

# **INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA**



**DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA BASADA EN  
MICROESFERAS BIODEGRADABLES DE QUITOSANO ACOPLADAS  
AL GEN DE LA IL-12 EN UN MODELO TUMORAL MURINO VPH16  
POSITIVO**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA  
DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES  
INFECCIOSAS**

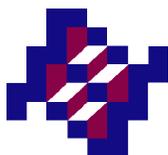
**P r e s e n t a**

**MCS. EDUARDO GUZMÁN OLEA**

**Director de tesis: Dr. Vicente Madrid Marina  
Asesor interno: Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales**

***AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS (hoja escaneada)***

## AGRADECIMIENTOS



Instituto Nacional de Salud Pública, INSP.

Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, CISEI.

Por permitir el uso de sus instalaciones durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Vicente Madrid Marina por la Dirección del Trabajo.

Al Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales por la tutoría de Tesis.



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.

Por el apoyo económico recibido;

No. de beneficiario: 43444.



Programa para el mejoramiento del profesorado, PROMEP.

Por la beca recibida para estudios de posgrado de alta calidad:

PROMEP/103 5/08/3375



Universidad Politécnica del Estado de Morelos, UPEMOR.

Por el apoyo en la realización del programa de Doctorado.

Al comité asesor: Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales, Dr. Efrén Hernández Baltazar, y a los miembros del comité sinodal: Dr. Rogelio Hernández Pando, Dr. Vicente Madrid Marina, Dra. Clarita Olvera Carranza, Dr. José Moreno Rodríguez y Dr. Juan Manuel Alcocer González, por la revisión, asesoría, aportaciones y mejoramiento del presente trabajo.

# DEDICATORIA

# ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1 INTRODUCCIÓN .....	2
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	4
<b>CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>8</b>
2.1 ANTECEDENTES .....	8
2.2. <i>El cáncer cervicouterino como un problema de salud pública.</i> .....	8
2. 2.1. <i>Virus del Papiloma Humano y CaCu</i> .....	9
2.3. RESPUESTA INMUNE CONTRA VPH .....	11
2.3.1. <i>Inmunidad innata.</i> .....	12
2.3.2. <i>Respuesta inmune celular en cáncer cervicouterino</i> .....	12
2.3.3. <i>Células NKT.</i> .....	14
2.3.4. <i>Macrófagos</i> .....	15
2.3.5. <i>Mastocitos.</i> .....	16
2.3.6. <i>Células Dendríticas.</i> .....	16
2.3.7. <i>Respuesta inmune de mucosas.</i> .....	17
2.3.8. <i>Mecanismos de evasión de la respuesta inmune en cáncer cervicouterino.</i> .....	17
2.4. ESTRATEGIAS PROFILÁCTICAS Y TERAPÉUTICAS CONTRA EL CACU. ....	18
2.4.1. <i>Estrategias profilácticas.</i> .....	18
2.4.2. <i>Estrategias terapéuticas.</i> .....	19
2.4.3. <i>Estrategias basadas en proteínas virales</i> .....	21
2.5. TERAPIA GÉNICA CONTRA CÁNCER CERVICAL .....	22
2.5.1 <i>Terapia génica basada en genes de citocinas (Inmunoterapia).</i> .....	25

2.5.2 Interleucina 12 como terapia génica contra el cáncer cervicouterino.....	25
2.5.3 Métodos para la transferencia de genes.....	27
2.5.4 Métodos biológicos.....	28
2.5.5 Métodos físicos.....	29
2.5.6. Métodos químicos.....	30
2.6. POLÍMEROS CATIÓNICOS EN TERAPIA GÉNICA NO VIRAL.....	31
2.6.1. Poli (L-lisina) (PLL).....	32
2.6.2. Ácido poli(láctico-glucólico) (PLGA).....	33
2.6.3. Protamina.....	33
2.6.4. Poliamidoamina (PAMAM).....	34
2.6.5. Polietilenimina (PEI).....	34
2.7. POLISACÁRIDOS COMO VEHÍCULOS NO VIRALES PARA TERAPIA GÉNICA.....	35
2.8. QUITOSANO.....	37
2.8.1. Síntesis de Quitosano.....	37
2.8.2. Propiedades fisicoquímicas.....	41
2.8.3. Peso Molecular.....	42
2.8.4. Grado de desacetilación.....	44
2.8.5. Solubilidad.....	45
2.8.6. Viscosidad.....	46
2.8.7. Reactividad química.....	47
2.9. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	48
2.9.1. Biocompatibilidad.....	48
2.9.2. Biocompatibilidad in vitro.....	49
2.9.3. Biocompatibilidad in vivo.....	50
2.9.4. Biodegradación.....	51
2.10. GENERACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO PARA APLICACIÓN BIOMÉDICA.....	57
2.10.1. Generación de micropartículas de quitosano por el método de coacervación.....	58
2.10.2. Factores que afectan la eficiencia de encapsulamiento del quitosano.....	60
2.10.3. Factores que afectan la liberación de moléculas a partir de los complejos.....	60
2.10.4. Estabilidad de las microesferas de quitosano.....	61
2.11. QUITOSANO COMO VEHÍCULO PARA LA LIBERACIÓN DE GENES TERAPÉUTICOS.....	62
2.12. CAPTACIÓN CELULAR DE LOS COMPLEJOS.....	67
2.12.1. Escape endosomal.....	67
2.13. DISOCIACIÓN DEL ADN DE LOS COMPLEJOS Y EXPRESIÓN GÉNICA.....	68
2.14. COMPLEJOS QUITOSANO/ADN EN TERAPIA GÉNICA CONTRA CÁNCER.....	69

2.15. COMPLEJOS QUITOSANO/DNA IL-12 COMO TRATAMIENTO PARA CÁNCER CERVICOUTERINO. ....	71
<b>CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>73</b>
3.1 HIPÓTESIS.....	73
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	73
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	73
<b>CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>74</b>
4.1 CULTIVO DE LAS CÉLULAS.....	74
4.2 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.....	74
4.3 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS QUITOSANO/DNAIL-12.....	75
4.4 EFICIENCIA DE ENCAPSULAMIENTO.....	75
4.5 PROTECCIÓN A LA DEGRADACIÓN DEL ADN ENCAPSULADO.....	76
4.6 ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS.....	76
4.7 LIBERACIÓN DEL PLÁSMIDO DEL COMPLEJO QUITOSANO/DNAIL-12.....	76
4.8 TRANSFECCIÓN <i>IN VITRO</i> CON EL COMPLEJO QUITOSANO/DNAIL-12 Y EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD.....	77
4.9 RATONES.....	77
4.10 GENERACIÓN DEL MODELO TUMORAL.....	77
4.11 ADMINISTRACIÓN DE COMPLEJOS POLÍMEROS/DNA EN EL MODELO TUMORAL MURINO.....	78
4.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	78
<b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
5.1 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS QUITOSANO/PADN.....	80
5.2 PROTECCIÓN DEL ADN ENCAPSULADO DE SU DEGRADACIÓN POR LA DNASA I.....	83
5.3 ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS QUITOSANO/PADN EN SOLUCIÓN.....	85
5.4 INFLUENCIA DEL PH EN LA DEGRADACIÓN DE LOS COMPLEJOS.....	88
5.5 INFLUENCIA DEL PESO MOLECULAR DEL QUITOSANO EN SU DEGRADACIÓN.....	91
5.5 EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN DE LOS COMPLEJOS QUITOSANO/PADN.....	93
5.6 BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS COMPLEJOS QUITOSANO/PADN.....	95
5.7 BIODEGRADACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LOS COMPLEJOS QUITOSANO/PADN.....	97
5.8 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL <i>IN VIVO</i> POR EFECTO DE LOS COMPLEJOS.....	101
<b>CAPITULO 6 DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
<b>CAPITULO 7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>108</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>146</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiología del Cáncer Cervicouterino en el mundo. ....	8
Figura 2. Factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer cervicouterino. ....	9
Figura 3. Estructura genómica de los Virus de Papiloma Humano. ....	11
Figura 4. Mediadores de la respuesta inmune contra tumores. ....	14
Figura 5. Fuentes celulares y respondedores de la IL-12. ....	26
Figura 6. Estructura molecular de la Quitina ..... 38	38
Figura 7. Diagrama de flujo de producción de Quitosano. ....	39
Figura 8. Desacetilación de la Quitina para obtención de Quitosano. ....	41
Figura 9. La influencia del peso molecular en algunas propiedades del quitosano. ....	44
Figura 10. Especificidad de la quitosanasa. ....	54
Figura 11. Principales métodos para la preparación de esferas de quitosano. ....	58
Figura 12. Estructura del DNA-B. ....	63
Figura 13. Generación de complejos DNA-policación y obtención de estructuras toroidales. ....	65
Figura 14. Vías de liberación del ADN y sus principales barreras. ....	66
Figura 15. Eficiencia de encapsulamiento del pADN por el quitosano. ....	80
Figura 16. Ensayo de retardación en gel de los complejos Quitosano/ADN. ....	83
Figura 17. Protección de la degradación por DNAsal del pADN encapsulado. ....	84
Figura 18. Efecto de la temperatura de almacenamiento del quitosano en solución. ....	87
Figura 19. Efecto del pH sobre la liberación de pADN encapsulado ..... 90	90
Figura 20. Influencia del peso molecular del quitosano en la degradación. ....	92
Figura 21. Eficiencia de la transfección de los complejos quitosano/pADN. ....	94
Figura 22. Eficiencia de transfección usando <i>Lipofectamina</i> <sup>TM</sup> 2000. ....	95
Figura 23. Evaluación de la citotoxicidad asociada a complejos quitosano/pADN. ....	96
Figura 24. Evaluación de la citotoxicidad asociada a <i>Lipofectamina</i> <sup>TM</sup> 2000. ....	97

<b>Figura 25. Biodegradación de los complejos quitosano/pADN <i>in vivo</i>. .....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 26. Identificación de los complejos quitosano/pcDNA3 en el modelo <i>in vivo</i>. .....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 27. Biodegradación del Quitosano en ratones hembra Balb/c. ....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 28. Inhibición del crecimiento tumoral .....</b>	<b>102</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Vacunas profilácticas contra VPH, propiedades y usos. ....	19
Cuadro 2. Ventajas y desventajas de las estrategias terapéuticas contra VPH.....	21
Cuadro 3. Ensayos pre-clínicos de estrategias terapéuticas basadas en ADN contra VPH... 23	
Cuadro 4. Ensayos clínicos de estrategias terapéuticas basadas en ADN contra VPH. ....	24
Cuadro 5. Vectores utilizados en terapia génica. ....	28
Cuadro 6. Comparación de diferentes vectores virales utilizados en terapia génica.....	29
Cuadro 7. Ventajas y limitantes de los métodos físicos de liberación génica actuales. ....	30
Cuadro 8. Ventajas y limitantes de los métodos químicos de liberación génica actuales.....	31
Cuadro 9. Principales polímeros catiónicos utilizados como acarreadores de ADN .....	32
Cuadro 10. Principales polisacáridos utilizados en terapia génica.....	36
Cuadro 11. Principales polímeros acoplados al quitosano.....	46
Cuadro 12. Principales enzimas inespecíficas que biodegradan al quitosano.....	52
Cuadro 13. Diversas quitosanasas identificadas en diferentes microorganismos.....	54
Cuadro 14. Micropartículas de quitosano utilizados en terapia génica contra cáncerÀ À ...	70



## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu), representa un importante problema de salud pública global y en México; y a pesar de los diversos métodos de prevención y terapéuticos, éstos no han incidido de manera importante en su disminución. Actualmente se están evaluando diversas estrategias terapéuticas, entre ellas las basadas en la interleucina 12 (IL-12), debido al efecto antitumoral mostrado en diversas neoplasias; sin embargo es necesario desarrollar biomateriales para su transporte. El quitosano, es un polímero biodegradable cuyas propiedades fisicoquímicas y de biocompatibilidad, han permitido utilizarlo como vehículo en terapia génica no viral. En este sentido, generamos complejos quitosano-pNGVL3-mIL-12, para la liberación del gen IL-12 en un modelo tumoral murino VPH16+, como estrategia terapéutica contra el CaCu. El plásmido pNGVL3-mIL-12, fue transformado y amplificado en células *E. coli* DH5 $\alpha$ , para su posterior purificación. Los complejos se generaron por el método de coacervación utilizando quitosano de bajo, mediano y alto peso molecular, con un grado de desacetilación del 75-85%; y fueron analizados por electroforesis. El modelo tumoral murino, se generó mediante la inyección de la línea celular BMK-16/myc, en el dorso de ratonas hembras Balb/c inmunocompetentes, de 6 semanas de edad. Los complejos generados presentaron una eficiencia de encapsulamiento de alrededor del 98%, y protegen al pADN de su degradación por la ADNasa I, además mostraron sensibilidad a su degradación en soluciones con pH ácido, lo cual favorece la liberación sostenida del pADN. También los complejos son estables a la temperatura y a su tiempo de almacenamiento, además de presentar una alta eficiencia de transfección y baja citotoxicidad. En el modelo murino demostramos la capacidad antitumoral de los complejos, evaluando el aumento en la supervivencia de los ratones tratados comparados con los controles, de tal manera que los complejos quitosano/pADN pueden ser considerados como un excelente sistema para la liberación de genes con potencial terapéutico, para el control de neoplasias cervicales de alto grado asociadas a la infección por VPH, y además pueden ser biocompatibles con otros modelos de estudio.

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Introducción

Uno de los grandes retos de la biomedicina actual, es desarrollar y evaluar nuevos biomateriales que permitan transportar al tejido blanco moléculas con aplicación terapéutica. Los polímeros naturales o biopolímeros, constituyen un grupo de biomoléculas que están siendo ampliamente estudiadas con ese objetivo. Sin embargo aunque existe una gran variedad de ellos, el quitosano ha destacado y despertado el interés de diversos grupos de investigación.

El quitosano es un polímero biodegradable que por sus propiedades fisicoquímicas es capaz de asociarse con diversas biomoléculas; lo que ha permitido que actualmente se utilice en distintas aplicaciones biomédicas. Además, debido a su naturaleza polisacárida, presenta una baja toxicidad y es biocompatible en humanos [1-3], no presenta efectos irritantes y no produce alergia [4]. También, se ha demostrado que presenta una alta capacidad para asociarse con ADN y de esta manera, es capaz de generar complejos quitosano-ADN. La formación de los complejos se debe a la propiedad catiónica del polímero, que interactúa con los polianiones del ADN, generando complejos polielectrolíticos, los cuales han demostrado ser eficientes para transfectar diversas líneas celulares. Por otro lado, se ha demostrado que el quitosano es capaz de proteger al ADN de su degradación por las nucleasas celulares, pero debido a los grupos amino que contiene el polímero, permite que éste sea degradado por otras enzimas celulares liberando el ADN acoplado al complejo [5-8], por lo tanto, los complejos quitosano/ADN podrían ser utilizados para acarrear y liberar de manera prolongada moléculas de ADN en células tumorales, con la finalidad de emplearse en terapia génica no viral.

La terapia génica se basa en la introducción de genes en células hospederas, con el fin que éstas lo expresen y desarrollen un efecto terapéutico para la cura de enfermedades. En este sentido el uso genes de citocinas representa una alternativa terapéutica contra el cáncer, ya que se ha demostrado en numerosos estudios preclínicos en animales, y en estudios clínicos en humanos, que las citocinas son moléculas muy efectivas en la inducción de la

respuesta inmune anti tumoral [9-10]. Recientemente, hemos demostrado que mediante ADN desnudo y con el uso del gen de la IL-12 en un modelo experimental tumoral por virus de papiloma humano (VPH); aumenta la respuesta inmune antitumoral, elimina la inmunosupresión del microambiente tumoral y controla la regresión tumoral. Sin embargo, la limitante del ADN desnudo, es que su capacidad de transgénesis *in vivo* puede estar disminuida debido a las numerosas barreras biológicas propias de las células diana, además de ser degradado por las nucleasas celulares. Por otro lado se han realizado estudios basados en la administración sistémica de la IL-12 recombinante (rIL-12) pero ha generado diversos efectos de toxicidad [11], por lo que surge la necesidad de desarrollar enfoques alternativos para la transfección localizada del gen de la IL-12, que permitan disminuir los efectos tóxicos, protejan al gen de su degradación por las nucleasas celulares y generen un aumento en los niveles de expresión de las citocinas locales, que conduzcan a la activación de la respuesta inmune antitumoral. El presente trabajo está enfocado en la preparación de complejos quitosano/pDNA IL-12 y su administración en un modelo tumoral murino VPH 16 positivo, como estrategia terapéutica de lesiones precursoras y cáncer de cuello uterino.

## 1.2 Planteamiento del problema

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una neoplasia ocasionada por la infección persistente con virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo, y se considera como uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Su incidencia anual se estima en más de 493,243 casos, con alrededor de 250 000 muertes [12]. En México, el CaCu es considerado la segunda causa de muerte generada por cáncer en mujeres entre 15 a 64 años de edad [13], con un crecimiento anual del 0.76 % [14].

Desde 1974 se implementó en nuestro país el Programa Nacional de Detección Oportuna de Cáncer (PNDOC), sin embargo esto no ha impactado sobre la disminución de las tasas de mortalidad de CaCu, debido principalmente a la baja cobertura y a los bajos estándares de calidad del programa [15-16]. Por tal motivo, se han implementado diversas intervenciones que buscan prevenir y controlar la enfermedad.

Las vacunas constituyen una estrategia de prevención para CaCu, precáncer, lesiones precancerosas y verrugas genitales producidas por la infección por los tipos de VPH 6, 11, 16 ó 18. Dichas vacunas están aprobadas para su aplicación en mujeres adolescentes (9-15 años de edad) y jóvenes (16-26 años de edad) sin infección ni lesión cervical, y pretenden alcanzar una protección del 70% de los casos de CaCu asociados a los VPH mencionados. Con esta estrategia se busca incidir de manera negativa en la incidencia de la infección del VPH y en consecuencia del CaCu. Sin embargo, de acuerdo con la historia natural del cáncer cervicouterino, se tendrían resultados sobre la protección de las vacunas en por lo menos 10 años, y los casos de cáncer asociados a otros genotipos de VPH no serían cubiertos. Por otro lado, los casos actuales de CaCu en el mundo no están cubiertos con estas vacunas, por lo que la investigación de estrategias terapéuticas contra el cáncer cervicouterino se debe seguir desarrollando [17-18].

Recientemente se ha demostrado, que en diversos tumores se desarrolla un microambiente tumoral favorable para el desarrollo de la malignidad. En CaCu, se ha demostrado la expresión de citocinas inmunosupresoras como: IL-4 e IL-10 en lesiones cervicales, lo cual favorece la carcinogénesis [19-27], por lo anterior, una

de las principales propuestas es revertir el estado de inmunosupresión local y activar la respuesta inmune anti-tumoral, que conduzcan a la eliminación de los tumores. Adicionalmente, se ha demostrado que la IL-12 es una citocina con propiedades inmunomoduladoras y presenta actividad antitumoral, por lo que es una molécula con gran potencial de uso terapéutico contra el CaCu. Sin embargo la IL-12 recombinante, al ser administrada de manera sistémica; genera efectos de toxicidad en los modelos estudiados [9-12], por lo que se han desarrollado diversas estrategias basadas en terapia génica enfocadas a la expresión localizada de la IL-12. Para alcanzar ésta condición, es necesaria la introducción de material genético exógeno en las células diana, lo cual puede realizarse utilizando métodos virales o no virales. Dentro de los métodos no virales para el transporte y liberación de genes, los polímeros biodegradables han mostrado un gran potencial, entre ellos destaca el quitosano [32-33].

El quitosano es un polímero formado por N-acetil-D glucosamina y D-glucosamina, producido por la desacetilación alcalina de la quitina, la cual se encuentra presente en la mayoría de los crustáceos. De acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del quitosano, tales como:  $pK_a$ , solubilidad, carga y tamaño [34]; se ha utilizado para la liberación y aumento en la absorción de drogas [35-36], por lo que es considerado un excelente vehículo para la liberación de genes [37-38], mostrando un nivel eficiente de transfección [39-40]. La capacidad de unión del biopolímero con el ADN, se debe a que las aminas primarias del quitosano contienen cargas positivas, esas aminas protonadas lo capacitan para unirse al ADN que contiene cargas negativas y condensarse formando complejos. También se ha demostrado que el quitosano es capaz de proteger al ADN de su degradación por las ADNasa I y II [41-43], y tiene propiedades de transfección y liberación de ADN ha sido eficiente, cuando se ha probado en líneas celulares como: COS-1, MG63, HEK293, A549, células de melanoma, células HeLa, y células Caco-2 [40,44]. Así mismo la eficiencia de transfección de los complejos quitosano/ADN, puede ser optimizada al modificar algunas condiciones en su formulación como: peso molecular del polímero, grado de desacetilación, proporción N/P (proporción de cargas positivas del quitosano con las cargas

negativas del ADN) y pH del medio de transfección [45-48], por ello se considera que el quitosano es un método seguro y eficiente para encapsular y liberar genes terapéuticos.

Derivado de lo anterior, el presente trabajo está enfocado en generar complejos de quitosano con un plásmido que contiene el gen de la IL-12 y, evaluar la capacidad de los complejos (quitosano/pDNA IL-12) para la liberación del gen. Los complejos serán administrados de manera local en un modelo tumoral murino VPH positivo y se evaluará el efecto antitumoral. Con lo anterior se busca desarrollar una estrategia terapéutica contra el cáncer cervicouterino (Ver anexo 1).

### **1.3 Justificación**

El cáncer cervicouterino, es una neoplasia que representa un importante problema de salud pública en México y en el mundo, y a pesar de las diversas estrategias terapéuticas que se han implementado, éstas no han incidido de manera importante en la disminución de las tasas de mortalidad de la enfermedad. La terapia génica basada en genes de citocinas, es una de las estrategias que podrían emplearse contra la enfermedad. Particularmente el uso del gen de la interleucina 12 (IL-12), ha demostrado que es un activador de la respuesta inmune con propiedades antitumorales en modelos experimentales de CaCu, asociados a la infección por el VPH, y además inhibe el estado de inmunosupresión local; no obstante se requiere del desarrollo de métodos eficientes y seguros para su transgénesis *in vivo* y para su aplicación en el tratamiento del CaCu. Los polímeros catiónicos se han utilizado en investigación biomédica y farmacéutica para el transporte y liberación de moléculas con actividad terapéutica. El quitosano es uno de los biopolímeros que por su capacidad de asociarse, encapsular y proteger al ADN, puede ser utilizado como un vehículo para la liberación del gen de la IL-12, por lo que el presente trabajo pretende generar complejos quitosano/pDNA IL-12 y, evaluar la capacidad de los complejos en la transgénesis y liberación del gen en líneas celulares VPH positivas, además de evaluar su

efecto antitumoral en un modelo tumoral experimental VPH positivo. La propuesta se realizó en un modelo tumoral murino VPH 16 positivo, al cual se le administraron los complejos de manera local, y se evaluó el efecto antitumoral en el modelo de estudio.

## CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

### 2.2. El cáncer cervicouterino como un problema de salud pública.

El cáncer cervicouterino (CaCu), es un importante problema de salud pública global (Figura 1), su incidencia anual de 493,243 casos, con 273,505 muertes, lo han posicionado como el segundo tipo de cáncer más común en mujeres en todo el mundo. Adicionalmente, se ha demostrado que alrededor del 80% de los casos ocurren en los países en vías de desarrollo [12-13]. En México, anualmente 12,516 mujeres son diagnosticadas con CaCu y 5,777 mueren a causa de la enfermedad [14-15], ubicándola como la segunda causa de muerte en mujeres de 15 a 64 años de edad [16], además se estima un crecimiento anual en mortalidad por CaCu del 0.76 % [17].

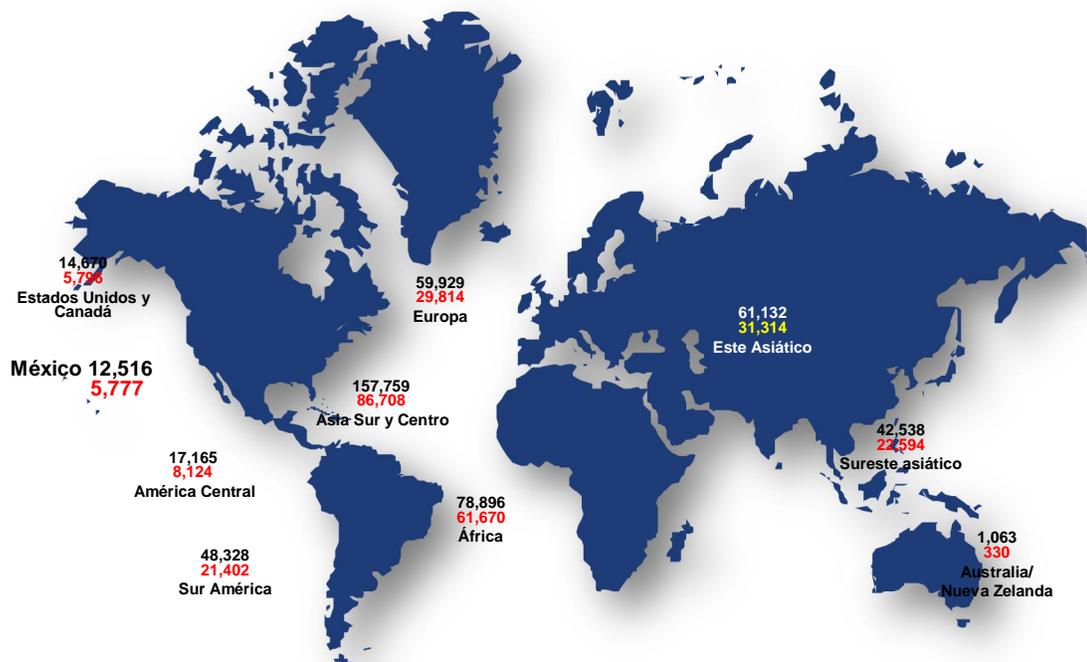


Figura 1. Epidemiología del Cáncer Cervicouterino en el mundo. Modificado de [12,14,18-19].

El CaCu es una enfermedad de progresión lenta, aproximadamente se desarrolla en un período entre 20 a 30 años, tiempo suficiente para su posible

detección [18], y cuando su diagnóstico es oportuno la enfermedad puede ser prevenible. México ha implementado la norma oficial mexicana: NOM-014-SSA2-1994, donde se establecen los lineamientos a seguir, tanto para el programa nacional de tamizaje (PNT-CaCu) como para el tratamiento de los casos identificados [19], sin embargo, esto no ha impactado de manera significativa en la prevalencia de la enfermedad, por un lado debido a que no hay una cobertura total del PNT-CaCu, y además a que el desarrollo y progresión de la enfermedad es un proceso multifactorial, en el cual se involucran: factores ambientales, sociales, epidemiológicos, genéticos, propios del huésped y de la infección por el VPH (Figura 2) [20], por lo que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para la detección, control y tratamiento del CaCu.

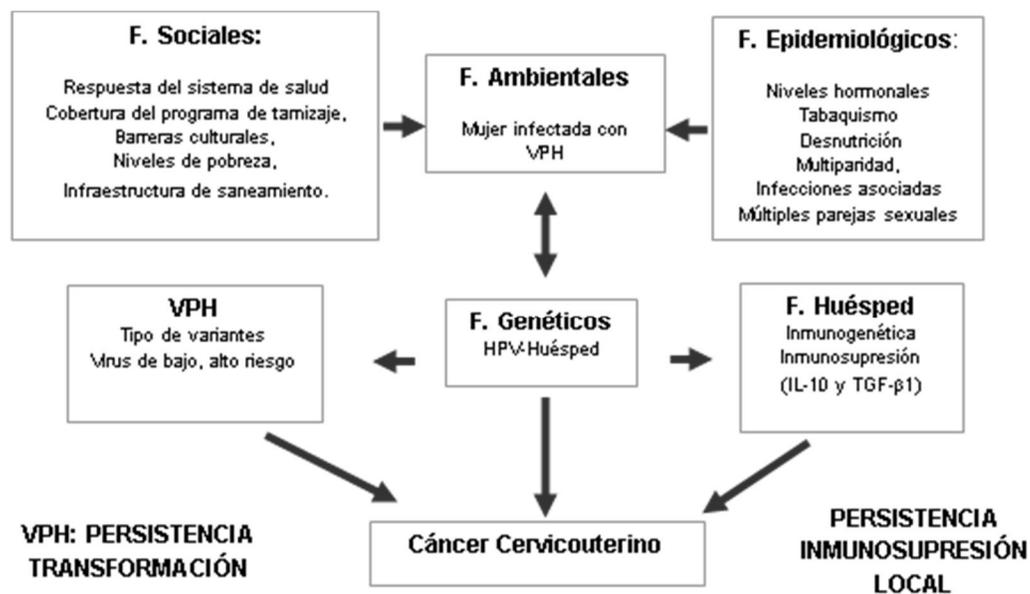


Figura 2. Factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer cervicouterino. Modificado de: Torres-Poveda KJ, et al. 2008 [20].

### 2. 2.1. Virus del Papiloma Humano y CaCu

Los Virus del Papiloma Humano (VPH), son un grupo de virus de ADN de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases, pertenecen a la familia Papovaviridae, no poseen envoltura, y tienen un diámetro entre 52-55 nm. (Figura

3) [21-23]. Se han identificado aproximadamente 130 tipos de VPH y son considerados especie-específicos, presentan tropismo por las células epiteliales escamosas, como células de la piel y mucosas del tracto oral, respiratorio y anogenital [21,24-28]. Algunos tipos de VPH como los tipos 6 y 11, están asociados a la formación de verrugas benignas anogenitales o condilomas, por lo que son considerados VPH de bajo riesgo; mientras que otros tipos como los VPH 16, 18, 31, 33 y 45 están asociados al desarrollo de cáncer ano genital y a CaCu, por lo que son considerados de alto riesgo por su potencial oncogénico [27, 29-31]. Debido a que se ha identificado el genoma viral en el 99.7% de los tumores avanzados, se ha considerado al VPH de alto riesgo como el principal agente etiológico asociado al desarrollo del CaCu [30], sin embargo la infección persistente al epitelio cervical con VPH de alto riesgo, es necesaria pero no es una causa suficiente para el desarrollo de la enfermedad [21-22], ya que además de los factores propios de la infección como el tipo viral, también influyen factores: ambientales, sociales, epidemiológicos, genéticos, y del huésped; que en conjunto participan en el riesgo de avance de la enfermedad [20, 22, 32-38]. La infección inicial se realiza en células que recubren el estrato basal, donde el virus puede permanecer en estado latente o replicarse durante la diferenciación de los queratinocitos, llegando a producir partículas virales completas [24-24, 39]. La infección con VPH de alto riesgo puede ser transitoria e intermitente, y puede ser eliminada por el sistema inmunológico del hospedero, sin embargo, cuando la infección no puede ser contrarrestada por el sistema inmune, puede persistir y evolucionar hasta el desarrollo del CaCu [40-43]. Por otro lado, se ha determinado que en estadios precancerosos, el genoma del VPH se mantiene en estado episomal, con la expresión de algunos genes tempranos y tardíos, mientras que en la mayoría de los casos de CaCu y líneas celulares derivadas de carcinoma cervical, el ADN del VPH se encuentra integrado al genoma celular [44]. Por lo que el estado físico del genoma viral (episomal o integrado), la expresión diferencial de proteínas virales y la inactivación de anti-oncogenes celulares, son elementos fundamentales que conllevan a la transformación e inmortalización del epitelio y eventualmente su evolución a cáncer [24, 45-46].

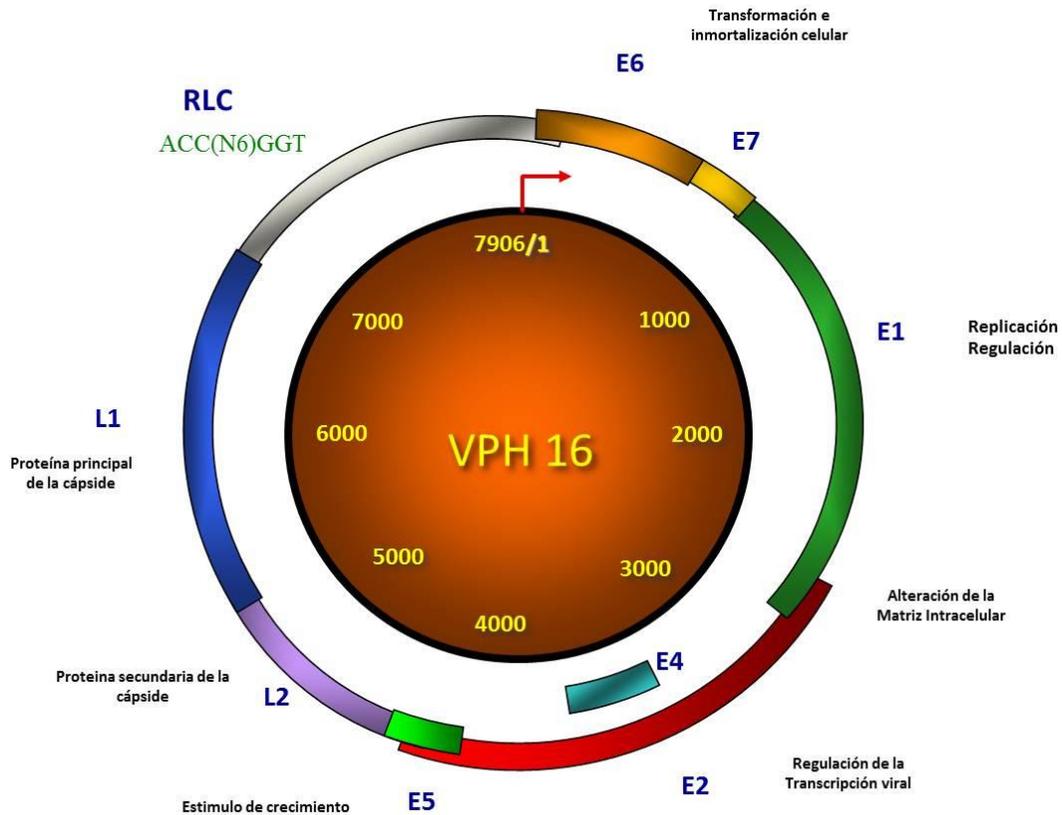


Figura 3. Estructura genómica de los Virus de Papiloma Humano. El genoma viral está constituido por 3 regiones: la región larga de control (RCL), que contiene numerosos elementos en *cis* importantes para el control de la replicación viral y la expresión de genes, dos regiones codificantes, una de ellas contiene genes de expresión temprana (E), y la otra contiene genes de expresión tardía (L).

