



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

Formulaciones de administración vaginal para
la prevención y tratamiento del VIH

Autor: Manuel Romero Aranda

Fecha: Junio 2019

Tutor: M^a Dolores Veiga Ochoa

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	2
2.1. VIH/SIDA	2
2.1.1. Agente etiológico.....	2
A. Ciclo biológico	2
2.2. Epidemiología	3
2.3. Manifestaciones clínicas	4
2.4. Transmisión.....	4
2.5. Tratamiento	4
2.6. Formas de prevención.....	5
2.6.1. Administración vaginal.....	6
2.6.2. Formulaciones	7
2.6.3. Geles	7
A. Quitosano	8
B. Pectina.....	9
C. Hidroxipropilmetilcelulosa	9
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
6. CONCLUSIONES.....	14
7. BIBLIOGRAFÍA	14

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana es un patógeno que infecta las células del sistema inmunitario, debilitándolas y provocando un deterioro de la respuesta inmune. El cuadro de deficiencia inmunológica que produce se conoce como síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Actualmente, casi 37 millones de personas están infectados por VIH a nivel mundial. Las mujeres y niñas del área subsahariana son las más vulnerables. Por ello, hay diversos programas destinados a frenar la expansión del VIH en África y a ayudar a estas mujeres con métodos de prevención que dependan exclusivamente de ellas mismas. Se estudian así formulaciones de administración vaginal tales como anillos, geles u óvulos a base de principios activos microbicidas. Entre estos compuestos, el Tenofovir está resultando eficaz y hay varios ensayos clínicos evaluando su efectividad.

OBJETIVOS

Tras realizar una revisión bibliográfica y adquirir una visión actualizada sobre el VIH a nivel mundial y de los geles de administración vaginal como forma de prevención, este trabajo se propone como objetivo la evaluación de la influencia del pH del medio empleado para la realización de geles de Tenofovir, sobre la consistencia y adhesividad de los mismos. La elección de los polímeros y medios responde a la experiencia adquirida durante los proyectos MAT2012-34552 y MAT2016-76416-R.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron quitosano, pectina e hidroxipropilmetilcelulosa, por ser respectivamente básico, ácido y neutro. Los vehículos en los que se desarrolló la evaluación fueron agua, fluido vaginal y mezcla de fluido vaginal y seminal 4:1, que son respectivamente neutro, ácido y básico. Se realizaron formulaciones blancas y con TFV a distintas concentraciones en los distintos medios. Se evaluó la consistencia y adhesividad de los geles con un analizador de texturas TA.XTplus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las formulaciones de quitosano no gelificaron, siendo su consistencia y adhesividad similares a los del agua, debido a que los vehículos no eran lo suficientemente ácidos. La pectina formó geles cuya consistencia y adhesividad no eran muy superiores a las del agua, demostrando que en ella influye la naturaleza del medio. Las formulaciones blancas a base de hidroxipropilmetilcelulosa formaron geles con buenas consistencia y adhesividad, especialmente en agua, que dependían de la concentración. Por ellos se seleccionaron para realizar formulaciones con Tenofovir en su composición. Los geles de hidroxipropilmetilcelulosa con Tenofovir gelificaron, pero sus consistencia y adhesividad eran menores que en las blancas. Esto indica que la presencia de Tenofovir aumenta la resistencia a la penetración y la capacidad de adhesividad de la hidroxipropilmetilcelulosa.

CONCLUSIÓN

El VIH sigue siendo un problema a nivel mundial que requiere intervención sanitaria para poder frenar su avance. Los microbicidas de aplicación vaginal resultan eficaces como formas de prevención. Los geles a base de Tenofovir se encuentran en ensayos clínicos y están dando buenos resultados. De la evaluación realizada, se concluye que la hidroxipropilmetilcelulosa es el mejor de los tres polímeros estudiados para formar geles a base de Tenofovir a distintos pH.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) son uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial debido principalmente a su elevada incidencia (un millón de infecciones diarias). Las ETS son infecciones que podrían evitarse fácilmente, y que aun así conllevan enfermedad, infertilidad, discapacidad y muerte. De todos los patógenos transmitidos por contacto sexual, nos centraremos en el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

2.1. VIH/SIDA

2.1.1. Agente etiológico

El VIH es un retrovirus que infecta células del sistema inmune, provocando así un deterioro progresivo en la función del mismo [1]. Su importancia actual radica en la sintomatología que desarrolla: un cuadro de inmunodeficiencia, conocido como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), para el que a día de hoy no existe cura. Los retrovirus (familia *Retroviridae*) se caracterizan por poseer su material genético en forma de ARN, de modo que para pasar a ADN con capacidad infectiva requieren de la acción de una ADN-polimerasa especial llamada retrotranscriptasa, transcriptasa inversa o transcriptasa reversa.

Existen dos serotipos de VIH: VIH-1 y VIH-2, que se diferencian a nivel clínico y epidemiológico fundamentalmente en que el período de incubación del VIH-2 es más largo y su evolución más lenta. Además, el VIH-2 se encuentra distribuido esencialmente en el continente africano. La partícula infectiva o virión del VIH está recubierta de una doble membrana lipídica sobre la que expresa proteínas que le permiten interactuar con las células del sistema inmune, mayoritariamente a los linfocitos T CD4⁺, pero también a macrófagos y células dendríticas. El VIH utiliza los nucleótidos del hospedador para sintetizar su ADN, con el que lo infecta. Puede permanecer en estado de latencia durante años, transcurridos los cuales se activa y deteriora el sistema inmunitario [2]. En el momento que se produce la infección, una activación del sistema inmune puede facilitar la multiplicación del virus, pues de esta manera puede infectar más linfocitos [3].

A. Ciclo biológico

El ciclo biológico del VIH es imprescindible para la identificación de dianas y diseño de estrategias terapéuticas. Está dividido en dos fases (Figura 1) entre las cuales hay un período de latencia que puede durar años [4]. Durante el estado de latencia o de integración provírica no hay replicación detectable del virus.

- a. La fase temprana comprende:
 - 1 - Fusión del virus a la célula diana tras interactuar con receptores.
 - 2 - La desencapsidación y liberación de enzimas al citoplasma del hospedador.
 - 3 - La retrotranscripción de su ARN en ADN.
 - 4 - El transporte del nuevo ADN al núcleo e integración en el genoma celular.
- b. Durante la fase tardía tiene lugar:
 - 5 - La transcripción y síntesis de proteínas víricas y de su ARN.
 - 6 - El ensamblaje de proteínas para formar nuevas partículas víricas que abandonan la célula huésped por gemación.
 - 7 - La maduración de viriones por escisión proteica.

