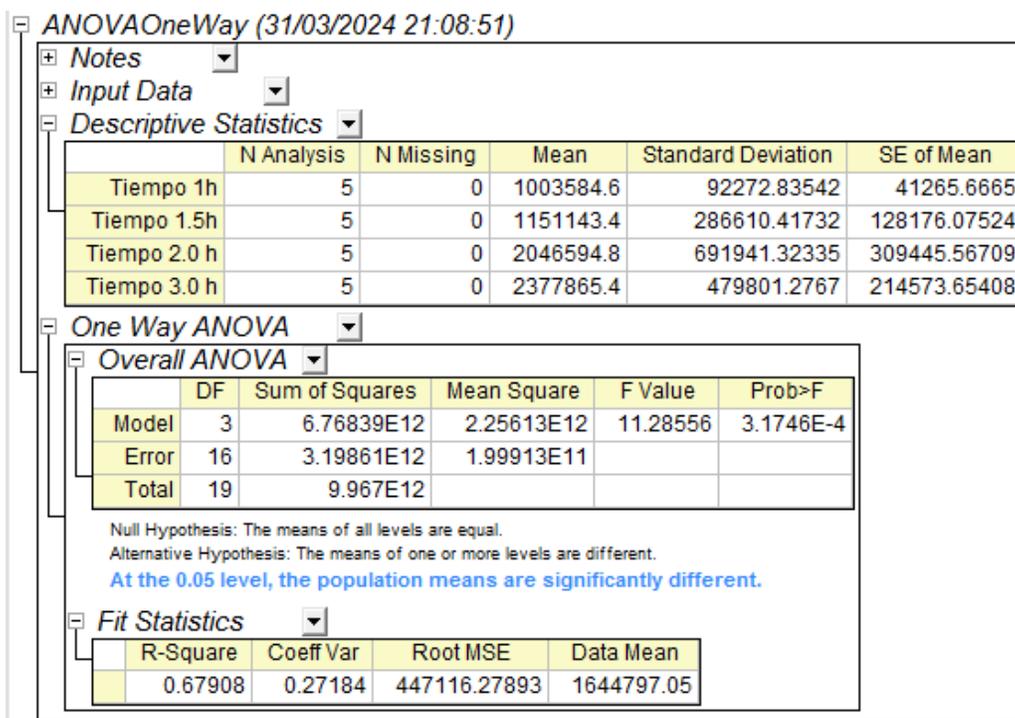


Figura 24. Análisis ANOVA del perfil de disolución

Para confirmar los resultados de liberación, se realizó un análisis de electroforesis en gel de agarosa, con el fin de visualizar la separación del ARN liberado de las cápsulas. En la figura 25 se observan los resultados del ensayo de electroforesis, en donde se observa que las muestras no tuvieron desplazamiento en el gel (pozos 3-14). En el pozo 1 se encuentra el control positivo de siRNA Cy3, un estándar fluorescente, el cual presenta desplazamiento; en el siguiente pozo se encuentra la formulación farmacéutica cargada con ARN de células T47D sin ningún tratamiento, como control para confirmar la presencia de ARN en la molécula. En los pozos 3 a 8 se encuentran muestras de las 6 cápsulas que se sometieron a pruebas de disolución tomadas en tiempo de 2h (pH 1.0). En los pozos 9 a 14 se encuentran muestras tomadas de la prueba de disolución en el tiempo 3.0 h. A pesar de que ninguna de las muestras tuvo migración de moléculas, se puede observar que las muestras tomadas en el punto de disolución $t=1.5$ h no presentan ninguna banda, mientras que las muestras tomadas al tiempo $t=3.0$ h muestran coloración en los pozos; lo cual puede ser indicativo de que la formulación no ha liberado el ARN en medio ácido. Las muestras de disolución $t=3.0$ se observan más intensas que la banda de la muestra control de la forma farmacéutica. Esto puede deberse a que la muestra control contiene el ARN al interior de las micelas de los SNEDDS formando un complejo con quitosano. El quitosano es un polisacárido de naturaleza catiónica que puede modificar sus propiedades químicas debido a sus grupos amina e hidroxilo. Algunas características que se pueden modificar del quitosano para mejorar la liberación de ARN para un silenciamiento génico óptimo son su peso molecular, el grado de desacetilación, método de formulación, adición de potenciadores de eficiencia y ligandos dirigidos, entre otros (Ragelle et al., 2013). En esta formulación se utilizó el quitosano de bajo peso molecular para formar un complejo con ARN ya que el quitosano posee en su estructura aminas primarias que se protonan fácilmente a un pH ligeramente ácido, lo cual genera cargas positivas que permiten la interacción con los ácidos nucleicos mediante fuerzas electrostáticas (Ragelle et al., 2013; Santos-Carballal et al., 2018). Las muestras que presentan mayor intensidad en las bandas se tomaron después de 3 horas de la prueba de disolución; en donde el medio simuló el pH a nivel de intestino (6.8). Adicional a ello se sometieron a un ajuste de pH para basificar las muestras con el objetivo de debilitar los enlaces de ARN formados con quitosano, por lo que es posible que esto permitiera una mayor manifestación del ARN en las muestras donde se esperaba mayor liberación, en