### 2.3. Respuesta inmune contra VPH

El sistema inmune es fundamental para eliminar la infección del VPH o permitir la persistencia y progresión de la enfermedad. La inmunovigilancia es realizada por dos mecanismos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, sin embargo se ha demostrado que el principal mecanismo de defensa contra la infección con VPH es la respuesta inmune mediada por células. Se ha determinado que las lesiones cervicales ocasionadas por la infección con el VPH pueden ser eliminadas espontáneamente por la respuesta inmune del hospedero, y solo un porcentaje menor puede evolucionar a cáncer, Por lo tanto la respuesta inmune es esencial para el control de lesiones precursoras y del CaCu, especialmente la respuesta inmune mediada por células [47-51].

El conocimiento de los mecanismos de defensa, facilita el desarrollo de estrategias que permitan comprender la respuesta inmune frente a la infección por VPH.

### **2.3.1. Inmunidad innata**

La respuesta inmune innata es considerada la primera barrera contra las células tumorales, las cuales son reconocidas por un proceso independiente al de los antígenos. Una vez que las células del epitelio han sido infectadas por el VPH, se activan diversos mecanismos como quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos y células asesinas naturales (NK), además de la activación de procesos inflamatorios y del sistema del complemento. Existe también la participación de las células de Langerhans (LC), y de las células presentadoras de antígenos (CPA), las cuales favorecen la fagocitosis de las partículas virales y la presentación del antígeno junto con HLA clase II, CD40 y B7. Adicionalmente, la participación de los receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés), es muy importante en la detección y eliminación de la infección. Los TLR se encuentran en las células dendríticas y los macrófagos, y responden a los patrones moleculares asociados a los patógenos, generando la activación de la respuesta inmune innata. El principal efecto de la activación de los TLR's es la activación de citocinas, las cuales tienen un efecto antiviral directo como interferón alfa ( $INF-\alpha$ ) e  $INF-\beta$ , también participan citocinas como  $IL-1\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ , factor de necrosis tumoral y principalmente por la  $IL-8$ , que promueven la inflamación y la quimiotaxis. La participación de los TLR's en el control de los VPH es desconocida sin embargo, se ha sugerido que los TLR 4 y 9 participan en el reconocimiento inicial. También en la respuesta inmune innata participan otros elementos como la inhibición de la señalización por  $INF$ 's tipo I, inhibición de proteínas del complejo principal de histocompatibilidad clase I y la lisis de células infectadas por células NK [49-52].

### **2.3.2. Respuesta inmune celular en cáncer cervicouterino**

La respuesta inmune mediada por células en CaCu, es la más importante para la eliminación de las células cancerosas. Esta respuesta es dependiente de la activación de los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos profesionales. Los principales tipos celulares que participan en la eliminación de las células tumorales son: macrófagos, células dendríticas y queratinocitos, las cuales producen diversas interleucinas que contribuyen en la iniciación o supresión de la respuesta inmune celular como:  $IL-4$ ,  $IL-12$ ,

IL-10 y/o TGF- $\beta$ 1. Se ha demostrado que la respuesta inmune es activada por citocinas tipo Th1 e inhibida por citocinas Th2 [49, 51-52].

Diversos estudios realizados en biopsias de CaCu VPH positivos, en las cuales se ha analizado el perfil local de expresión de citocinas Th1, Th2 y Th3, se ha determinado que aproximadamente el 80% de los tumores expresan bajos niveles del RNA mensajero (RNAm) de CD4, mientras que se ha observado una elevada expresión en los niveles del RNAm de CD8, además la mayoría de los tumores expresan el RNAm de IL-4, IL-10 y de manera muy importante todos ellos expresan el RNAm de TGF- $\beta$ 1 e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). En ninguno de los tumores analizados se identificó la expresión del RNAm de IL-12 e IL-6 [52-60]. Por otro lado en biopsias de lesiones intraepiteliales escamosas y de CaCu, se ha determinado que existe una mayor cantidad de linfocitos T infiltrantes (LTI) en el estroma, que en el epitelio; y que las células T CD8+ son predominantes comparadas con las células T CD4+, sin embargo las células T CD8+ son incapaces de eliminar el tumor [53-54]. Además, se han realizado diversos estudios que sugieren que las células transformadas por VPH son capaces de expresar IL10, pues se ha demostrado que las proteínas E2 y E7 de VPH 16 son capaces de trans-activar la expresión de las citocinas IL-10 y TGF- $\beta$ 1 respectivamente, como un mecanismo de evasión a la respuesta inmune, también se ha encontrado una correlación entre el nivel de expresión de proteína y del RNAm, con los niveles observados en los sobrenadantes de líneas celulares transformadas con VPH, conteniendo IL10 y TGF- $\beta$ 1. En este sentido, la expresión predominante de citocinas inmunosupresoras, participa en la subregulación de la respuesta inmune específica contra tumores en el microambiente tumoral, lo cual contribuye a la progresión de la enfermedad [22, 56, 61]. Este mecanismo es consecuencia de la expresión y represión de varios genes importantes en la respuesta inmune, como: expresión de Fas y su ligando, baja expresión del MHC clase I y de moléculas co-estimuladoras como B7 y de la cadena zeta ( $\zeta$ ) del complejo TCR/CD3 [21, 62], en este sentido, se ha sugerido que la función reducida de las células T, puede estar asociada con una alteración en la expresión de la proteína CD3 $\zeta$  [55], y que la progresión a CaCu está asociada con la disminución en el RNAm de CD3 $\zeta$ . También se ha observado una correlación significativa entre la baja proliferación de células T y la disminución en la expresión del RNAm de CD3 $\zeta$  por células T estimuladas con anti-CD3, de tal manera que la disminución en la función de las células T, parece correlacionar con la progresión a CaCu [55, 63].

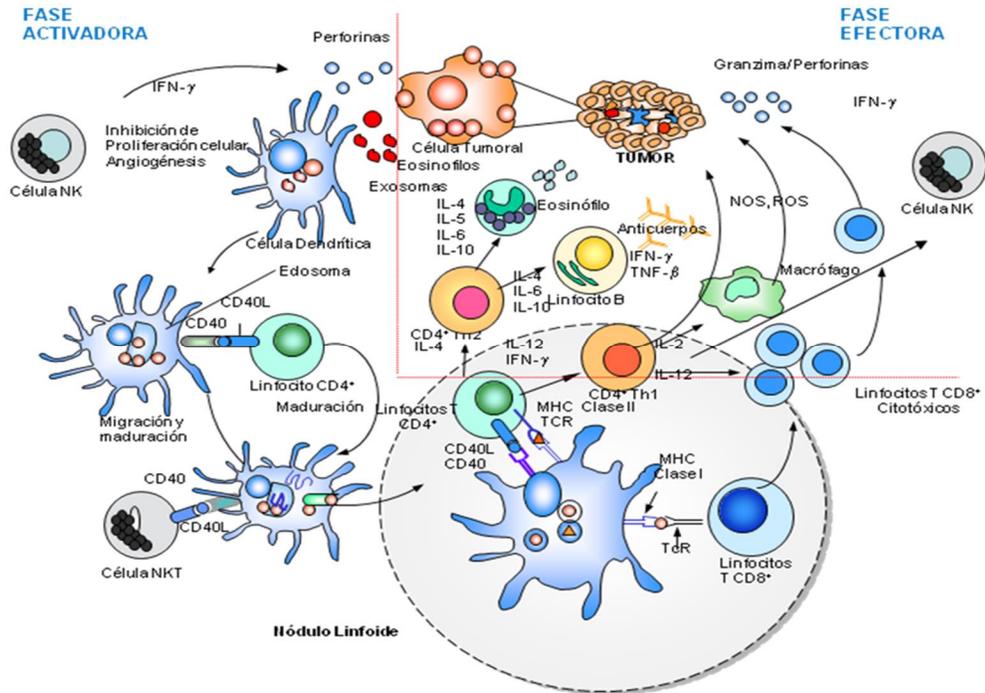


Figura 4. Mediadores de la respuesta inmune contra tumores. La fase activadora de la respuesta inmune contra tumores inicia con la captura y procesamiento de vesículas de membrana liberadas por las células tumorales (exosomas) captadas por las células dendríticas (CD), las cuales migran a los nódulos linfoides regionales para activar a las células de la respuesta inmune (*cross-priming*). Este proceso de maduración migración de las CD a los nódulos linfoides lo facilita la interacción del receptor del CD40 de las CD con el CD40 expresado en los linfocitos T CD4+ y en las células NK T. Por otro lado, en la fase efectora, el material endocitado del tumor se presenta a los linfocitos T CD8+ y CD4+ a través de las moléculas del MHC clase I y II, respectivamente. Los linfocitos T CD4+ activados son diferenciados en linfocitos T CD4+ TH1 y TH2 según las citocinas que secretan, y las citocinas pueden activar a la respuesta inmune humoral y celular. En la respuesta inmune humoral, los linfocitos B activados producen anticuerpos específicos contra antígenos tumorales, mientras que en la respuesta inmune celular, los linfocitos T CD8+ citotóxicos activados migran al sitio del tumor para reconocer y matar a la célula tumoral. (Bermúdez-Morales VH. 2005) [21].

### 2.3.3. Células NKT

Las células NKT son un grupo heterogéneo de células T que pueden reconocer células tumorales. Su participación en la eliminación de los tumores puede ser en dos vertientes dependiendo del tipo de lesiones ocasionadas por el VPH. En lesiones cancerosas establecidas asociadas a VPH, la activación de las células NKT provee potencial terapéutico, mientras que en lesiones precancerosas la inhibición de las células NKT o su reclutamiento puede conducir a una respuesta inmune protectora. Por otro lado

algunos ligandos de las células NKT como:  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer) y  $\beta$ -GalCer, han sido probadas por su potencial terapéutico.  $\alpha$ -GalCer, ha sido estudiado como adyuvante de vacunas de ADN contra la oncoproteína E7 de VPH 16, mientras que  $\beta$ -GalCer ha demostrado actividad protectora contra tumores, por lo que los ligandos de las células NKT han mostrado potencial como agentes terapéuticos para diversos tipos de cáncer asociados a VPH [63-64].

#### **2.3.4. Macrófagos**

Los macrófagos son un tipo de fagocitos que participan de manera importante en la inmunidad innata por su capacidad para ingerir y destruir bacterias, células dañadas o células tumorales. Además participan de manera importante en la defensa contra infecciones por virus, hongos, bacterias y parásitos. La participación de los macrófagos en la respuesta inmune contra tumores, se caracteriza por el reconocimiento y eliminación de células tumorales sin dañar células normales, para ello se requieren procesos complejos y ampliamente regulados caracterizados por la heterogeneidad biológica de las células tumorales.

Algunas de las principales características del tejido tumoral es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, infiltración de células inflamatorias y reacción fibrótica. El componente inflamatorio del tejido tumoral promueve su expansión y los macrófagos pueden desarrollar actividad citotóxica contra las células tumorales. La acumulación de macrófagos alrededor del tumor, sugiere el reclutamiento de monocitos circulantes y la liberación local de factores quimiotácticos, los cuales favorecen la destrucción de las células neoplásicas. Uno de los mecanismos por los cuales se desarrolla la lisis de las células tumorales es mediante la unión de los macrófagos a las células opsonizadas mediante receptores Fc, conduciendo a la liberación de factores solubles como el factor de necrosis tumoral (TNF por sus siglas en inglés).

La participación de los macrófagos en la infección por VPH no ha sido completamente determinada sin embargo, se ha observado que en mujeres infectadas con VPH se presenta una correlación positiva entre el grado de daño, el número de macrófagos infiltrantes y la expresión de IL-10 por esas células [63-66].