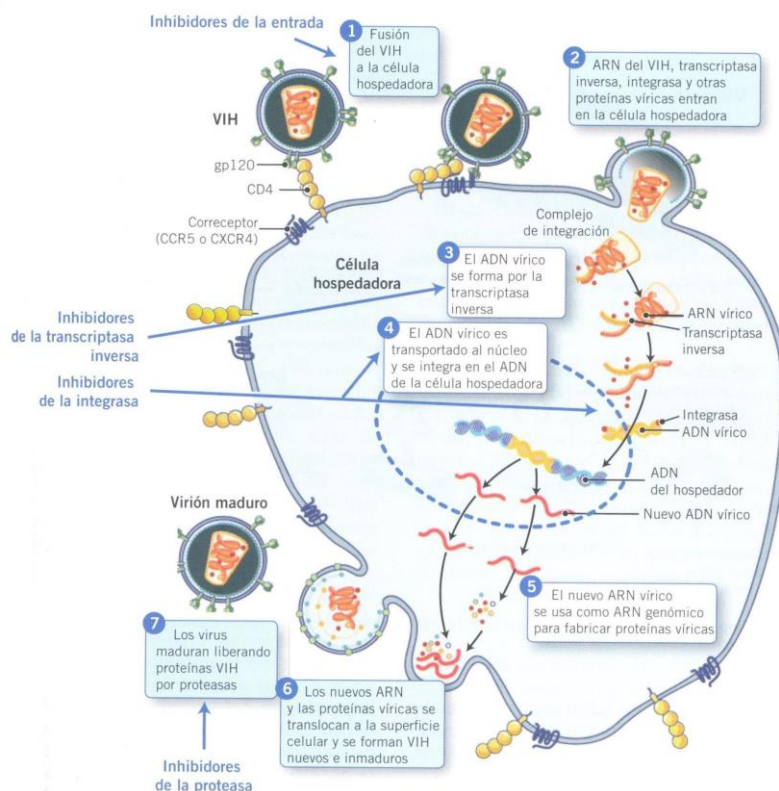


Figura 1. Ciclo biológico del VIH [4]

Tras lisar los linfocitos en los que se hospeda infecta a nuevos, produciendo de esta forma una disminución de las defensas del organismo y una pérdida de eficacia en la respuesta inmunológica. Como consecuencia aparece un cuadro de inmunodepresión conocido como SIDA. En estos casos, el recuento de linfocitos es inferior al de un individuo normal. Una persona sana tiene entre 500 y 1200 células T CD4⁺/mm³ sangre, mientras que un infectado con SIDA tiene menos de 200 [5].

2.2.Epidemiología

Desde que el SIDA fue reconocido como enfermedad en 1981 y se aislara dos años después al agente causal (VIH), se estima que 60 millones de personas han sido infectadas por él, de las cuales un 42% han fallecido [6]. El VIH tiene una enorme variabilidad genética y una rápida evolución lo que acarrea una enorme diversidad de poblaciones víricas [7].

A pesar de todos los esfuerzos realizados, el VIH no es algo del pasado. En 2017 había 36,9 millones de personas conviviendo con VIH, de las cuales un 69,6% estaban en la zona subsahariana [8]. Las guerras y violaciones, el comercio sexual y la transmisión vertical parecen ser las causas subyacentes. Anualmente, un millón de mujeres y niñas se infectan con VIH. La cultura, el estilo de vida y la violencia contra las mujeres de estos países conllevan una prevalencia mayor del VIH en las africanas. Además, estas mujeres tienen el doble de probabilidades de contraer VIH con respecto a los varones de su entorno debido a su poco o nulo poder de decisión sobre su vida sexual y la falta de aceptación y el uso inconstante del preservativo masculino. Las mujeres, por tanto, no tiene forma de protegerse contra el virus, por lo que se están desarrollando formas farmacéuticas de administración vaginal que contienen microbicidas en su formulación, cuya aplicación está contralada exclusivamente por las mujeres. La OMS ha establecido un programa que pretende acabar con la epidemia mundial de VIH para 2030. Los índices de mortalidad e incidencia bajan, sin embargo, la prevalencia continúa creciendo.

La infección con sífilis o herpes simple (HSV) triplica el riesgo de contraer VIH. En poblaciones subsaharianas con una prevalencia en torno al 80% de HSV, la mitad de las infecciones de VIH se atribuyen al HSV [1]. El HSV altera la barrera epitelial y promueve la activación de citoquinas proinflamatorias que son capaces de estimular la replicación del VIH [9].

2.3. Manifestaciones clínicas

La sintomatología depende de la etapa en que se encuentre el virus. En un 40-90% de los casos la primoinfección por VIH es sintomática, aunque puede pasar desapercibida por tratarse de síntomas inespecíficos similares a una gripe o resfriado, como fiebre, cefalea, erupciones, artralgias, fatiga o sudores nocturnos [10]. Tras la infección, el virus puede permanecer en estado de latencia durante años sin producir ninguna sintomatología característica.

Cuando el virus ha deteriorado la función inmune, aparecen infecciones oportunistas y cánceres asociados al SIDA, como neumonía por *Pneumocystis*, encefalitis por *Toxoplasma gondii*, tuberculosis [11], cáncer de pulmón [12] o anal [13]. La sintomatología es generalmente igual en varones y mujeres, aunque hay síntomas exclusivos de mujeres. Entre ellos destacan infecciones vaginales recurrentes y permanentes por hongos, enfermedad pélvica inflamatoria e infección por el virus del papiloma humano (HPV) [14].

2.4. Transmisión

El VIH se encuentra en fluidos corporales como el semen, los líquidos presemiales, las secreciones vaginales, los fluidos rectales, la sangre o la leche materna, de modo que la transmisión tendrá lugar cuando dichos fluidos entren en contacto con membranas mucosas o tejidos lesionados [1]. Por tanto, las formas de contagio más comunes serán sexo vaginal, anal u oral sin protección y las transfusiones con sangre contaminada o el uso compartido de jeringuillas o agujas. No obstante, también existen otros mecanismos como la transmisión vertical, de la madre al hijo durante el embarazo, el parto o la lactancia, o accidentes con instrumentos cortantes entre los personales sanitarios [15]. En cualquier caso, el contagio no tiene lugar a través del sudor, la saliva o la orina, ni por besos, abrazos o compartir objetos u alimentos con un infectado.

2.5. Tratamiento

Actualmente no existe ninguna cura para el VIH, sino tratamientos antirretrovirales (TAR) que regulan el avance de la enfermedad [1] [16]. Estos tratamientos tienen como objetivo la reducción de la carga vírica hasta niveles indetectables de modo que el sistema inmune se refortalezca, los infectados recuperen la inmunocompetencia y se eviten nuevos contagios. El tratamiento de la infección del VIH actúa sobre distintos puntos del ciclo biológico del virus (Figura 1) [4]. En la Tabla 1 se muestran los cuatro grupos farmacológicos actuales y ejemplos de principios activos. A día de hoy se sigue investigando sobre su ciclo biológico, de modo que es posible que se definan nuevas dianas y se diseñen nuevos principios activos frente a ellas.

Gracias al TAR se ha logrado desde 1996 reducir la morbimortalidad y aumentar la calidad de vida de los infectados. Ha pasado de ser una infección letal, a mantener bajo control la replicación del virus de modo que los infectados tengan una esperanza de vida similar a la de la población general. No obstante, persisten a día de hoy distintos retos [4]. Primeramente, lo más importante es que todavía no se ha conseguido eliminar al VIH de un paciente, ergo todo paciente requiere tratamiento de por vida. En segundo lugar, la manifestación de reacciones adversas dificulta el cumplimiento del tratamiento y por tanto se facilita el desarrollo de resistencias a los fármacos anti-VIH. En último lugar, el alto precio de los fármacos antirretrovirales conlleva un gasto sanitario desmedido en países desarrollados, mientras que en los países en vías de desarrollo supone una falta de acceso a los mismos.