comparación con la muestra de la formulación donde la banda de ARN no es tan intensa. Las muestras se tomaron después de 3 horas de la prueba de disolución.

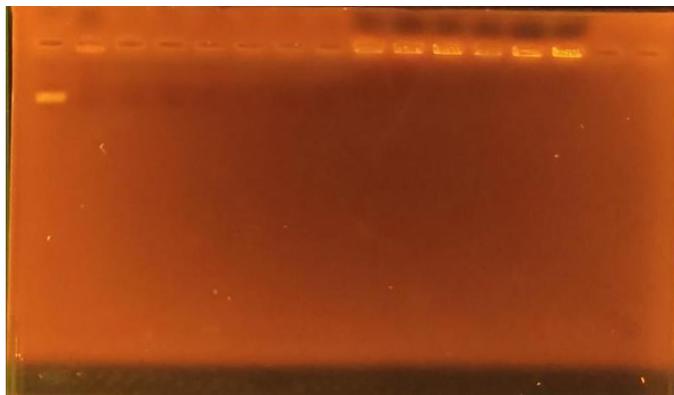


Figura 25. Ensayo de electroforesis.

Muestras de liberación; posición de pozos (izquierda a derecha: siRNA Cy3, ARN FF, C1M2, C2M2, C3M2, C4M2, C5M2, C6M2, C1M4, C2M4, C3M4, C4M4, C5M4, C6M4).

El quitosano es un polímero biodegradable en fluidos gastrointestinales, por lo que puede contribuir a la limitación de la liberación del siRNA a nivel de estómago (Debotton & Dahan, 2017); no obstante, en el estudio se demostró que en condiciones de pH mayor a 7, donde el quitosano pierde estabilidad, se puede romper el complejo formado con ARN y permitir la liberación de éste.

La estabilidad de un fármaco de administración oral puede verse afectada al atravesar por los diferentes valores de pH del tracto gastrointestinal. El pH de la saliva oscila entre 6.5 y 7.5; el pH gástrico se encuentra entre 1 y 2.5 y en duodeno puede ser entre 6.1 y 6.6. Los polímeros sensibles al pH se hinchan a determinado pH crítico en que los ácidos o bases débiles se ionizan. Este hinchamiento permite formar una barrera que controla la liberación del fármaco en el sitio deseado. Normalmente estos polímeros se componen de ácidos carboxílicos no ionizados insolubles a pH bajo (Debotton & Dahan, 2017).

Si bien no pudo determinarse la cinética de liberación a partir de los datos obtenidos en el perfil de disolución, el uso de excipientes poliméricos promueve la formación de matrices hidrofílicas en las que el fármaco se inserta y; al mismo tiempo, la erosión de la matriz permite la liberación del fármaco. Se espera que, si los pesos moleculares de los polímeros

utilizados son distintos, podrían obtenerse niveles de hinchamiento y erosión equivalentes; lo cual sugiere una liberación de orden cero (Bermejo et al., 2020).