### **2.3.5. Mastocitos.**

Los mastocitos son células efectoras altamente especializadas de la respuesta inmune innata, son activadas por diversos estímulos inmunológicos o no inmunológicos. Los mastocitos activados contienen gránulos secretorios y liberan diversos mediadores biológicos como: histamina, proteasas, citocinas, factores de crecimiento y metabolitos de ácido araquidónico, los cuáles participan en diversos procesos fisiológicos y patológicos. La participación de los mastocitos en la progresión tumoral no ha sido completamente aclarada, pero su presencia en neoplasia intraepitelial cervical grados 2 y 3 ha sido determinada. En dicha etapa participan favoreciendo el reclutamiento de células involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa, o también mediante la producción de citocinas inmunosupresoras como IL-10. También se ha demostrado que los mastocitos se acumulan en el estroma rodeando ciertos tipos de tumores, también sintetizan y secretan citocinas angiogénicas como el factor endotelial de crecimiento vascular. Además en el microambiente tumoral los mastocitos secretan mediadores inmunológicos como: IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 y TNF- $\alpha$  que inducen la apoptosis de las células tumorales y reclutan células inflamatorias [63, 65].

### **2.3.6. Células Dendríticas.**

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno, que participan en la regulación e inducción en la respuesta inmune innata y adaptativa contra patógenos microbianos. A nivel *in vitro* e *in vivo* participan en la iniciación de la respuesta de los linfocitos T contra los antígenos. Diversos estudios han demostrado la capacidad de las células dendríticas para estimular células vírgenes T CD4+ y CD8+. También las células dendríticas inmaduras capturan antígenos de manera muy eficiente, pero carecen de actividad estimulante de células T, y son sensibles a los efectos inmunosupresivos de las citocinas inmunoregulatoras como IL-10 producida por los tumores, mientras las células dendríticas maduras reducen el nivel de la actividad fagocítica pero aumentan la producción de algunas citocinas claves como la IL-12, también aumentan el nivel de presentación de antígenos y la actividad co-estimuladora de células T, y disminuyen la sensibilidad a los efectos inmunosupresores de IL-10, aumentando el nivel de expresión de receptores de citocinas seleccionadas que migran hacia órganos linfoides secundarios. En lesiones por cáncer cervicouterino se han observado células dendríticas

plasmacitoides (pCD), que producen citocinas antivirales como:  $\text{INF-}\alpha$ , en respuesta a partículas parecidas a virus (VLP's por sus siglas en inglés) de VPH [63-65].

### **2.3.7. Respuesta inmune de mucosas**

Diversos estudios han demostrado que el VPH puede inducir respuesta inmune local, porque no es una infección sistémica, además es una infección limitada a células epiteliales; de tal manera que la infección por VPH activa la respuesta inmune de mucosas con IgA e IgG específicas a VPH, sin embargo el virus es capaz de evadir la respuesta inmune [63].

### **2.3.8. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune en cáncer cervicouterino**

La infección persistente con VPH de alto riesgo es un factor necesario pero no suficiente para la progresión a CaCu. Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune que desencadena el VPH, favorecen que la infección persista. Entre las principales condiciones requeridas para el establecimiento de la infección se encuentran: la ocurrencia del ciclo de vida viral en el epitelio, ausencia de viremia, ausencia de muerte celular e inflamación, y la generación de un estado de inmunosupresión local causado por las proteínas del VPH. El estado de inmunosupresión se caracteriza por la represión de las vías de señalización de TLR9 por las proteínas virales E6/E7, la influencia en la expresión de  $\text{INF-}\gamma$  por E6/E7, la influencia en las vías de señalización dependientes de interferón por E6/E7, la inducción en la expresión de  $\text{TGF-}\beta 1$  por E6/E7, la inducción en la expresión de IL-10 por la proteína E2 y la reducción en la migración de las células de Langerhans [63-66].

Recientemente se ha demostrado que durante el desarrollo del cáncer cervical, se genera un micro-ambiente tumoral que contribuye a la progresión de la malignidad [19-21]. Además, los niveles de citocinas inmunosupresoras como IL-4 e IL-10, producidas en lesiones cervicales favorecen la carcinogénesis [22-27], pues se han detectado altos niveles de expresión de las citocinas IL-4, IL-10 y  $\text{TGF-}\beta 1$  en tumores cervicales, además se ha sugerido que la IL-10 es producida por las células transformadas por el VPH [22], por lo tanto, el gran reto ahora es revertir el estado de inmunosupresión local y activar a la respuesta inmune anti-tumoral para garantizar la eliminación de los tumores [21].

## 2.4. Estrategias profilácticas y terapéuticas contra el CaCu.

### 2.4.1. Estrategias profilácticas.

Debido a los altos índices de CaCu, se han implementado diversas estrategias profilácticas y terapéuticas contra la enfermedad. Recientemente se han desarrollado vacunas profilácticas contra la infección por el VPH, las cuáles han sido aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA), y se espera que impacten en la prevención de la enfermedad [17]. Éstas vacunas profilácticas, Gardasil (Merk & Co. Inc.) y Cervarix (GlaxoSmithKline), son una mezcla de partículas parecidas a virus que se derivan de las proteínas de la cápside L1 del VPH de los tipos 6 y 11, para Cervarix y 6, 11,16 y 18 para Gardasil. El fundamento de estas vacunas se basa en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el VPH, para bloquear la infección a la célula epitelial y reducir el número de células infectadas después del reto antigénico [18]. Las vacunas están siendo aplicadas en mujeres adolescente entre 9 a 15 años de edad y en mujeres jóvenes en edades entre 15 a 25 años, en ambos casos sin infección por el VPH y sin lesión. Con lo anterior se pretende alcanzar una protección de al menos 70% de los casos de CaCu asociados a los VPHs 6, 11, 16 y 18. (Cuadro 1) [63, 67].

	<b>CERVARIX (Glaxo Smith Kline Æ GSK)</b>	<b>GARDASIL (Merck Sharp &amp; Dhome Æ MSD)</b>
<b>Efectividad clínica</b>	Prevención de NIC-AG 2/3 y CaCu asociado a VPH tipo 16 y 18 en mujeres y niñas entre 10-25 años de edad, así como estudios de inmunogenicidad en niñas y niños de 10-14 años de edad.	Prevención de NIC-AG 2/3, neoplasia intraepitelial vulval de alto grado 2/3, verrugas genitales relacionadas con VPH tipos 6/11/16 y 18, en mujeres y niñas de 9 a 26 años de edad. También se ha demostrado inmunogenicidad en niños y niñas de entre 9-15 años de edad.
<b>Ingrediente activo</b>	Cada dosis contiene proteína L1	Cada dosis contiene proteína L1

	de VPH 16 (20mcg) y proteína L1 de VPH 18 (20mcg).	de VPH 6 (20mcg), proteína L1 de VPH 11 (40mcg), proteína L1 de VPH 16 (40mcg) y proteína L1 de VPH 18 (20mcg).
<b>Adyuvante</b>	ASO4 compuesto por 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A (MPL), adsorbida en hidróxido de aluminio, hidratado (Al(OH) <sub>3</sub> ).	Cada dosis contiene proteína L1 de VPH 6 (20mcg), proteína L1 de VPH 11 (40mcg), proteína L1 de VPH 16 (40mcg) y proteína L1 de VPH 18 (20mcg).
<b>Dosificación y esquema</b>	Una dosis de 0.5 ml a 0, 1 y 6 meses por inyección IM en la región deltoides	Una dosis de 0.5 ml a 0, 2 y 6 meses por inyección IM en la región deltoides o en la región Antero lateral del muslo.
<b>Efectos secundarios</b>	Reacción en el sitio de la inyección, dolor de cabeza, mialgia	Reacción en el sitio de la infección, fiebre.
Muy común		
Común	Síntomas gastrointestinales, picazón/prurito, sarpullido, artralgia y fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ .	Comezón en el sitio de la infección.
Poco común	Mareo, endurecimiento/parestesia en el sitio de la inyección.	Urticaria, broncoespasmos.

Cuadro 1. Vacunas profilácticas contra VPH, propiedades y usos [63, 67].

#### 2.4.2. Estrategias terapéuticas.

Diversas estrategias han sido desarrolladas para intentar eliminar lesiones pre-existentes o enfermedades asociadas al VPH como el CaCu. Algunas de esas estrategias han sido probadas en estadios pre-clínicos y clínicos, y de acuerdo a la estrategia utilizada puede variar el mecanismo de acción. Muchas de las estrategias terapéuticas probadas, se basan en la inducción de los mecanismos efectores de la respuesta inmune mediados por los linfocitos T CD8+ citotóxicos, con ello se busca: la eliminación de las células tumorales infectadas con VPH, la inducción en la secreción de citocinas como INFs, e IL-2, y la generación de una inmunidad eficiente contra proteínas no estructurales de VPH [21]. Algunas de las estrategias terapéuticas propuestas se basan en la utilización de proteínas virales, péptidos, inmunoterapia, DNA, RNA de silenciamiento (RNAsi), células tumorales genéticamente modificadas y células dendríticas. También se han probado vectores virales y bacterianos como herramientas para el desarrollo de vacunas

contra VPH, sin embargo aunque se han obtenido muy buenos resultados, aún es necesario realizar diversos estudios para tratar de disminuir los efectos adversos que han presentado varias de las estrategias terapéuticas en desarrollo (Cuadro 2). En el caso de las estrategias basadas en ADN, la terapia génica se ha enfocado en el uso de genes de diversas citosinas, que participen como inmunomoduladores. Esta estrategia ha sido llamada inmunoterapia, debido las alteraciones que presenta el sistema inmune en el microambiente tumoral [63-67].