Grupo farmacológico		Ejemplos
Inhibidores de la entrada	Inhibidores de la fusión	Enfurvirtida
	Inhibidores del correceptor CCR5	Maraviroc
Inhibidores de la transcriptasa inversa	Análogos de nucleósidos y nucleótidos (ITIAN)	Abacavir, Didanosina, Emtricitabina, Estavudina, Lamivudina, Tenofovir y Zidovudina
	No análogos no de nucleósidos (ITINN)	Efavirenz, Etravirina, Nevirapina y Rilpivirina
Inhibidores de la proteasa (IP)		Atazanavir, Darunavir, Fosamprenavir, Lopinavir, Ritonavir, Saquinavir y Tipranavir.
Inhibidores de la integrasa (II)		Dolutegravir, Elvitegravir y Raltegravir

Tabla 1. Grupos de fármacos para el tratamiento de la infección por VIH

Las recomendaciones de las OMS para el TAR es una combinación de tres principios activos con al menos dos mecanismos de acción diferentes [8]. El TAR actual de primera línea consiste en dos ITIAN + II: Tenofovir (una dosis diaria de 300 mg) + Lamivudina (una dosis diaria de 300 mg o dos dosis de 150 mg)/Emtricitabina (una dosis diaria de 200 mg) + Dolutegravir (una dosis diaria de 50 mg). Siempre y cuando pesen al menos 30 kilogramos.

En situaciones de riesgo, se recomienda también la vacunación para tratar de evitar el contagio de enfermedades en caso de inmunodeficiencia. También puede ser necesario tratar infecciones oportunistas con antibióticos como Trimetoprim y Sulfametoxazol.

2.6. Formas de prevención

Ningún método de prevención puede borrar la epidemia de VIH por sí solo, pero sí puede ayudar a frenarla. Hasta la fecha han resultado muy efectivos en la reducción del riesgo de infección métodos tan sencillos como el uso de preservativos masculinos y femeninos, la profilaxis de pre-exposición (PrEP → Tenofovir + Emtricitabina), la circuncisión voluntaria (por desaparición de las células del sistema inmunitario del prepucio [17]), la utilización de jeringas y agujas estériles, intervenciones de cambio de comportamiento sexual y tratamiento de infectados para reducir la transmisión [18].

Un microbicida es un compuesto químico usado por vía vaginal o rectal para producir la muerte o inactivar patógenos como virus, bacterias, hongos y protozoos [19]. El microbicida ideal debería ser activo frente a un amplio espectro de organismos causantes de ETS, ser compatible tanto con formulaciones espermicidas como no, efectivo al instante y durante largos períodos de tiempo, no irritante, fácil de usar y asequible. Los microbicidas protegen de las ETS al inactivar directamente al microorganismo, al generar barreras físicas entre las células y los patógenos o al aumentar los mecanismos de protección naturales del cérvix y la vagina [9].

Los microbicidas de primera generación consistían en surfactantes que alteraban las membranas celulares de los patógenos, polianiones (polisacáridos sulfatados) que se unían a los patógenos impidiendo su interacción con las células de la mucosa vaginal y tampones ácidos que mantenían el pH vaginal tras la eyaculación. Al no ser efectivos contra el VIH, fueron remplazados posteriormente por otros más específicos que contaban con fármacos antirretrovirales en su composición.

Los microbicidas con fármacos antirretrovirales han demostrado eficacia en primates y seguridad en ensayos clínicos en humanos [20]. Concretamente, el informe CAPRISA 004 [21] demostró que los geles de Tenofovir (TFV) al 1% eran capaces de reducir un 39% la incidencia del VIH y un 51% la del herpes simple. Por ello se han estado desarrollando diversas formulaciones a base de TFV.

El Tenofovir (Figura 2), con fórmula $C_9H_{14}N_5O_4P$, es un inhibidor de transcriptasa inversa análogo de nucleótido (ITIAN). En cuanto a su mecanismo de acción, es un fosfonato nucleosídico acíclico de la adenosina [22] que, a nivel intracelular, requiere dos fosforilaciones para inhibir competitivamente la transcriptasa inversa del VIH y provocar la terminación de la cadena tras incorporarse al ADN. No inhibe polimerasas humanas. También está aprobado para el tratamiento del virus de la hepatitis B. Se administra por vía oral en forma de profármaco hidrosoluble (disoproxilfumarato). Su biodisponibilidad es de un 25% en ayunas y de un 39% tras una comida grasa. Su semivida es de 12 a 17 horas, por lo que se recomienda una dosis diaria. Se elimina por filtración glomerular y secreción tubular activa, lo que supone un especial cuidado en pacientes que padezcan insuficiencia renal [4].

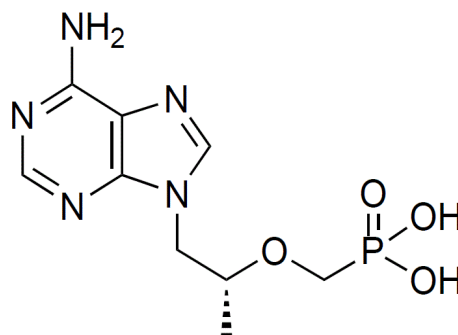


Figura 2. Estructura química del Tenofovir [46]

Se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos sobre la eficacia de los geles de TFV como formas de prevención. En 2018 se publicaron un total de seis, de los cuales destaca un estudio de Fase 3 que llegó a la conclusión de que no había diferencia significativa en la prevención de la infección de VIH entre las mujeres africanas que empleaban el gel de TFV 1% en comparación con aquellas que empleaban el placebo con la pauta indicada [20].

2.6.1. Administración vaginal

La vagina es el órgano copulador femenino y parte del canal del parto [23] [24]. Es un conducto fibromuscular distensible de unos diez centímetros de largo que se extiende atravesando el suelo pélvico desde el periné hasta el útero. Su parte inferior se abre al exterior a través del introito vaginal, mientras que su extremo superior se une al útero a través del fórnix o fondo de saco de la vagina. La estructura de la pared vaginal está íntimamente ligada a las funciones que desempeña. Se compone de mucosa, pared muscular y envoltura conectiva. La mucosa es un epitelio plano pluriestratificado aglandular, con células ricas en glucógeno. Es el glucógeno de las células descamadas el que es transformado por la flora vaginal (lactobacilos ácidos) a compuestos ácidos, confiriéndole de esta manera un pH en torno a 4. Cuando la mucosa está relajada se pliega. Durante el acto sexual se lubrica por trasudados. Por otro lado, la pared muscular recorre el conducto vaginal pudiendo dilatarse extraordinariamente en el momento del alumbramiento.

Con la administración de medicamentos por vía vaginal se buscan efectos mayoritariamente locales, aunque también sistémicos [25]. Entre las ventajas de la administración sistémica de fármacos, la más interesante es que se evita el efecto de primer paso hepático [26], obteniéndose así concentraciones plasmáticas más elevadas.

2.6.2. Formulaciones

A día de hoy existen distintas formulaciones diseñadas con la intención de que sea la mujer la responsable de su aplicación, tales como anillos, geles, óvulos y films, todos de administración vaginal [27] [28]. En la Farmacopea Europea están recogidas formas farmacéuticas como óvulos, comprimidos y cápsulas, y además reconoce soluciones, cremas, espumas y geles. No obstante, en cuanto a la prevención, existen también problemas que han de ser resueltos [29]. Primeramente, estas formulaciones deben quedarse el suficiente tiempo retenidas en el vagina, lo cual es dificultado por la fuerza de la gravedad y los flujos vaginales, que tratan de expulsarlas. En segundo lugar, algunas formulaciones pueden hincharse originando incomodidad en las pacientes. Y en tercer lugar, otro inconveniente no solo de las formulaciones vaginales sino de cualquier medicamento, es la adherencia al tratamiento. Para conseguir un buen cumplimiento es preferible un menor número dosis.

El reto actual es desarrollar y optimizar formas farmacéuticas que permitan frenar el avance del VIH, además de conseguir mayor adherencia al TAR. De entre todas las formulaciones, nos centraremos en los geles, que son los que se evaluarán.