6. CONCLUSIONES

Se formuló una cápsula de gelatina blanda como forma farmacéutica de liberación oral, la cual es capaz de transportar ARN incorporado en un sistema nanoestructurado (SNEDDS) que permitió una liberación modificada que puede mantener la estabilidad de la molécula a través de cambios de pH intestinales.

Se realizó la caracterización de la forma farmacéutica mediante análisis fisicoquímicos que permitieron comprobar la estabilidad coloidal de la formulación y la compatibilidad de los excipientes con las paredes de la cápsula. Se probó que la formulación es capaz de mantener un sistema nanoestructurado estable que, a su vez, puede mantener estable el siRNA durante su transporte y liberación, en condiciones similares a nivel del intestino. A partir de la evaluación de la estabilidad de la nanoemulsión en combinación con la proporción seleccionada de sorbitol/propilenglicol se logró determinar las características fisicoquímicas de la formulación. Se determinó que la cápsula es fisicoquímicamente estable, manteniendo activo el siRNA; aunque es necesario realizar pruebas de estabilidad acelerada en estudios posteriores para evaluar la forma farmacéutica una vez dirigida a una enfermedad específica.

Si bien en este estudio no fue posible determinar la cinética de liberación del ARN, se pudo demostrar que la formulación brinda estabilidad a los SNEDDS durante el transporte en el tracto gastrointestinal. El siRNA es liberado a pH similar al del intestino sin degradarse. Aunque estos estudios se limitan a confirmar que la liberación se realice al 100%, se pudo demostrar que el siRNA no pierde actividad después de la liberación.

7. PERSPECTIVAS

El desarrollo de fármacos implica múltiples estudios de caracterización y pruebas de estabilidad. En este estudio se enfatizó en pruebas de caracterización fisicoquímica que pudieran asegurar la estabilidad coloidal de los SNEDDS para garantizar una liberación *in situ* del principio activo. Se realizó una prueba de identificación por espectrofotometría de luz UV-VIS; sin embargo, las moléculas de los excipientes se encuentran en la misma región del espectro que el ARN, por lo que podría ser de utilidad realizar pruebas de identificación por Espectrofotometría infrarroja para detectar enlaces específicos. O bien, realizar estudios de HPLC no sólo como pruebas de identidad, sino también como análisis de cuantificación.

Debido a que las cantidades liberadas en la prueba de disolución no se pudieron cuantificar, sería preciso realizar estudios posteriores para establecer un método de liberación a nano escala que permitiera la cuantificación del siRNA liberado y de esta manera establecer una cinética de liberación más específica para posteriormente establecer una dosis terapéutica. Esto se puede lograr en conjunto con la determinación de eficiencia de carga; basados en la determinación realizada en este estudio y considerando el peso molecular del siRNA MDR1, podríamos estimar una capacidad de carga específica referente al peso molecular de un ácido nucleico y con ello determinar la dosis terapéutica. Esto es de gran utilidad para brindarle especificidad al fármaco, cuya intención es utilizarse como agente concomitante a fármacos quimioterapéuticos.

Una de las intenciones principales en el desarrollo de fármacos es brindar terapias más nobles para los pacientes y con mayor eficiencia. La inclusión de nanoacarreadores ha permitido mejorar la biodisponibilidad de los principios activos reduciendo la toxicidad. El uso de terapia génica mediante fármacos de administración oral es una alternativa que puede evolucionar el tratamiento de pacientes con enfermedades crónicas como el cáncer de colon, ya que mediante el uso de siRNA se puede lograr una terapia capaz de potenciar el efecto de quimioterapéuticos.

La Gp-P pertenece a la superfamilia de casetes de unión a ATP (ABC); actúa como barrera fisiológica en la célula, expulsa toxinas de las células y otras sustancias como los fármacos. Por esta razón es capaz de desarrollar resistencia a fármacos quimioterapéuticos (Rathod et

al., 2022; D. Wang et al., 2017). La Gp-P se encuentra en células epiteliales de intestino delgado y colon, entre otros tejidos. La sobreexpresión de Gp-P se ha relacionado con la ineficacia de tratamientos contra el cáncer. Con el desarrollo de esta forma farmacéutica se pretende formular un fármaco capaz de transportar siRNA codificante para el gen MDR1; el cual es responsable de la expresión de la Gp-P y se relaciona con la resistencia a agentes quimioterapéuticos (Viñolas et al., 2011), con el fin de desarrollar una alternativa en la terapia contra el cáncer de colon. La naturaleza no iónica de los excipientes de la formulación permite al principio activo llegar más rápido a la membrana celular y ayudan a que células cancerosas sean más sensibles a los fármacos quimioterapéuticos (Rathod et al., 2022).