Estrategia terapéutica	Ventajas	Desventajas
Basada en vectores virales	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Alta inmunogenicidad.</li> <li>•Amplia variedad de vectores disponibles.</li> <li>•Pueden facilitar la diseminación de antígeno intracelular.</li> <li>•Diversas propiedades inmunológicas de los virus.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Riesgo de toxicidad en el uso de virus vivos.</li> <li>•La potencial inmunidad pre-existente puede inhibir la administración repetida.</li> <li>•Posible dominancia de la respuesta inmune al vector viral más que al antígeno del VPH.</li> </ul>
Basada en vectores bacterianos	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Alta inmunogenicidad.</li> <li>•Pueden liberar plásmidos modificados o proteínas tumorales a las células presentadoras de antígeno.</li> <li>•Amplia variedad de vectores disponibles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Riesgo de toxicidad.</li> <li>•Potencial inmunidad pre-existente.</li> <li>•Inhibición en la inmunización repetida.</li> </ul>
Basada en péptidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Fácil de producir, estable, segura.</li> <li>•Puede combinar múltiples epítopes.</li> <li>•Posibilidad de modificar los péptidos para aumentar la unión a MHC (Complejo principal de histocompatibilidad por sus siglas en inglés).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Baja inmunogenicidad; requiere adyuvantes.</li> <li>•Epítopes deben ser determinados.</li> <li>•Restricción a HLA (Antígenos leucocitarios humanos, por sus siglas en inglés).</li> <li>•Dificultad para obtener péptidos únicos.</li> </ul>
Basada en proteínas	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Estable, segura y fácil de producir.</li> <li>•No hay restricción a HLA.</li> <li>•Múltiples adyuvantes conocidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Baja inmunogenicidad; requiere adyuvantes.</li> <li>•Generalmente hay una mejor inducción de respuesta a anticuerpos que dé respuesta a CTL (Linfocitos T citotóxicos).</li> </ul>
Basada en ADNdesnudo	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Segura, fácil de producir, estables para almacenamiento y transporte.</li> <li>•Capacidad para administración repetida.</li> <li>•Fácil de preparar con alto nivel de pureza.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•No hay propagación de inmunogenicidad intercelular.</li> <li>•Riesgo de integración al genoma o transformación celular.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Diversos métodos de liberación.</li> <li>•Expresión sostenida de antígenos en complejos MHC-péptido.</li> <li>•Pueden ser modificadas y agregar genes blanco y/o co-estimuladores.</li> </ul>	
Basada en RNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>•No es infeccioso.</li> <li>•No hay riesgo de integración genómica o transformación celular.</li> <li>•Transitoria.</li> <li>•Puede administrarse muchas veces.</li> <li>•Aumenta la expresión de antígenos.</li> <li>•Existen múltiples vectores disponibles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Inestable, difícil de almacenar por largos períodos.</li> <li>•Dificultad en la preparación.</li> <li>•Dificultad en la preparación en grandes cantidades.</li> <li>•No hay diseminación intercelular.</li> </ul>
Basada en células dendríticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Alta inmunogenicidad; usa las APC (células presentadoras de antígeno, por sus siglas en inglés) más potentes.</li> <li>•Múltiples métodos disponibles para cargar antígenos.</li> <li>•Presentación de antígenos eficiente.</li> <li>•La potencia puede ser aumentada por transducción de genes o tratamiento con citocinas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Preparación complicada, costosa, ex vivo, procesamiento celular individualizado.</li> <li>•Control de calidad variable y falta de normas estandarizadas para la calidad de las vacunas.</li> <li>•Difícil de producir a gran escala.</li> <li>•Las células dendríticas no necesariamente están en los nódulos linfáticos.</li> </ul>
Basada en células tumorales	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Útiles si el antígeno tumoral es desconocido.</li> <li>•Es probable que expresen antígenos tumorales.</li> <li>•Puede aumentar la potencia por tratamiento con citocinas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Preocupación en la seguridad en la inyección de células tumorales en pacientes.</li> <li>•Complejidad en la producción.</li> <li>•Costosas, difíciles de producir a gran escala.</li> <li>•Requiere la disponibilidad de líneas celulares tumorales o células tumorales autólogas.</li> </ul>

Cuadro 2. Ventajas y desventajas de las estrategias terapéuticas contra VPH [63, 67].

### 2.4.3. Estrategias basadas en la proteína viral E2

En el caso de las proteínas virales con potencial terapéutico se encuentra la proteína E2 de VPH; la cual es una proteína que participa de manera importante en la regulación del ciclo viral cuando el genoma del virus se encuentra en forma episomal [68]. En las células infectadas con VPH, la proteína E2 se une a la RLC inhibiendo la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 y contribuyendo al control de la proliferación celular, sin embargo; en carcinoma cervical, el genoma del VPH se encuentra integrado al genoma de la célula hospedera, con la pérdida en la expresión de E2 [22], lo que provoca la

expresión de los genes E6 y E7 favoreciendo la proliferación celular y la tumorigénesis. En este sentido, se ha demostrado un efecto anti proliferativo cuando el gen E2 de VPH es reintroducido experimentalmente en células transformadas por VPH [24-26,66], además la expresión ectópica de E2 de VPH 16 y 18 y papilomavirus bovino tipo 1, inducen arresto del ciclo celular, incremento en la senescencia celular, inhibición en la proliferación celular e inducción a la apoptosis mediante la estabilización de p53 [63-66].

## **2.5. Terapia génica contra cáncer cervical**

La terapia génica se basa en el empleo de genes con potencial terapéutico, para la cura de enfermedades desde su causa real inicial; silenciando, reparando, sustituyendo o implementando los genes dañados que, en última instancia, son los causantes de las diferentes patologías. Con base en lo anterior; se han desarrollado diversas investigaciones de terapia génica contra una gran variedad de enfermedades, entre ellas el cáncer cervicouterino. Las principales estrategias de terapia génica contra CaCu, están enfocadas principalmente en la generación de la inmunogenicidad tumoral.

Uno de los principales retos de la terapia génica, son los métodos empleados para la introducción del ADN exógeno, dichos métodos pueden ser divididos en estrategias virales y no virales.

Los métodos de terapia génica contra el CaCu, que emplean vehículos virales para liberar el material genético, han utilizado principalmente: adenovirus, adenoasociados, virus vaccinia, alphavirus, virus de estomatitis vesicular o pseudovirus de VPH [69-76]. Además se han probado vehículos bacterianos como: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Mycobacterium bovis* [77-80].

El uso de vectores virales ha demostrado un alto grado de transfección génica, sin embargo algunas de sus limitaciones son: inducción de la inflamación, generación de reacciones inmunológicas, y se han observado algunos efectos oncogénicos [30-31]. Uno de los principales sistemas no virales para la liberación de genes es la inyección de ADN desnudo en el sitio del tumor [81-83], la cual es una estrategia segura, estable y fácil de preparar, no obstante su eficiencia de transgénesis es menor que con los sistemas virales, además que cuando se administra el ADN desnudo, éste puede ser degradado por la acción de las nucleasas celulares, y el ADN no tiene la capacidad intrínseca de amplificarse o diseminarse en las células transfectadas *in vivo* como los vectores virales. Por otro lado, también se ha observado que dicha estrategia no favorece la producción de anticuerpos neutralizantes en pacientes, por lo que tienen una inmunogenicidad limitada,

y tiene que ser administrada repetidamente. Debido a lo anterior, se han realizado esfuerzos importantes en el desarrollo de sistemas no biológicos, para la liberación de genes que permitan mantener los efectos antitumorales, y minimizar la toxicidad del tratamiento.

Algunos de los ensayos pre-clínicos y clínicos basados en ADN contra CaCu se encuentran listados en los cuadros 3 y 4.

<b>Estrategia</b>	<b>Modelo</b>	<b>Resultados</b>
<b>pCDNA-HSP60/E6/E7</b>	Ratones C57BL/6	Fuerte respuesta inmune, efecto antitumoral.
<b>IL-6/HPV16E7 DNA</b>	Ratones	Aumento en la respuesta inmune; efecto antitumoral.
<b>pcDNA3-Sig/E7/LAMP-I y pSG5-Bcl-xL DNA vacuna potenciada por pcDNA3-li-PADRE DNA</b>	Ratones C57BL/6	Efectos antitumorales; aumento de células efectoras CD8+ específicas a E7 y células T de memoria.
<b>pcDNA3-IL2-E7</b>	Ratones C57BL/6	Aumento de células T CD8+ específicas a E7; efecto protector, antitumoral y terapéutico.

Cuadro 3. Ensayos pre-clínicos de estrategias terapéuticas basadas en ADN contra VPH [63, 67].

Nombre de la estrategia/ Organización	Diseño	Blanco / fase	Población de estudio
ZYC101 / Eisai (anteriormente MGI Pharma, anteriormente Zycos).	Plásmido codificante para epítopes HLA-A2 restringidos derivados de la proteína E7 de VPH16 (aa. 83-95), encapsulados en micropartículas biodegradables de 1-2 μm de poli(lactidocoglicolido).	E7 de HPV-16 / Fase I	Hombres positivos a HPV16 con HLA-A2. Pacientes con NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) 2/3.
ZYC101a (Amolimogene bepiplasmid) / Eisai (anteriormente MGI Pharma, anteriormente Zycos).	Plásmido codificante para fragmentos de proteínas derivados de la proteína E7 de VPH 16 y 18, encapsulados en micropartículas biodegradables de 1-2 μm de poli(lactidocoglicolido).	E6 / E7 de VPH 16 / 18. Fases I y II.	Pacientes con NIC 2/3.
pNGVL4a-Sig/E7 (detox)/Hsp70 / NCI	Plásmido codificante para E7 mutada de VPH16, con el sitio de unión a Rb abolido y con una secuencia codificante para las proteínas Sig y HSP70.	E7 HPV-16 / Fase I.	Pacientes con NIC 2/3.
pNGVL4a-CRT/E7 (detox) / NCI	Plásmido codificante para E7 mutada de VPH16, con el sitio de unión a Rb abolido y con una secuencia codificante para calreticulina.	E7 VPH 16 / Fase I.	Pacientes con NIC 2/3.
VGX-3100 / Inovio Biomedical Corp / VGX Pharmaceuticals.	Plásmido codificante para E6 y E7 de VPH 16 y 18.	E6/E7 de VPH 16/18. Fase I.	Mujeres adultas posquirúrgicas o tratamiento ablativo de NIC 2/3.

Cuadro 4. Ensayos clínicos de estrategias terapéuticas basadas en ADN contra VPH [63, 67].

### **2.5.1 Terapia génica basada en genes de citosinas (Inmunoterapia)**

La inmunoterapia es una de las estrategias terapéuticas que ha sido evaluada en diversas patologías asociadas a infección por VPH, y busca la activación y/o estimulación del sistema inmune para disminuir o eliminar los tumores. Se ha observado en el tejido cervical infectado con VPH, un microambiente tumoral caracterizado por la expresión de citocinas inmunosupresoras y anti-inflamatorias como: IL-4, IL-10 y TGF $\beta$ ; las cuales participan para la persistencia del VPH y la progresión tumoral. Por lo que diversos grupos de investigación, han propuesto que la modificación en la respuesta inmune contra cáncer, usando citocinas específicas; podría ser una estrategia efectiva contra CaCu [63-65]. En este sentido, se han probado en diversas citocinas en distintos modelos tumorales experimentales, y se ha observado que la IL-2 e IL-12 desarrollan la mayor actividad antitumoral [63, 67] debido a que son capaces de activar la respuesta inmune celular, además mediante la inducción en la expresión de moléculas co-estimuladoras como: B7, cadena  $\zeta$  de CD3, MHC Clase I, se produce la activación de la respuesta inmune del hospedero y específica contra antígenos del VPH, y se ha observado una alta capacidad para revertir el estado de inmunosupresión en el microambiente tumoral [63, 71, 73, 76].

### **2.5.2 Interleucina 12 como terapia génica contra el cáncer cervicouterino**

La IL-12 es una citocina compuesta por dos subunidades: p35 y p40, cuyos genes se encuentran localizados en diferentes cromosomas (cromosomas 3 y 5 en humanos, y cromosomas 6 y 11 en ratones, respectivamente), y su expresión se encuentra regulada de manera independiente, sin embargo cuando dichas subunidades se co-expresan en la misma célula, se produce un heterodímero unido por puentes disulfuro, generando la molécula biológicamente activa llamada: IL12 p70 [84-88].

La IL-12 es producida principalmente por células inflamatorias activadas (monocitos, macrófagos, neutrófilos, microglía y células dendríticas), y en menor grado por células B [89-93]. Las funciones de la IL-12 se han estudiado principalmente en relación con los linfocitos, aunque también afecta a otros tipos celulares. Una de las funciones principales de la IL-12 es la inducción de otras citocinas. En las células T, NK y células B, la IL-12 induce la producción de INF- $\gamma$ ; la cual participa mediando muchas de las actividades pro-inflamatorias y estimula la actividad bactericida de las células fagocíticas, potenciando así la respuesta inmune innata (Figura 5).