2.6.3. Geles

Los geles son sistemas sólidos o semisólidos que consisten en una estructura coloidal formada por una fase continua o dispersante líquida en la que se encuentra embebida una fase dispersa compuesta por partículas o macromoléculas de tamaño coloidal [30]. La fase dispersa forma una red tridimensional que engloba a la fase líquida. Esta estructura es la responsable de las propiedades características de los geles, pues así la fase dispersa limita el movimiento de la fase continua impidiendo que fluya libremente, la fase dispersa confiere rigidez al sistema con su red tridimensional, y además la fase continua evita que las macromoléculas de la fase dispersa se compacten. El proceso de formación de un gel se conoce como gelación o gelificación.

Los enlaces existentes entre ambas fases pueden ser físicos, cuando sus enlaces son débiles como uniones de carácter hidrófobo o iónico o de tipo van der Waals, o químicos, si hay uniones de tipo covalentes, cuya ruptura supondría la degradación del gel. Los geles son formulaciones que se investigan desde hace años por sus aplicaciones en tecnología farmacéutica, entre otros campos. Sin embargo, la falta de control sobre la liberación de principio activo es un de los retos que tienen que solucionarse en este tipo de formulaciones.

Los geles se pueden clasificar [30] atendiendo a la naturaleza de la fase continua, la de la fase móvil y al número de fases. En primer lugar, según la naturaleza de la fase continua en hidrogeles, organogeles o bigeles. Los primeros son redes tridimensionales en los que la fase dispersa polimérica absorbe grandes cantidades de agua (fase continua). Los polímeros tienen propiedades hidrófilas que les permiten interactuar con medios acuosos. Los organogeles se componen de una fase dispersa en forma de red tridimensional y de una fase continua líquida de naturaleza lipófila, que puede ser un disolvente orgánico, un aceite mineral o un aceite vegetal. Por último, los bigeles son un nuevo tipo de formulaciones que se preparan al mezclar un hidrogel y un organogel. Las emulsiones se forman también al mezclar dos fases inmiscibles, pero necesitan un surfactante para ser estables. Algunas ventajas de los bigeles respecto a las emulsiones es que no necesitan de agentes tensioactivos, son fáciles de preparar y permiten la administración tanto de principios activos lipófilos como hidrófilos [31]. Los bigeles pueden ser empleados como vehículos para la administración de TFV [29].

En segundo lugar, según la naturaleza de la fase dispersa se distinguen aquellos de naturaleza orgánica o inorgánica. Ejemplos de moléculas que actúan como fase dispersa inorgánica son las arcillas y los hidróxidos de aluminio y magnesio. En cuanto a los polímeros orgánicos, pueden ser a la vez naturales, como gelatina, goma guar o pectinas, semisintéticos como los derivados celulósicos, o sintéticos como ácido poliacrílico o el alcohol polivinílico.

En tercer lugar, dependiendo del número de fases, una o dos, se distinguen geles monofásicos y bifásicos. En los primeros es difícil establecer la separación entre fases dispersa y continua. Son los más comunes y empleados en tecnología farmacéutica. Los segundos están formados por flóculos o, mejor dicho, coloides liófilos floculados. Son típicos de fases dispersas inorgánicas y tienen comportamiento reológico tixotrópico.

En los geles se valoran tres propiedades: la adhesión, la liberación prolongada y el hinchamiento. En primer lugar, la bioadhesión es el proceso por el que macromoléculas naturales o sintéticas se adhieren a superficies biológicas. En el caso de que estas superficies sean mucosas, se habla de mucoadhesión. Si estas macromoléculas o polímeros se emplean para formulaciones farmacéuticas se puede conseguir una acción local del principio activo o una absorción sistémica [32]. En la mucosa vaginal se necesitan sistemas capaces de adherirse adecuadamente para que el flujo no los arrastre. En segundo lugar, las formulaciones buscan una cesión sostenida del principio activo para conseguir así una protección mayor contra el patógeno durante un periodo de tiempo continuado. Este periodo de tiempo coincide con el tiempo de mucoadhesión, durante el cual se libera paulatinamente el principio activo consiguiéndose concentraciones estables. En tercer lugar, el hinchamiento es crítico en las formulaciones a base de polímeros que sean capaces de absorber agua, puesto que va a estar relacionado íntimamente con la liberación de principios activos y su mucoadhesividad [33]. Además, en el caso de las formulaciones vaginales, un hinchamiento excesivo resulta incómodo en las pacientes.

Como ejemplo de polímeros utilizados para la preparación de hidrogeles se puede citar al quitosano, pectina e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

A. Quitosano

El quitosano es un biopolímero catiónico derivado de la quitina. La quitina es el polisacárido más abundante de la naturaleza por detrás de la celulosa [26]. La etimología de las palabras quitina y quitosano es el vocablo griego *χιτών*, que significa *coraza*, lo cual hace referencia a su procedencia natural: el exoesqueleto de crustáceos ($\approx 70\%$ quitina), insectos ($\approx 60\%$) y hongos ($\approx 40\%$). El quitosano, que se produce por la desacetilación química o enzimática de la quitina a nivel industrial, puede variar en su grado de acetilación y peso molecular [34]. Está formado por una cadena de β -(1 \rightarrow 4) D-glucosaminas con subunidades de glucosaminas acetiladas (N-acetil-D-glucosamina).

En la figura 3 se muestra la estructura química de la quitina con grupos acetilo y la del quitosano con grupos amino. Debido a la presencia de grupos amino, se solubiliza en medio ácido dando lugar así a geles. Al ser no tóxico, biocompatible y biodegradable, se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica. Es además hipocolesterolemizante [35], hemostático [36] y espermicida [26].

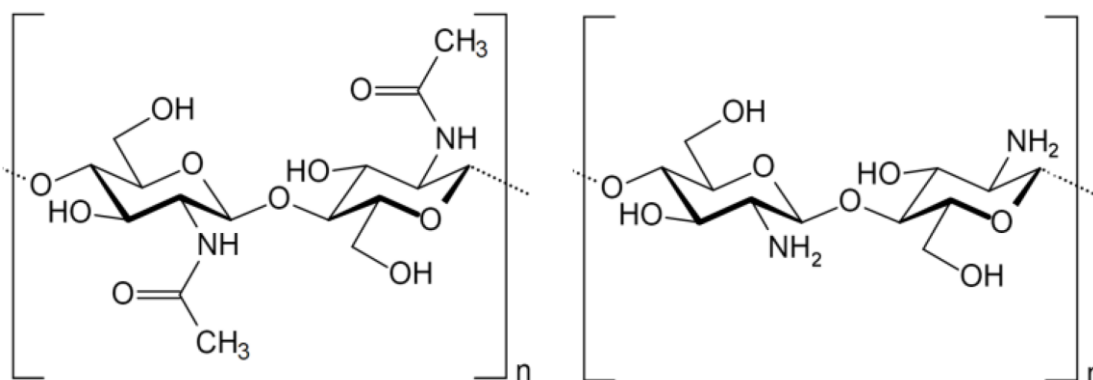


Figura 3. Estructuras químicas de la quitina (izquierda) y el quitosano (derecha) [34]

B. Pectina

Las pectinas son heteropolisacáridos obtenidos de la lámina media de la pared celular de vegetales superiores [37]. Se encuentran abundantemente en manzanas, cítricos y zanahorias. Están formadas por cadenas derivadas de alfa (1→4) ácido D-galacturónico, constituidas principalmente por tres motivos: homogalacturonanos (HG, Figura 4), ramnogalacturonano I (RGI) y ramnogalacturonano II (RGII). La cadena principal a base de ácidos galacturónicos está intercalada y/o ramificada con ramnosa, arabinosa o galactosa [38]. Por ser no tóxica, biocompatible y biodegradable, se emplea ampliamente en distintos ámbitos como la industria farmacéutica como estabilizante, y también en alimentación, es más, está reconocido como aditivo alimentario por la UE con el número E-440 [39]. Las pectinas son capaces de absorber agua y formar geles. Además, gracias a la gran cantidad de grupos hidroxilo y carboxilo y los azúcares que tiene en su estructura puede originar gran cantidad de derivados por reacciones de sustitución (alquilación, amidación, tiolación, sulfatación), elongación de cadena y despolimerización. La solubilidad, hidrofobicidad, características biológicas y propiedades funcionales se modifican en estos derivados.