Para evaluar el efecto terapéutico puede emplearse un estudio de viabilidad celular y un análisis de microscopía confocal y Western blot para observar la acumulación de siRNA en la célula.

8. REFERENCIAS

- Adams, D., Gonzalez-Duarte, A., O’Riordan, W. D., Yang, C.-C., Ueda, M., Kristen, A. V., Tournev, I., Schmidt, H. H., Coelho, T., Berk, J. L., Lin, K.-P., Vita, G., Attarian, S., Planté-Bordeneuve, V., Mezei, M. M., Campistol, J. M., Buades, J., Brannagan, T. H., Kim, B. J., ... Suhr, O. B. (2018). Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *New England Journal of Medicine*, 379(1), 11–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716153>
- Amreddy, N., Babu, A., Muralidharan, R., Panneerselvam, J., Srivastava, A., Ahmed, R., Mehta, M., Munshi, A., & Ramesh, R. (2018). *Recent Advances in Nanoparticle-Based Cancer Drug and Gene Delivery*. 115–170. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.11.003>
- Athanasios Valavanidis, & Thomais Vlachogianni. (2016). Engineered nanomaterials for pharmaceutical and biomedical products new trends, benefits and opportunities. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 4(1), 013–024.
- Bermejo, M., Sanchez-Dengra, B., Gonzalez-Alvarez, M., & Gonzalez-Alvarez, I. (2020). Oral controlled release dosage forms: dissolution versus diffusion. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(6), 791–803. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1750593>
- Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research*, 33(10), 2373–2387. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>
- Buduru, S., Zimta, A.-A., Ciocan, C., Braicu, C., Dudea, D., Irimie, A. I., & Berindan-Neagoe, I. (2018). RNA interference: new mechanistic and biochemical insights with application in oral cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 13, 3397–3409. <https://doi.org/10.2147/IJN.S167383>
- Champagne, P.-O., Westwick, H., Bouthillier, A., & Sawan, M. (2018). Colloidal stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the central nervous system: a review. *Nanomedicine*, 13(11), 1385–1400. <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0021>
- Chow, M. Y. T., Qiu, Y., & Lam, J. K. W. (2020). Inhaled RNA Therapy: From Promise to Reality. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(10), 715–729. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.08.002>
- Chrastina, A., Welsh, J., Borgström, P., & Baron, V. T. (2022). Propylene Glycol Caprylate-Based Nanoemulsion Formulation of Plumbagin: Development and Characterization of Anticancer Activity. *BioMed Research International*, 2022, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2022/3549061>
- Courts, A. (1954). The N -terminal amino acid residues of gelatin. 2. Thermal degradation. *Biochemical Journal*, 58(1), 74–79. <https://doi.org/10.1042/bj0580074>