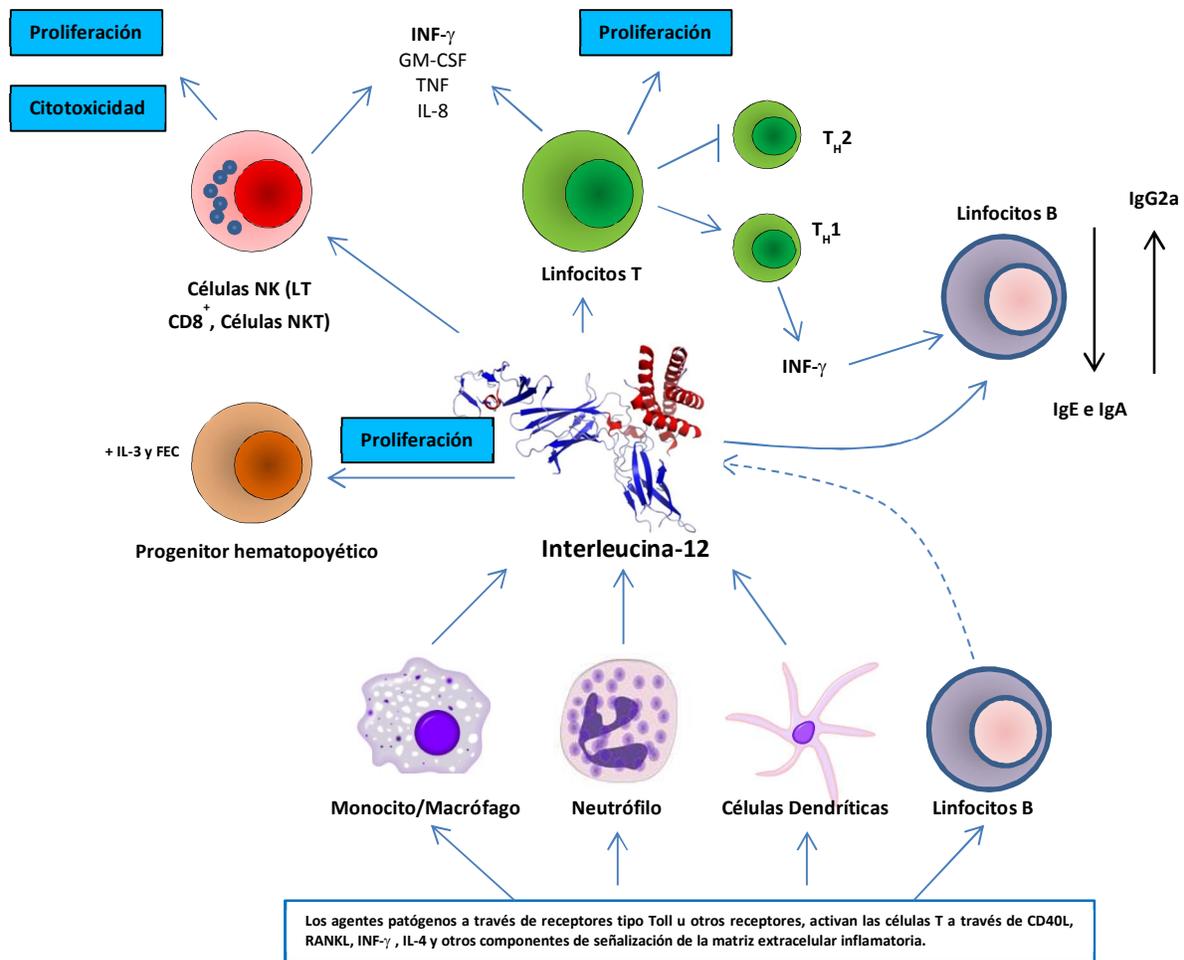


Figura 5. Fuentes celulares y respondedores de la IL-12. Las células presentadoras de antígeno y las células fagocíticas, incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, son los principales productores de la IL-12. Las principales acciones de la IL-12 son sobre las células T y NK, y se describen los principales efectos de la IL-12. (Modificado de Trinchieri G. Nat Rev Immunol. 2003 Feb; 3(2):133-46) [94].

La IL-12 es una citocina que gracias a sus propiedades como inmunomodulador de la respuesta celular y actividad antitumoral, se ha usado ampliamente en la terapia génica en diversos modelos tumorales experimentales, en ellos se ha observado la inhibición del crecimiento tumoral y la reducción del número de metástasis experimentales [95-97]. Particularmente en terapia génica contra el CaCu, la IL-12 ha demostrado un efecto adyuvante en diversos modelos animales de tumor asociados al VPH. El gen de IL-12 como terapia génica se ha utilizado empleando diferentes estrategias como: DNA desnudo, [98-99], adenovirus [100] terapia génica *ex vivo* [101], y en combinación con antígenos como E6/E7 [99-100] y con genes de moléculas inmunomoduladoras de la

respuesta inmune celular [101]. El efecto de represión de crecimiento tumoral es observado en todos los casos, además de la capacidad para inhibir la formación de metástasis experimentales, por lo que esta citocina es considerada como candidata para el tratamiento basado en la terapia génica contra el CaCu. El efecto antitumoral de la IL-12 es dependiente de la activación y expansión de los linfocitos T CD8 citotóxicos [100], y del aumento en la producción de INF- $\gamma$  en el sitio de inmunización; el cual es mediado por la activación de las células NK y NKT [97, 100]. Adicionalmente, el uso de IL-12 en la terapia génica contra el CaCu, se ha empleado en conjunto con diferentes combinaciones de citocinas en modelos tumorales experimentales asociados al VPH. La administración de IL-2 y el GM-CSF en conjunto, inhiben el crecimiento tumoral e inhiben la formación de tumores residuales después de la cirugía o quimioterapia en sistemas experimentales [102]. El tratamiento de IL-2, INF- $\gamma$  y GM-CSF en modelos experimentales asociados al VPH 16, inhiben la formación de tumores recurrentes, y no se detectan diferencias en la actividad citotóxica de células citotóxicas de bazo [102]. Por otro lado, la terapia génica con citocinas como tratamiento para el CaCu, ha sido probada en conjunto con terapia combinada; usando RNA antisentido para E7 [99], antígenos de VPH [100], terapia génica suicida [101] y moléculas co-estimuladoras de la respuesta inmune celular (B7-1 y B7-2) [102].

### **2.5.3 Métodos para la transferencia de genes**

Uno de los grandes retos de la terapia génica, es la liberación eficiente y segura de los genes *in vivo*. Para poder acarrear los genes terapéuticos a las células diana, se requieren de elementos moleculares llamados vectores; en los que el gen deseado se empaqueta y puede ser liberado de manera segura dentro de la célula receptora. Los sistemas de liberación del material genético exógeno en las células pueden ser clasificados en métodos físicos, químicos y biológicos (cuadro 5). La elección del método de transferencia depende de la naturaleza de la enfermedad, del período en la expresión génica (períodos cortos o largos) y si se requiere un nivel de expresión alto o bajo [28, 103-105]. Para poder obtener dichas propiedades, es necesario desarrollar diversas estrategias que permitan que el vector favorezca la liberación intracelular del ADN intacto, que permita alcanzar una expresión eficiente del gen y la seguridad en el tejido blanco.

Métodos físicos	Métodos químicos	Métodos biológicos
<ul style="list-style-type: none"> <li>•ADN desnudo</li> <li>•Microinyección</li> <li>•Biobalística</li> <li>•Electroporación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Fosfato cálcico</li> <li>•Liposomas</li> <li>•Lípidos catiónicos</li> <li>•Polímeros catiónicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Retrovirus</li> <li>•Lentivirus</li> <li>•Adenovirus</li> <li>•Adenoasociados</li> <li>•Herpesvirus</li> <li>•Poxvirus</li> <li>•Virus de estomatitis vesicular</li> <li>•Alfavirus</li> </ul>

Cuadro 5. Métodos de transferencia de genes utilizados en terapia génica.

## 2.5.4 Métodos biológicos

### Vectores virales

Los métodos biológicos utilizados para la transferencia génica se basan principalmente en la utilización de vectores virales, los cuales son virus recombinantes modificados genéticamente, que son capaces de transferir el material genético que transportan a una célula hospedera. Algunas de las modificaciones de los vectores virales permiten que sean carentes de replicación, e incapaces de causar enfermedad cuando se introducen a la célula.

La eficiencia en la liberación del material genético por parte de los vectores virales a la célula hospedera, es mayor que la de los vectores no virales, debido a que presentan mecanismos como: la penetración y unión a la célula, escape de los compartimentos intracelulares, transporte activo del material genético al núcleo celular, y además protegen a los ácidos nucleicos de su degradación enzimática; por lo que son considerados los sistemas más efectivos en la liberación de genes [80-86]. Sin embargo, los vectores virales también presentan muchas limitantes en su aplicación en terapia génica, pues algunos de ellos como los retrovirus y los virus adenoasociados, pueden integrar el DNA viral en los cromosomas de la célula hospedera, provocando mutagénesis insercional. Además la administración repetida con adenovirus, puede inducir la respuesta inmune y la eliminación en la expresión del transgen; por otro lado el tamaño del gen insertado es limitado, pues presentan una baja capacidad de empaquetamiento, y su proceso de producción a gran escala es costoso y difícil [82, 84, 87-88]. En el cuadro 6, se muestra una comparación de los diferentes vectores virales utilizados en terapia génica.

		FAMILIA						
Características de la partícula		Adenovirus	Virus Adenoasociados	Alfa virus	Herpesvirus	Retrovirus /Lentivirus	Virus Vaccinia	
	<b>Genoma</b>	DNAds	DNAds	RNAds (+)	DNAdc	RNAds (+)	DNAdc	
	<b>Cápside</b>	Icosahedrico	Icosahedrico	Icosahedrico	Icosahedrico	Icosahedrico	Complejo	
	<b>Envoltura</b>	Desnudo	Desnudo	Envoltura	Envoltura	Envoltura	Envoltura	
	<b>Polimerasa</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	
	<b>Diámetro</b>	70-90 nm	18-26 nm	60-70 nm	150-200 nm	80-130 nm	170-200 X 300-450 nm	
	<b>Tamaño del genoma</b>	38 – 39 kb	5 kb	12 kb	120-200 kb	3-9 kb	130-280 kb	
Propiedades de la terapia génica	<b>Infección / Tropismo</b>	Células en división y sin división	Células en división	Células en división y sin división				
	<b>Interacción Genoma / Hospedero</b>	Sin integración	Sin integración	Sin integración	Sin integración	Integración	Sin integración	
	<b>Expresión del transgen</b>	Transitoria	Potencial de larga duración	Transitoria	Potencial de larga duración	Larga duración	Transitoria	
	<b>Capacidad de empaquetamiento</b>	7.5 kb	4.5 kb	7.5 kb	> 30 kb	8 kb	25 kb	

Cuadro 6. Comparación de diferentes vectores virales utilizados en terapia génica. Visión general de las ventajas y desventajas. Modificado de: <http://www.genetherapy.net.com/viral-vectors.html>.

### 2.5.5 Métodos físicos

En los últimos años se han estudiado diversos vehículos no virales para la liberación de genes. Las diferentes estrategias han explorado propiedades físicas, donde se buscan mecanismos para liberación de genes libre de acarreadores, y estrategias químicas; basadas en la liberación de genes empleando vectores sintéticos o naturales.

Los métodos físicos incluyen: inyección del material genético, electroporación, pistolas de genes, ultrasonido y liberación hidrodinámica [106-112] (Cuadro 7).

<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Limitantes</b>
<b>Inyección</b>	Simple y seguro.	Baja eficiencia.
<b>Electroporación</b>	Alta eficiencia.	Limitadas aplicaciones, es necesaria la intervención quirúrgica, no útil para aplicaciones tópicas.
<b>Liberación hidrodinámica</b>	Alta eficiencia, sencillo, efectivo para la liberación génica en el hígado.	Efectivo en animales pequeños, es necesario procedimiento quirúrgico.
<b>Ultrasonido</b>	Buen potencial para la liberación génica sitio-específica.	Baja eficiencia <i>in vivo</i> .

Cuadro 7. Ventajas y limitantes de los métodos físicos de liberación génica actuales. (Modificado de Xiang, G. 2007) [123].