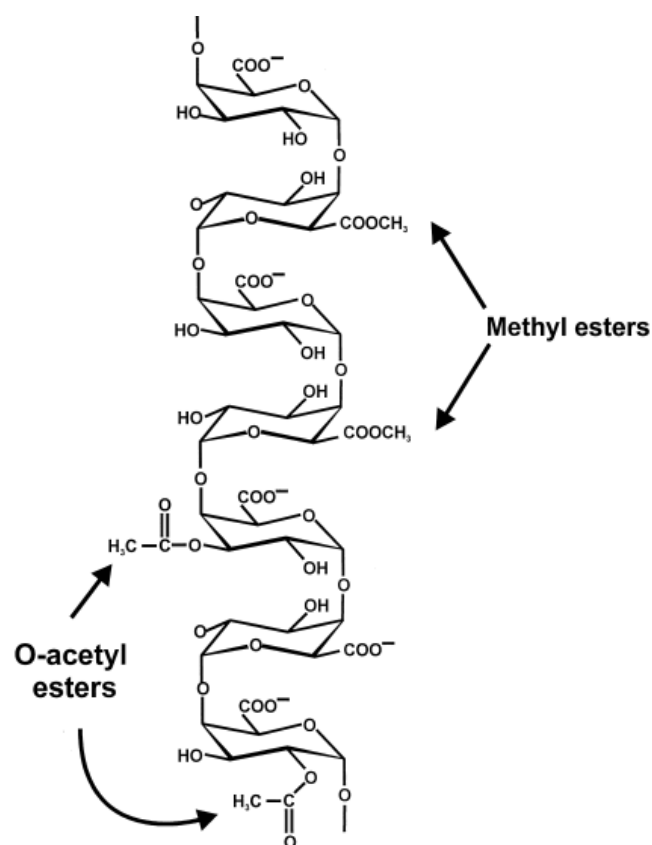


Figura 4. Estructura química del homogalacturonano [38]

C. Hidroxipropilmetilcelulosa

La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) o hipromelosa es un derivado semisintético de la celulosa [40]. La celulosa es un polímero de D-beta-(1→4)-glucosas obtenido principalmente de paredes celulares a partir de materiales vegetales fibrosos (madera). A partir de ella se obtienen gran cantidad de derivados, concretamente la HPMC se realiza industrialmente por su la adición de metilos (CH₃) y/o hidroxipropilos (CH₂-CHOH-CH₃) a sus grupos hidroxilo (Figura 5).

Al igual que la celulosa, no es ni digerible, ni tóxica, ni alérgica. Los seres humanos no tenemos las enzimas celulasas necesarias para su hidrólisis (celulosis). Se utiliza ampliamente como excipiente en la industria farmacéutica.

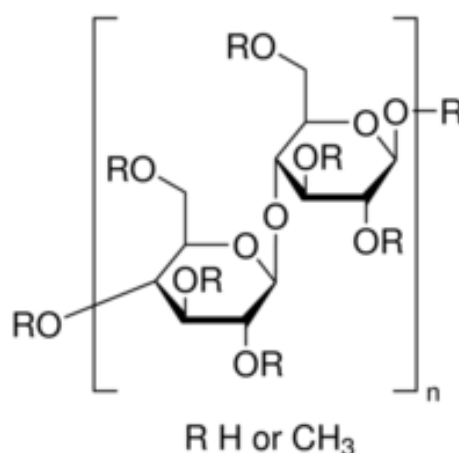


Figura 5. Estructura química de la HPMC. R puede ser H, CH₃ o CH₂-CHOH-CH₃ [42]

3. OBJETIVOS

De acuerdo con los antecedentes expuestos, el objetivo del trabajo es evaluar la influencia del pH del vehículo utilizado para la preparación de geles de TFV de administración vaginal, basados en polímeros de distinta naturaleza, sobre la consistencia y adhesividad de los mismos. La base de este trabajo la constituye los resultados obtenidos hasta la fecha en el desarrollo de los proyectos MAT2012-34552 y MAT2016-76416-R realizados en el Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

El TFV (lote: FT104801401) fue suministrado por Carbosynth Limited (Berkshire, Reino Unido). El quitosano (lote: 0055790) con un grado de desacetilación del 55% se obtuvo de Guinama (Valencia, España). La hidroxipropilmetilcelulosa Methocel® K 100M (HPMC; lote: DT352711) procede de Colorcon Ltd. (Kent, Reino Unido). La pectina con un grado de metoxilación del 80% y peso molecular de 219 KDa fue suministrada por Sigma Aldrich (St. Louis, EEUU).

El resto de reactivos necesarios para la preparación de las disoluciones que simulaban fluido vaginal y seminal fueron de calidad analítica y no fueron purificados posteriormente. Durante todo el experimento se empleó agua destilada.

4.2. Metodología

Preparación de geles

Se realizaron formulaciones blancas a base de quitosano (Q), pectina (P) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en tres medios diferentes: agua, fluido vaginal (FV) y mezcla de fluido seminal y vaginal a proporción 4:1 (FVS) a concentraciones crecientes. Los geles se hicieron por triplicado a tres concentraciones diferentes según la tabla 2.

Lote	CH (g)	P (g)	HPMC (g)	H2O/FV/FVS (ml)
Q 1%	4			csp. 40
Q 2%	8			csp. 40
Q 3%	12			csp. 40
P 1%		4		csp. 40
P 2%		8		csp. 40
P 3%		12		csp. 40
HPMC 1%			4	csp. 40
HPMC 2%			8	csp. 40
HPMC 3%			12	csp. 40

Tabla 2. Composición de los geles blancos

Analizados los resultados de los geles anteriores, se procedió a la realización cinco formulaciones de HPMC en FVS, según indica la tabla 3. En este caso se disolvió el TFV en el medio previamente a la adición de la HPMC.

Lote	TFV (g)	HPMC (g)	FVS (ml)
THPMC 1%	0,4	4	csp. 40
THPMC 1,5%	0,4	6	csp. 40
THPMC 2%	0,4	8	csp. 40
THPMC 2,5%	0,4	10	csp. 40
THPMC 3%	0,4	12	csp. 40

Tabla 3. Composición de los geles con TFV

Evaluación

Se llevaron a cabo análisis de la textura de los geles de quitosano, pectina e HPMC en los diferentes vehículos. Para asegurar la homogeneidad de la formulación, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 24 horas antes de su evaluación con el analizador de texturas TA.XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). En cada formulación se introdujo un cilindro de acero inoxidable de 20 mm de diámetro con una carga de 5 kg con una velocidad de entrada y salida de 0,5 mm/s hasta una altura de 15 mm. Los datos recogidos permitieron el cálculo de la fuerza necesaria para introducir el cilindro en el gel, la cual es una medida de su consistencia. Igualmente, se midió la fuerza para desprenderlo, que predice la capacidad adhesiva del gel. Los picos máximos se corresponden con la fuerza máxima de penetración (FMP) y la fuerza máxima de desprendimiento (FMD). Estos valores máximos fueron analizados en función de la concentración y vehículo de los geles.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de textura midió la fuerza necesaria para penetrar en las formulaciones y para que una vez dentro con el gel adherido al cilindro, la necesaria para desprenderse de él. Se obtuvieron así distintas gráficas que representaban las fuerzas de penetración y de adhesividad con respecto al tiempo. Los valores de fuerza máxima de penetración (FMP) y fuerza máxima de desprendimiento (FMD) fueron representados en función de la concentración de polímero y naturaleza del medio. Los resultados se muestran en la Figura 6 A (FMP) y B (FMD). Los valores de FMP son indicadores de la consistencia, mientras que los FMD se asocian con la adhesividad o pegajosidad. En la gráfica 1 todos los geles son blancos, es decir, no se les ha añadido ningún principio activo para comprobar la capacidad de gelificación de los polímeros en los medios.