- Cullis, P. R., & Hope, M. J. (2017). Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Molecular Therapy*, 25(7), 1467–1475. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.013>
- Debotton, N., & Dahan, A. (2017). Applications of Polymers as Pharmaceutical Excipients in Solid Oral Dosage Forms. *Medicinal Research Reviews*, 37(1), 52–97. <https://doi.org/10.1002/med.21403>
- Gane, E. J. (2017). Future anti-HBV strategies. *Liver International*, 37, 40–44. <https://doi.org/10.1111/liv.13304>
- Gangopadhyay, S., & Gore, K. R. (2022). Advances in siRNA therapeutics and synergistic effect on siRNA activity using emerging dual ribose modifications. *RNA Biology*, 19(1), 452–467. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2052641>
- Ghezzi, M., Pescina, S., Padula, C., Santi, P., del Favero, E., Cantù, L., & Nicoli, S. (2021). Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions. *Journal of Controlled Release*, 332, 312–336. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.031>
- Guarve, K., & Kriplani, P. (2021). HPMC- A Marvel Polymer for Pharmaceutical Industry-Patent Review. *Recent Advances in Drug Delivery and Formulation*, 15(1), 46–58. <https://doi.org/10.2174/1872211314666210604120619>
- Gullapalli, R. P., & Mazzitelli, C. L. (2017). Gelatin and Non-Gelatin Capsule Dosage Forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(6), 1453–1465. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.02.006>
- Iwakawa, H., & Tomari, Y. (2022). Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Molecular Cell*, 82(1), 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.026>
- Izquierdo-Rojo, M. (2014). *Curso de Genética molecular e Ingeniería genética* (1st ed.). Ediciones Pirámide.
- J. Blake, S., F. Bokhari, F., & A.J. McMillan, N. (2012). RNA Interference for Viral Infections. *Current Drug Targets*, 13(11), 1411–1420. <https://doi.org/10.2174/138945012803530161>
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
- Keam, S. J. (2022). Vutrisiran: First Approval. *Drugs*, 82(13), 1419–1425. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01765-5>
- Kim, B., Park, J., & Sailor, M. J. (2019). Rekindling RNAi Therapy: Materials Design Requirements for In Vivo siRNA Delivery. *Advanced Materials*, 31(49), 1903637. <https://doi.org/10.1002/adma.201903637>
- Knaub, K., Sartorius, T., Dharsono, T., Wacker, R., Wilhelm, M., & Schön, C. (2019). A Novel Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) Based on VESIsorb® Formulation Technology Improving the Oral Bioavailability of Cannabidiol in Healthy Subjects. *Molecules*, 24(16), 2967. <https://doi.org/10.3390/molecules24162967>

- Koehl, N. J., Shah, S., Tenekam, I. D., Khamiakova, T., Sauwen, N., Vingerhoets, S., Coppenolle, H., & Holm, R. (2021). Lipid Based Formulations in Hard Gelatin and HPMC Capsules: a Physical Compatibility Study. *Pharmaceutical Research*, 38(8), 1439–1454. <https://doi.org/10.1007/s11095-021-03088-8>
- Kofoed Andersen, C., Khatri, S., Hansen, J., Slott, S., Pavan Parvathaneni, R., Mendes, A. C., Chronakis, I. S., Hung, S.-C., Rajasekaran, N., Ma, Z., Zhu, S., Dai, H., Mellins, E. D., & Astakhova, K. (2021). Carbon Nanotubes—Potent Carriers for Targeted Drug Delivery in Rheumatoid Arthritis. *Pharmaceutics*, 13(4), 453. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040453>
- Kravatsky, Y. V., Chechetkin, V. R., Fedoseeva, D. M., Gorbacheva, M. A., Kretova, O. V., & Tchurikov, N. A. (2016). [Mutation frequencies in HIV-1 subtype-A genome in regions containing efficient RNAi targets]. *Molekuliarnaia Biologiia*, 50(3), 480–485. <https://doi.org/10.7868/S0026898416020117>
- Laffon-Lage, B., Valdiglesias-García, V., & Pásaro-Méndez, E. (2015). *¿Qué sabemos de? Terapia génica* (1a ed.). CSIC y Catarata.
- Lamb, Y. N. (2021). Inclisiran: First Approval. *Drugs*, 81(3), 389–395. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01473-6>
- Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., ... He, T.-C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*, 4(2), 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>
- Li, D., & Al-Jamal, K. T. (2021). *siRNA Design and Delivery Based on Carbon Nanotubes* (pp. 181–193). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1298-9_12
- Ling, W. C. (1978). Thermal Degradation of Gelatin as Applied to Processing of Gel Mass. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(2), 218–223. <https://doi.org/10.1002/jps.2600670223>
- Liu, C., Zhang, L., Zhu, W., Guo, R., Sun, H., Chen, X., & Deng, N. (2020). Barriers and Strategies of Cationic Liposomes for Cancer Gene Therapy. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 18, 751–764. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.07.015>
- Massy, Z. A., & Druke, T. B. (2022). Running interference: lumasiran and other RNA interference therapeutics for kidney diseases. *Kidney International*, 101(2), 208–211. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.05.027>
- Matusiak, J., & Grządka, E. (2017). Stability of colloidal systems - a review of the stability measurements methods. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio AA – Chemia*, 72(1), 33. <https://doi.org/10.17951/aa.2017.72.1.33>
- Mazayen, Z. M., Ghoneim, A. M., Elbatanony, R. S., Basalious, E. B., & Bendas, E. R. (2022). Pharmaceutical nanotechnology: from the bench to the market. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s43094-022-00400-0>

- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Morales-Becerril, A. (2022). *Desarrollo y caracterización de un sistema auto-nanoemulsionante de liberación de siRNA*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Morales-Becerril, A., Aranda-Lara, L., Isaac-Olivé, K., Ocampo-García, B. E., & Morales-Ávila, E. (2022). Nanocarriers for delivery of siRNA as gene silencing mediator. *EXCLI Journal*, 21, 1028–1052. <https://doi.org/10.17179/excli2022-4975>
- Moreno-Montañés, J., Bleau, A.-M., & Jimenez, A. I. (2018). Tivanisiran, a novel siRNA for the treatment of dry eye disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(4), 421–426. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1457647>
- NIKAM, P., JAIN, A., SOLANKI, D., & AHER, S. (2024). REVOLUTIONIZING PHARMACEUTICALS: A DEEP DIVE INTO SELF NANO EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEMS. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 1–9. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2024v16i1.4019>
- Park, E. J., Choi, S. A., Min, K. A., Jee, J.-P., Jin, S. G., & Cho, K. H. (2022). Development of Alectinib-Suspended SNEDDS for Enhanced Solubility and Dissolution. *Pharmaceutics*, 14(8), 1694. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081694>
- Pasi, K. J., Lissitchkov, T., Mamonov, V., Mant, T., Timofeeva, M., Bagot, C., Chowdary, P., Georgiev, P., Gercheva-Kyuchukova, L., Madigan, K., Nguyen, H., Yu, Q., Mei, B., Benson, C. C., & Ragni, M. V. (2021). Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with investigational siRNA therapeutic fitusiran—Results of the phase 1 inhibitor cohort. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 19(6), 1436–1446. <https://doi.org/10.1111/jth.15270>
- Paunovska, K., Loughrey, D., & Dahlman, J. E. (2022). Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nature Reviews Genetics*, 23(5), 265–280. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00439-4>
- Plaza-Oliver, M., Santander-Ortega, M. J., & Lozano, M. Victoria. (2021). Current approaches in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(2), 471–497. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00908-7>
- PLM. (2023a). *Diccionario de especialidades farmacéuticas*. Systane Ultra Unidosis. https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/systane_ultra_unidosis_solucion_ofthalmica_esteril/4/101/46980/173
- PLM. (2023b). *Diccionario de especialidades farmacéuticas*. Naturalag Lub. ALCON. https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/naturalag_lub_solucion_ofthalmica/4/101/8810/172