En el desarrollo de los proyectos MAT2012-34552 y MAT2016-76416-R se trabaja con distintos polímeros como excipientes de formas farmacéuticas de administración vaginal. En diversos experimentos se investigó la naturaleza ácido-básica y la influencia del pH del vehículo empleado sobre los mismos. Basándose en esas experiencias, este trabajo decidió seleccionar quitosano, pectina e hidroxipropilmetilcelulosa por ser, respectivamente, de carácter básico, ácido y neutro. De la misma manera, los medios empleados para la evaluación son agua, fluido vaginal y mezcla de fluido vaginal y seminal que son, respectivamente, neutro, ácido y básico.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia y el/la Tutor/a no se hacen responsables de la información contenida en el mismo.

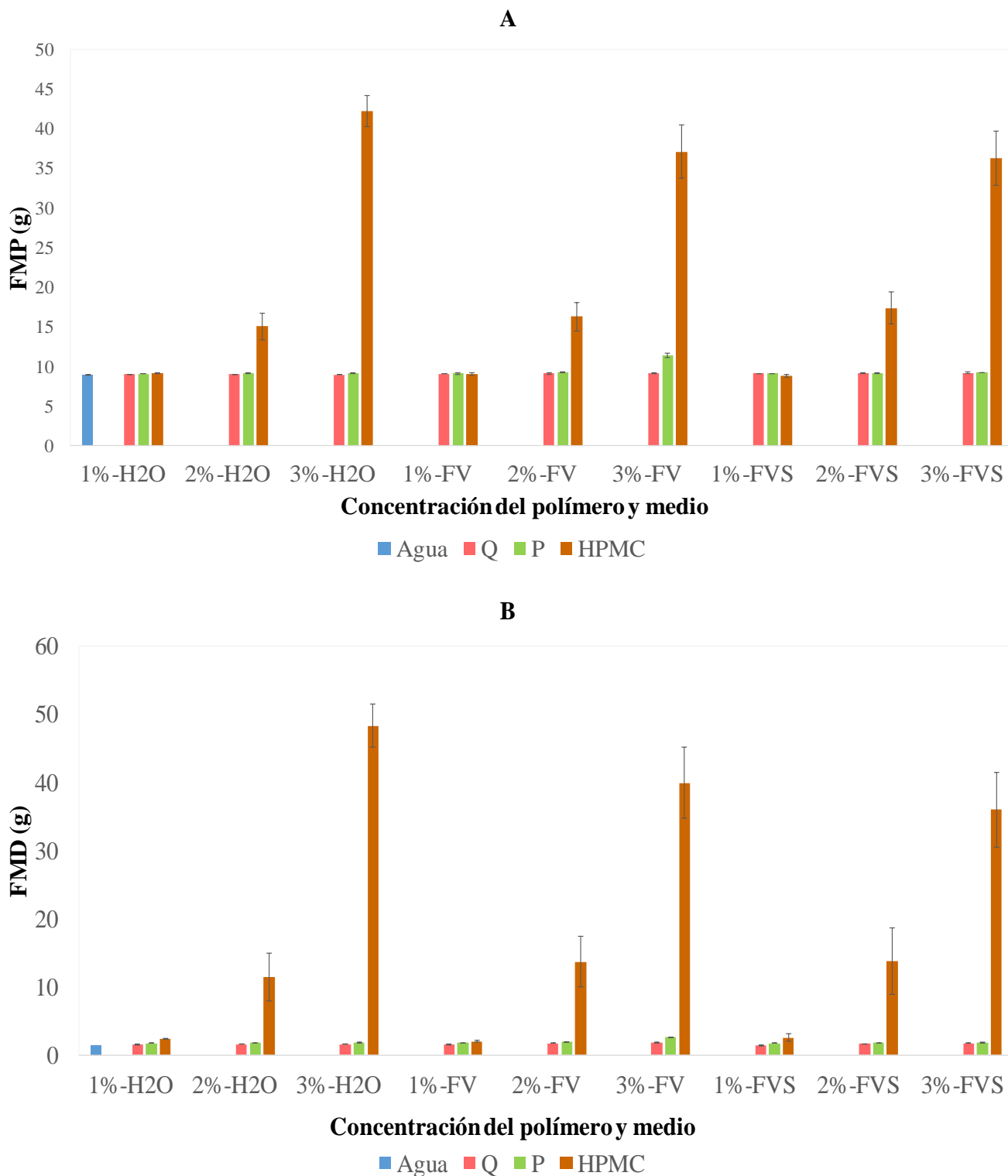


Figura 6. Fuerza máxima de penetración (**A**) y fuerza máxima de desprendimiento (**B**) de los geles basados en quitosano (serie Q), pectina (serie P) e hidroxipropilmetilcelulosa (serie HPMC) al 1, 2 y 3% en agua, fluido vaginal (FV) y mezcla de fluido vaginal y fluido seminal 4:1 (FVS)

El quitosano no gelificó homogéneamente en ninguno de los tres medios estudiados, y por ello sus valores de FMP y FMD son similares a los del agua (serie Q, gráfica 1). Esto se debe a que el medio no es lo suficientemente ácido para permitir la orientación tridimensional de las cadenas de quitosano. Sin embargo, consigue formar pequeños flóculos que originan un sistema heterogéneo con precipitados en el fondo del vaso. Esta gelificación imperfecta puede explicar por qué en fluido vaginal a concentraciones de 2 y 3% se observan valores de FMD ligeramente superiores a los del agua.

La pectina formó geles en los tres medios, aunque sus valores de FMP y FMD (serie P, gráfica 1) demuestran que su consistencia y adhesividad no son muy superiores a los obtenidos para el agua, a pesar de formar una estructura tridimensional que le concedería en teoría mayor consistencia. Cabe resaltar la diferencia de 1.15 unidades del FMP de pectina al 3% en FV respecto al del agua. Se deduce que en la pectina no influye la concentración y sí el medio, en el intervalo de pH en el que se ha trabajado.

La HPMC es una macromolécula neutra que en los tres medios dio lugar a geles viscosos, algunos tanto que el agitador magnético no podía girar en ellos. De los tres polímeros utilizados HPMC es el que a simple vista da los valores más elevados de consistencia y adhesividad (serie HPMC, gráfica 1). Se observa que a concentración de 1% su FMP y FMD presentan valores similares a los del agua, mientras que a concentraciones de 2% aumentan considerablemente dichos valores. Cuando está al 3% los valores de FMP y FMD triplican sus valores respecto al 2%. De entre los tres medios estudios, es concretamente en agua donde la consistencia y adhesividad de la HPMC es mayor considerando las desviaciones estándar. Por tanto, en la HPMC influye más la concentración que la naturaleza ácido-base del medio.

En conclusión, se deduce que la HPMC es el polímero de los tres estudiados que mejor gelifica de forma independiente al pH del vehículo. A la luz de estos resultados, se decidió realizar cinco formulaciones de HPMC en agua, pero en este caso cargadas con TFV al 1%. Debido a la gran diferencia entre los valores de FMP y FMD a las tres concentraciones evaluadas, se decidió realizar geles a concentraciones de 1%, 1,5%, 2%, 2,5% y 3%. Los resultados de esta segunda evaluación se muestran en la Figura 7.

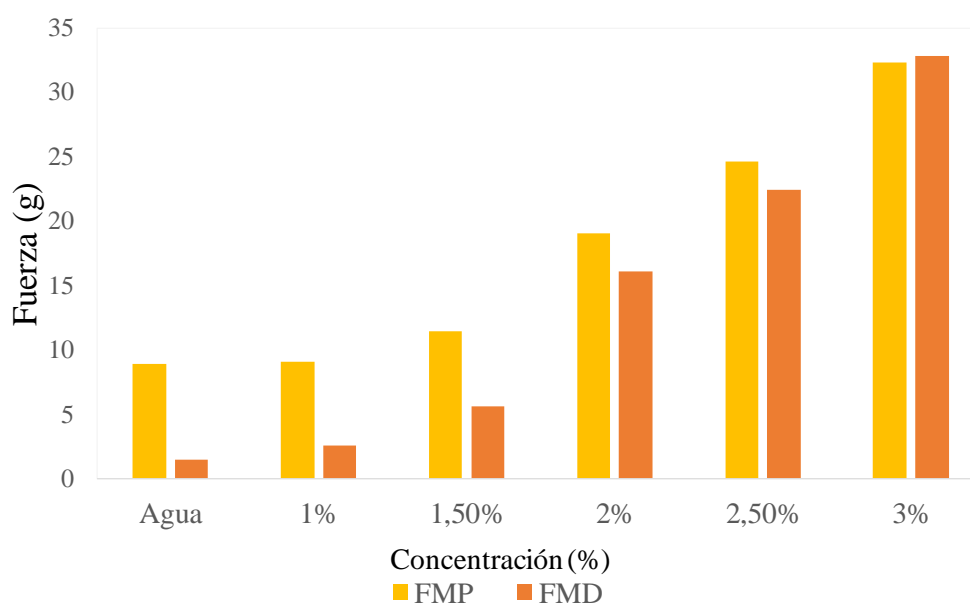


Figura 7. Valores de FMP (serie amarilla) y FMD (serie naranja) en las formulaciones de HPMC con TFV al 1%

En presencia de TFV, la HPMC sigue gelificando. Sin embargo, su capacidad de gelificar está mermada, lo cual se comprueba en la disminución de FMP de 42,27 +/- 1,95 en el gel blanco al 3%, a 32,35 +/- 1,37 en el gel al 3% con TFV. Lo mismo sucede con su adhesividad, comprobándose que su FMD pasa de 48,36 +/-3,16 en el gel con agua al 3% a 32,83 +/- 2,27 en el gel al 3% con TFV. Esta diferencia en la consistencia y adhesividad del gel se atribuye a que las partículas TFV presentes en la fase continua impiden que la HPMC se hidrate de la manera que lo hace en el medio sin principio activo. La presencia de TFV reduce por tanto la resistencia a la penetración y la capacidad de adhesividad de los geles de HPMC. Se deduce que la HPMC es capaz de gelificar a distintos pH y en presencia de TFV de manera proporcional a su concentración en el medio, si bien hay que remarcar que se observa una disminución de sus valores de consistencia y adhesividad en las formulaciones con TFV respecto a las blancas.

6. CONCLUSIONES

1. Las ETS son un problema sanitario a nivel mundial que provocan miles de muertes anualmente. Son especialmente los países en vías de desarrollo los más vulnerables a ellas.
2. El VIH en concreto es una ETS considerada a día de hoy incurable, con especial importancia en mujeres sub-saharianas, entre las cuales la incidencia y prevalencia son muy elevadas. Esto se traduce en un contagio del virus a su descendencia.
3. Existen proyectos y líneas de investigación destinados a frenar la expansión del VIH. En la actualidad se están desarrollando geles de y se están realizando ensayos clínicos sobre su eficacia.
4. Del estudio realizado en el laboratorio se ha comprobado que el quitosano no ha gelificado en ninguno de los tres medios evaluados, la pectina ha demostrado que su capacidad de gelificación depende del pH y la formación del gel de HPMC depende fundamentalmente de su concentración, influyéndole poco la naturaleza del medio.
5. La presencia de principio activo influye en la capacidad de gelificación de la HPMC, dado que los geles de HPMC al 1% de TFV gelificaron, aunque su consistencia y adhesividad era menor que los geles sin fármaco.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] «VIH/SIDA,» OMS, [En línea]. Disponible en: https://www.who.int/topics/hiv_aids/es/. [Último acceso: 01 2019].
- [2] R. Weiss, «How does HIV cause AIDS?,» *Science*, vol. 260, pp. 1273-1279, 1993.
- [3] D. C. Douek, M. Roederer y R. A. Koup, «Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS,» *Annual Review of Medicine*, nº 60, pp. 471-484, 2009.
- [4] C. Lumbreras-Bermejo y R. Rubio-García, «Fármacos antivíricos,» de *Velázquez Farmacología Básica y Clínica*, 19 ed., Ciudad de México, Editorial médica panamericana, S.A., 2017, pp. 870-888.

- [5] A. N. Phillips, A. Lazzarin, J. Gonzales-Lahoz y N. Clumeck, «Factors associated with the CD4+ lymphocyte count at diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome,» *Journal of Clinical Epidemiology*, vol. 49, nº 11, pp. 1253-1258, Noviembre 1996.
- [6] J. Hemelaar, «The origin and diversity of the HIV-1 pandemic,» *Trends in Molecular Medicine*, vol. 18, nº 3, pp. 182-192, Marzo 2012.
- [7] B. Rife y M. Salemi, «On the early dynamics and spread of HIV-1,» *Trends in Microbiology*, vol. 23, nº 1, pp. 3-4, 2012.
- [8] WHO, «Interim Guidelines. VIH treatment.,» Diciembre 2018. [En línea]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277395/WHO-CDS-HIV-18.51-eng.pdf?ua=1>. [Último acceso: Mayo 2019].
- [9] M. Keller, A. Tuyama, M. Carlucci y B. Herold, «Topical microbicides for the prevention of genital herpes infection,» *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 55, nº 4, pp. 420-423, 2005.
- [10] «Symptoms of HIV,» SMAIF, 05 2017. [En línea]. Disponible en: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/about-hiv-and-aids/symptoms-of-hiv>. [Último acceso: 03 2019].
- [11] J. Kaplan, C. Benson, K. Holmes, J. Brooks, A. Pau y H. Masur, «Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents,» Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports., Atlanta, 2009.
- [12] C. Domblides, A. Canellas, M. Wislez, V. Fallet y M. Antoine, «Lung cancer in HIV-infected patients,» *Bulletin du Cancer*, vol. 105, nº 1, pp. 111-119, 2018.
- [13] L. Quéro, X. Duval y L. Abramowitz, «Anal cancer in HIV patients,» *Bulletin du Cancer*, vol. 101, nº 11, pp. 1034-1039, 2014.
- [14] «¿Cómo afecta el VIH a las mujeres?,» NIH, [En línea]. Disponible en: <https://www1.nichd.nih.gov/espanol/salud/temas/hiv/informacion/Pages/mujeres.aspx>. [Último acceso: 05 2019].
- [15] «VIH/SIDA,» MedlinePlus, 06 05 2018. [En línea]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000594.htm>. [Último acceso: 03 2019].
- [16] «HIV Treatment,» NIH, 15 01 2019. [En línea]. Disponible en: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/51/hiv-treatment--the-basics>. [Último acceso: 04 2019].
- [17] R. Szabo y R. Short, «How does male circumcision protect against HIV infection?,» *British Medical Journal (BMJ)*, vol. 320, nº 7249, pp. 1592-1594, 2000.
- [18] «HIV prevention,» UNAIDS, [En línea]. Disponible en: <http://www.unaids.org/en/topic/prevention>. [Último acceso: 04 2019].