- PLM. (2023c). *Diccionario de especialidades farmacéuticas*. Glunovag. NOVAG. https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/glunovag_tabletas/121/101/7948/210
- Rabasco Álvarez, A. M., & González Rodríguez, M. L. (2010). Formas farmacéuticas innovadoras y formas farmacéuticas de liberación sostenida. In *Tratado de medicina farmacéutica* (1st ed., pp. 123–141). Editorial Médica Panamericana.
- Ragelle, H., Vandermeulen, G., & Préat, V. (2013). Chitosan-based siRNA delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 172(1), 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.005>
- Ramírez-Nieto, N., Baena, Y., & Osorio, C. (2019). Caracterización Físicoquímica de Emulsiones Aceite/Agua a partir de Uchuva (*Physalis peruviana*) como Ingrediente para la Industria Alimenticia. *Información Tecnológica*, 30(3), 147–156. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000300147>
- Rathod, S., Desai, H., Patil, R., & Sarolia, J. (2022). Non-ionic Surfactants as a P-Glycoprotein(P-gp) Efflux Inhibitor for Optimal Drug Delivery—A Concise Outlook. *AAPS PharmSciTech*, 23(1), 55. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02211-1>
- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., & Tekade, R. K. (2019). Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery* (pp. 369–400). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>
- Rehman, A. U., Akram, S., Seralin, A., Vandamme, T., & Anton, N. (2020). Lipid nanocarriers: Formulation, properties, and applications. In *Smart Nanocontainers* (pp. 355–382). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816770-0.00021-6>
- Rodríguez, F., Caruana, P., De la Fuente, N., Español, P., Gámez, M., Balart, J., Llurba, E., Rovira, R., Ruiz, R., Martín-Lorente, C., Corchero, J. L., & Céspedes, M. V. (2022). Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges. *Biomolecules*, 12(6), 784. <https://doi.org/10.3390/biom12060784>
- Roost, M. S., Potthast, H., Walther, C., García-Arieta, A., Abalos, I., Agostinho Freitas Fernandes, E., Mendes Lima Santos, G., Rodríguez Martínez, Z., Tam, A., Rodrigues, C., Gutierrez Triana, D. A., Guzmán Aurela, E., Rodríguez Rodríguez, N., Aeh Park, S., Kim, J., Kariv, R., Divinsky, M., Jones, B., Kuribayashi, R., ... Braddy, A. (2021). Requirements for Additional Strength Biowaivers for Modified Release Solid Oral Dosage Forms in International Pharmaceutical Regulators Programme Participating Regulators and Organisations: Differences and Commonalities. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 24, 548–562. <https://doi.org/10.18433/jpps32260>
- Rowe, R. (2006). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (R. C. Rowe, P. J. Sheskey, & S. Owen, Eds.; fifth). Pharmaceutical Press.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual* (Third edition, Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Santos-Carballal, B., Fernández Fernández, E., & Goycoolea, F. (2018). Chitosan in Non-Viral Gene Delivery: Role of Structure, Characterization Methods, and Insights in Cancer and Rare Diseases Therapies. *Polymers*, *10*(4), 444. <https://doi.org/10.3390/polym10040444>
- Scott, L. J. (2020). Givosiran: First Approval. *Drugs*, *80*(3), 335–339. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01269-0>
- Scott, L. J., & Keam, S. J. (2021). Lumasiran: First Approval. *Drugs*, *81*(2), 277–282. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01463-0>
- Secretaría de Salud. (2018). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Ed.; 12th ed., Vol. 1).
- Secretaría de Salud. (2021). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Ed.; 13th ed., Vol. 1).
- Singh, D. (2021). Self-nanoemulsifying Drug Delivery System: A Versatile Carrier for Lipophilic Drugs. *Pharmaceutical Nanotechnology*, *9*(3), 166–176. <https://doi.org/10.2174/2211738509666210422124023>
- Smith, L., Serrano, D. R., Mauger, M., Bolás-Fernández, F., Dea-Ayuela, M. A., & Lalatsa, A. (2018). Orally Bioavailable and Effective Buparvaquone Lipid-Based Nanomedicines for Visceral Leishmaniasis. *Molecular Pharmaceutics*, *15*(7), 2570–2583. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00097>
- Soriano, V. (n.d.). Hepatitis B Gene Therapy Coming to Age. *AIDS Reviews*, *20*(2), 125–127.
- Thermo Scientific. (2023). *DAPI (4',6-diamino-2'-phenylindole, dihydrochloride)*.
- Thielmann, M., Corteville, D., Szabo, G., Swaminathan, M., Lamy, A., Lehner, L. J., Brown, C. D., Noiseux, N., Atta, M. G., Squiers, E. C., Erlich, S., Rothenstein, D., Molitoris, B., & Mazer, C. D. (2021). Teprasiran, a Small Interfering RNA, for the Prevention of Acute Kidney Injury in High-Risk Patients Undergoing Cardiac Surgery: A Randomized Clinical Study. *Circulation*, *144*(14), 1133–1144. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.053029>
- Tian, Z., Liang, G., Cui, K., Liang, Y., Wang, Q., Lv, S., Cheng, X., & Zhang, L. (2021). Insight Into the Prospects for RNAi Therapy of Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.644718>
- van den Berg, F., Limani, S. W., Mnyandu, N., Maepa, M. B., Ely, A., & Arbuthnot, P. (2020). Advances with RNAi-Based Therapy for Hepatitis B Virus Infection. *Viruses*, *12*(8), 851. <https://doi.org/10.3390/v12080851>
- Vergara, E. G. C., Hernández, A. R. L., Rivas, N. V. G., García, U. P., & Martínez, A. M. M. (2022). Efecto de la conductividad y el Potencial Z sobre sistemas suelo-tensoactivo. *South Florida Journal of Development*, *3*(3), 4038–4045. <https://doi.org/10.46932/sfjdv3n3-075>
- Viñolas, N., Provencio, M., Reguart, N., Cardenal, F., Alberola, V., Sánchez-Torres, J. M., Barón, F. J., Cobo, M., Maestu, I., Moreno, I., Mesía, C., Izquierdo, A., Felip, E., López-Brea, M., Márquez, A., Sánchez-Ronco, M.,

- Tarón, M., Santarpia, M. C., & Rosell, R. (2011). Single nucleotide polymorphisms in MDR1 gen correlates with outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin plus vinorelbine. *Lung Cancer*, *71*(2), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.05.005>
- Waller, C. F. (2018). *Imatinib Mesylate* (pp. 1–27). https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8_1
- Wang, C.-Y., Yen, C.-C., Hsu, M.-C., & Wu, Y.-T. (2020). Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems for Enhancing Solubility, Permeability, and Bioavailability of Sesamin. *Molecules*, *25*(14), 3119. <https://doi.org/10.3390/molecules25143119>
- Wang, D., Xu, X., Zhang, K., Sun, B., Wang, L., Meng, L., Liu, Q., Zheng, C., Yang, B., & Sun, H. (2017). Codelivery of doxorubicin and MDR1-siRNA by mesoporous silica nanoparticles-polymerpolyethylenimine to improve oral squamous carcinoma treatment. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 13*, 187–198. <https://doi.org/10.2147/IJN.S150610>
- Wen, R., Umeano, A. C., Kou, Y., Xu, J., & Farooqi, A. A. (2019). Nanoparticle systems for cancer vaccine. *Nanomedicine (London, England)*, *14*(5), 627–648. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0147>
- Yadav, J. D., Othee, H., Chan, K. A., Man, D. C., Belliveau, P. P., & Towle, J. (2021). Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy—Current and Future Therapies. *Annals of Pharmacotherapy*, *55*(12), 1502–1514. <https://doi.org/10.1177/10600280211000351>
- Yang, M., Zhang, F., Yang, C., Wang, L., Sung, J., Garg, P., Zhang, M., & Merlin, D. (2020). Oral Targeted Delivery by Nanoparticles Enhances Efficacy of an Hsp90 Inhibitor by Reducing Systemic Exposure in Murine Models of Colitis and Colitis-Associated Cancer. *Journal of Crohn's and Colitis*, *14*(1), 130–141. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz113>
- Zhang, H., Men, K., Pan, C., Gao, Y., Li, J., Lei, S., Zhu, G., Li, R., Wei, Y., & Duan, X. (2020). Treatment of Colon Cancer by Degradable rrPPC Nano-Conjugates Delivered STAT3 siRNA. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 15*, 9875–9890. <https://doi.org/10.2147/IJN.S277845>
- Zhang, M. M., Bahal, R., Rasmussen, T. P., Manautou, J. E., & Zhong, X. (2021). The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochemical Pharmacology*, *189*, 114432. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114432>
- Zhongji Meng, M. L. (2017). RNA Interference- Induced Innate Immunity, Off-Target Effect, or Immune Adjuvant? *Frontiers in Immunology*.
- Zhou, Y., Zhao, X., Hu, W., Ruan, F., He, C., Huang, J., & Zuo, Z. (2021). Acute and subacute oral toxicity of propylene glycol enantiomers in mice and the underlying nephrotoxic mechanism. *Environmental Pollution*, *290*, 118050. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118050>