- [19] J. Obiero, P. Mwethera y C. Wiysonge, «Topical microbicides for prevention of sexually transmitted infections,» *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 6, nº CD007961, 2012.
- [20] S. Delany-Moretlwe, C. Lombard, D. Baron y L. Bekker, «Tenofovir 1% vaginal gel for prevention of HIV-1 infection in women in South Africa (FACTS-001): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial,» *The Lancet. Infectious diseases*, vol. 18, nº 11, pp. 1241-1250, 2018.
- [21] «CAPRISA 004 Tenofovir Gel Trial,» Family Health International 360, [En línea]. Disponible en: <https://www.fhi360.org/projects/caprisa-004-tenofovir-gel-trial>. [Último acceso: 03 2019].
- [22] M. Sharon Safrin, «Fármacos quimioterapéuticos. Agentes antirretrovirales. Tenofovir,» de *Farmacología básica y clínica*, 13 ed., Ciudad de México, McGraw-Hill Interamericana editores, S.A., 2016, p. 848.
- [23] R. Drake, A. Wayne Vogl y A. Mitchel, «Pelvis y periné,» de *Gray, anatomía básica*, Barcelona, Elsevier España, 2018, pp. 229-230.
- [24] H. Lippert, «Órganos sexuales femeninos III: vagina y vulva,» de *Lippert anatomía. Texto y atlas*, Madrid, Marbán Libros S.L., 1999, pp. 390-392.
- [25] M. Herráez y A. Martín-Villodre, «Formas de administración vaginal,» de *Tecnología farmacéutica. Volumen II: Formas Farmacéuticas*, Madrid, Editorial Síntesis, S.A., 2001, pp. 267-271.
- [26] O. Felt, P. Buri y R. Gurny, «Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery,» *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 24, nº 11, pp. 979-993, 1998.
- [27] F. Notario-Pérez, R. Cazorla-Luna, A. Martín-Illana, R. Ruiz-Caro, A. Tamayo, J. Rubio y M. Veiga, «Optimization of tenofovir release from mucoadhesive vaginal tablets by polymer combination to prevent sexual transmission of HIV,» *Carbohydrate polymers*, vol. 179, pp. 305-316, 2018.
- [28] F. Notario-Pérez, R. Cazorla-Luna, A. Martín-Illana, R. Ruiz-Caro, J. Peña y M.-D. Veiga, «Tenofovir Hot-Melt Granulation using Gelucire® to Develop Sustained-Release Vaginal Systems for Weekly Protection against Sexual Transmission of VIH,» *Pharmaceutics*, 2019.
- [29] A. Martín-Illana, R. Cazorla-Luna, F. Notario-Pérez, L. Bedoya, R. Ruiz-Caro y M. Veiga, «Freeze-dried bioadhesive vaginal bigels for controlled release of Tenofovir,» *European journal of pharmaceutical sciences*, vol. 127, pp. 38-51, 2019.
- [30] C. Álvarez-Lorenzo y Á. Concheiro-Nine, «Dispersiones coloidales y geles,» de *Tratado de Tecnología Farmacéutica. Volumen I: Sistemas farmacéuticos*, Madrid, Editorial Síntesis, S.A., 2016, pp. 219-225.

- [31] V. Singh, I. Banerjee, T. Agarwal y K. Pramanik, «Guar gum and sesame oil based novel bigels for controlled drug delivery,» *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, vol. 123, pp. 582-592, 2014.
- [32] J. Woodley, «Bioadhesion: new possibilities for drug administration?,» *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 40, nº 2, pp. 77-84, 2001.
- [33] R. Cazorla-Luna, A. Martín-Illana, F. Notario-Pérez, L. Bedoya y M. Veiga, «Dapivirine Bioadhesive Vaginal Tablets Based on Natural Polymers for the Prevention of Sexual Transmission of HIV,» *Polymers*, vol. 11, nº 3, 2019.
- [34] I. Younes y M. Rinaudo, «Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications,» *Marine drugs*, vol. 13, nº 3, pp. 1133-1174, 2015.
- [35] D. Lütjohann, M. Marinova, K. Wolter y W. Willinek, «Influence of Chitosan Treatment on Surrogate Serum Markers of Cholesterol Metabolism in Obese Subjects,» *Nutrients*, vol. 10, nº 1, 2018.
- [36] M. Misgav, A. Lubetszki y T. Brutman-Barazani, «The hemostatic efficacy of chitosan-pads in hemodialysis patients with significant bleeding tendency,» *The Journal of vascular access*, vol. 18, nº 3, pp. 220-224, 2017.
- [37] J. Chen, W. Liu, C. Liu, T. Li, R. Liang y S. Luo, «Pectin modifications: a review,» *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 55, nº 12, pp. 1684-1698, 2015.
- [38] B. Ridley, M. O'Neil y D. Mohnen, «Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling,» *Phytochemistry*, vol. 57, nº 6, pp. 929-967, 2001.
- [39] EFSA, «EFSA,» [En línea]. Disponible en: www.efsa.europa.eu.
- [40] AEMPS, «Real Farmacopea Española,» 2014. [En línea]. Disponible en: <https://extranet.boe.es/farmacopea/doc.php?id=0345>. [Último acceso: 05 2019].
- [41] R. Bucciardini, K. Pugliese, D. Francisci y A. Costantini, «Validation of a self-reported HIV symptoms list: the ISS-HIV symptoms scale,» *AIDS research and therapy*, pp. 13-18, Abril 2016.
- [42] «Methyl cellulose,» Sigma-Aldrich, [En línea]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/m0262?lang=es®ion=ES>. [Último acceso: 05 2019].
- [43] V. Singh, A. Anis, I. Banerjee y K. Pramanik, «Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis,» *Material Science and Engineering*, vol. 44, pp. 151-158, 2014.
- [44] S. Slomkowski, J. Alemán, R. Gilbert, M. Hess y K. Horie, «Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems,» *Pure and applied chemistry*, vol. 83, nº 12, pp. 2229-2259, 2011.

- [45] J. Song, C. Chen, Z. Yang, Y. Kuang y T. Li, «Highly Compressible, Anisotropic Aerogel with Aligned Cellulose Nanofibers,» *American Chemical Society (ACS) Nano*, vol. 12, nº 1, pp. 140-147, 2018.
- [46] «SynChem,» 2011. [En línea]. Disponible en: <http://www.synchem.com/bio/NRTI.asp>. [Último acceso: 04 2019].
- [47] E. Montgomery, L. Noguchi, J. Dai, J. Pan, J. Biggio, C. Hendrix y K. Isaacs, «3) Acceptability of and Adherence to an Antiretroviral-Based Vaginal Microbicide among Pregnant Women in the United States,» *AIDS and behavior*, vol. 22, nº 2, pp. 402-411, 2018.
- [48] K. Vicent, J. Moss, M. Marzinke, C. Hendrix, P. Anton, R. Pyles, Guthrie y K. Guthrie, «4) Safety and pharmacokinetics of single, dual, and triple antiretroviral drug formulations delivered by pod-intravaginal rings designed for HIV-1 prevention: A Phase I trial,» *PLoS Medicine*, vol. 15, nº 9, 2018.