### 2.5.6 Métodos químicos

Los métodos químicos se basan en la utilización de lípidos catiónicos y polímeros que son biocompatibles, cuya producción y análisis son sencillos y presentan flexibilidad en el tamaño y liberación del transgen, además de presentar baja inmunogenicidad [113-116]. De acuerdo a la formulación de los vectores químicos no virales, pueden ser categorizados en 4 grupos: I) Aquellos capaces de formar complejos con el plásmido, protegiendo al ADN de su degradación por nucleasas y suero, II), aquellos diseñados para la liberación del ADN en tipos celulares específicos, III) aquellos diseñados para incrementar la liberación del ADN en el citosol o núcleo y, IV) aquellos diseñados para controlar la liberación del ADN, hasta alcanzar una expresión continua controlada [103, 117-120].

Algunas de las limitantes de los sistemas de liberación génica no viral, es su menor eficiencia de transfección comparados con los sistemas virales; pues estos requieren de 1 a 10 copias del transgen, alcanzando una eficiencia del 100% de transferencia, mientras que los sistemas no virales requieren aproximadamente  $10^6$  copias del plásmido para transfectar una célula, con cerca de  $10^2 \sim 10^4$  copias del transgen que son transferidas al núcleo celular para su expresión [103, 121-122]. Algunas de las ventajas y limitaciones de los sistemas de liberación génica no viral se encuentran resumidas en el cuadro 8.

<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Limitantes</b>
<b>Inyección</b>	Simple y seguro.	Baja eficiencia.
<b>Lípidos catiónicos</b>	Alta eficiencia <i>in vitro</i> ; bajo a medio alto para la liberación génica local y sistémica.	Respuesta inmune aguda. Actividad limitada <i>in vivo</i> .
<b>Polímeros catiónicos</b>	Alta efectividad <i>in vitro</i> ; bajo a medio alto para la liberación génica local y sistémica.	Toxicidad a las células, respuesta inmune aguda.
<b>Híbridos Lípido / Polímeros</b>	Eficiencia media a alta <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ; baja toxicidad.	Baja actividad <i>in vivo</i> .

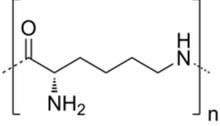
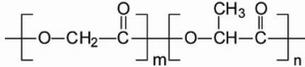
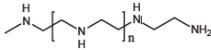
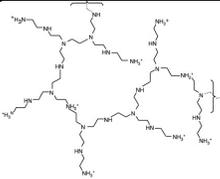
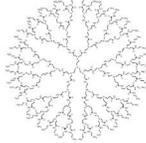
Cuadro 8. Ventajas y limitantes de los métodos químicos de liberación génica actuales. (Modificado de Xiang, G. 2007) [123].

## 2.6. Polímeros catiónicos en terapia génica.

En actualidad, se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer, las cuales tienen como objetivo minimizar la toxicidad de los tratamientos. La terapia génica se vislumbra como una alternativa terapéutica muy promisoriosa, y recientemente se están estudiando diferentes vehículos no virales que además de favorecer la liberación de genes, disminuyan las reacciones inmunológicas, permitan la posibilidad de realizar administraciones repetidas *in vivo* sin consecuencias adversas, y faciliten la creación de complejos específicos para la liberación y expresión dirigida a determinados tipos celulares y presenten mayor seguridad para el paciente debido a la poca o nula secuencia viral utilizada en el sistema. En este contexto, diversos sistemas para la liberación continua de genes terapéuticos basados en polímeros han sido probados [124-125].

Los polímeros catiónicos forman complejos con el ADN mediante interacciones electrostáticas entre los grupos aminos de los policationes cargados positivamente con los grupos fosfato del ADN que contienen cargas negativas. Los complejos polímero/ADN quedan cargados positivamente, lo que les permite interactuar con moléculas de la superficie celular que contienen cargas negativas como las glicoproteínas y glucolípidos, y entrar a las células por endocitosis. Dentro de los polímeros catiónicos con un gran potencial para terapia génica no viral se encuentra: la poli (L-lisina) (PLL), ácido poli(láctico-glucólico) (PLGA), dietilaminoetil (DEAE)-dextrán, protamina, poliamidoamina

(PAMAM), Polietilenimina (PEI), dendrímeros catiónicos y el quitosano [122, 121-127].  
Cuadro 9.

NOMBRE	ESTRUCTURA
<b>Poli (L-lisina) PLL</b>	
<b>Ácido poli(láctico-glucólico) (PLGA)</b>	
<b>Polietilenimina (PEI Linear)</b>	
<b>Polietilenimina (PEI ramificado)</b>	
<b>Poliamidoamina (PAMAM)</b>	

Cuadro 9. Principales polímeros catiónicos utilizados como acarreadores de ADN.

### 2.6.1. Poli (L-lisina) (PLL).

PLL es uno de los primeros polímeros utilizados para la liberación de genes. De acuerdo a su estructura peptídica, los grupos amino de la lisina se encuentran protonados a pH neutro, los cuales interactúan electrostáticamente con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos que se encuentran cargados negativamente, y favorecen la formación de nanopartículas. Su naturaleza química favorece su biodegradación, lo cual favorece su utilización en modelos *in vivo*, sin embargo PLL ha demostrado relativamente alta citotoxicidad, además de una baja eficiencia de transfección al ser utilizado solo o sin modificaciones, posiblemente debido a la carencia de grupos amino con una  $pK_a$  entre 5 – 7, generando su incapacidad para escapar de la vía endocítica, y como consecuencia presentando bajos niveles en la expresión del transgen [128-129]. Con la finalidad de aumentar la eficiencia de transfección y disminuir la citotoxicidad de la PLL, se han

generado complejos con otras moléculas como: cloroquina, péptidos fusogénicos, residuos de histidina, quitosano, ácido mirístico y esteárico, polietilenglicol, transferrina, folato, anticuerpos monoclonales, entre otros [130-132].

### **2.6.2. Ácido poli(láctico-glicólico) (PLGA).**

El PLGA es un polímero biodegradable y biocompatible que ha sido utilizado como vehículo acarreador de ácidos nucleicos, su principal característica es que la tasa de liberación puede ser controlada de acuerdo a su peso molecular, y a la composición del copolímero de PLGA. Por otro lado, se ha demostrado que el PLGA presenta una menor citotoxicidad que los lípidos y polímeros catiónicos, sin embargo su eficiencia de transfección es baja, por lo que se han desarrollado diversas estrategias para aumentar su eficiencia de transfección, algunas de las estrategias realizadas incluyen las formulaciones con otros polímeros como: polietilenoimina (PEI), poliaminas catiónicas o polisacáridos como quitosano. También cuando las micropartículas de PLGA conteniendo un gen reportero han sido recubiertas con dimetil didodecilamonio (DMAB), su eficiencia de transfección aumenta significativamente comparado con las nanopartículas de PLGA no modificadas [131-138].

### **2.6.3. Protamina.**

La protamina es una proteína utilizada para la liberación de genes, la cual debido a que contiene grupos amino con carga positiva, es capaz de interactuar electrostáticamente con las cargas negativas del ADN, aunque no se ha determinado la manera precisa de su interacción, debido a que la estructura de la protamina no ha sido determinada. Una de las principales limitantes en la utilización de la protamina para transfección génica, es la baja densidad de sus grupos amino; lo cual provoca que su eficiencia de transfección sea baja; es por ello que se han realizado complejos protamina/ADN cubiertas con moléculas como el polietilenglicol (PEG), con el fin de reducir el potencial eléctrico y aumentar su eficiencia de transfección, este tipo de complejos modificados, han mostrado buenos resultados cuando la protamina es digerida por métodos enzimáticos, se obtiene una protamina de bajo peso molecular, aumenta significativamente su eficiencia de transfección y disminuye su citotoxicidad, comparada con los complejos sin modificar [139-140].

#### **2.6.4. Poliamidoamina (PAMAM)**

PAMAM es un polímero catiónico esférico altamente ramificado, por lo que es categorizado como un dendrímero. El PAMAM contiene diversos grupos amido y amina, lo que le permite interactuar electrostáticamente con el ADN y su núcleo esférico conduce a la encapsulación del material genético. La biocompatibilidad del PAMAM, se debe a su estructura, peso molecular y carga de superficie. La liberación de los complejos PAMAM/ADN por endosomas ha sido atribuida a la protonación interna de sus nitrógenos por protones endosomales, conduciendo a la hinchazón del endosoma y liberando el ADN al citoplasma. Su eficiencia de transfección es alta, sin embargo su citotoxicidad también es significativa, por lo que se le han realizado diversas modificaciones químicas con el fin de reducir su citotoxicidad y aumentar su capacidad de transgénesis [141-143]. La complejidad de su síntesis ha limitado sus aplicaciones clínicas.

#### **2.6.5. Polietilenimina (PEI).**

PEI es un polímero con una alta densidad de carga catiónica, que puede encontrarse en forma lineal o ramificado; se sintetiza a partir de la polimerización de la aziridina, y su composición es de aproximadamente 25% de aminas primarias, 50% de aminas secundarias y 25% de aminas terciarias. En su forma lineal todos los átomos de nitrógeno están protonados, mientras que en su forma ramificada, solo dos tercios están cargados. En medio fisiológico la mayoría de las aminas no están protonadas, mientras que a pH 5, cerca del 45% de los átomos de nitrógeno están protonados [144-146].

PEI ha demostrado una alta eficiencia para la transferencia de genes sin la necesidad de agentes endosmolíticos o lisosomotrópicos, posiblemente debido a su capacidad para amortiguar el contenido endosomal, el cual facilita el escape del material genético [147], sin embargo la alta eficiencia de transfección del PEI, no depende únicamente de su densidad catiónica, sino también de su peso molecular; el PEI de alto peso molecular (25 kDa) es altamente eficiente para la transgénesis, pero es altamente tóxico en diversas líneas celulares; sin embargo el PEI de bajo peso molecular (2 kDa o menor), es prácticamente no tóxico pero muy ineficiente para la liberación génica [147-149]. La alta capacidad del PEI para transfectar ADN plasmídico en diversas líneas celulares, se debe a su alta capacidad para condensar al ADN en partículas coloidales,

sin embargo la aplicación clínica del PEI se ha limitado debido a su toxicidad aguda. El principal efecto tóxico del PEI es atribuido a su capacidad para permeabilizar membranas celulares, la cual se encuentra directamente relacionada con la concentración, pues es capaz de generar disrupción lisosomal cuando se utiliza a una concentración de 1000  $\mu\text{M}$  o mayor, mientras que a concentraciones de 150  $\mu\text{M}$  o menores no afecta la membrana plasmática [127,150-151].

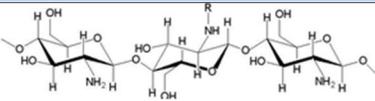
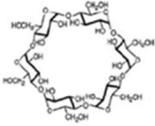
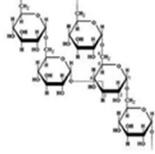
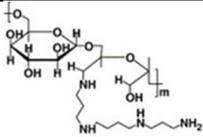
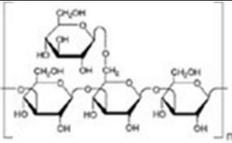
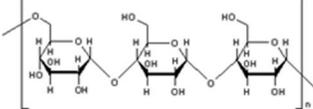
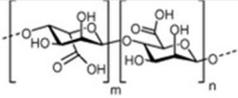
PEI ha sido ampliamente modificado con la finalidad de reducir la toxicidad y mejorar su eficiencia de transfección. La PEGilación de complejos PEI/ADN, aumenta su solubilidad en agua y disminuye su toxicidad. También cuando el PEI es acetilado, la eficiencia de transfección de los complejos aumenta, y su toxicidad disminuye, comparado con el PEI sin modificar [152-153]. PEI ha sido probado en diversos modelos de estudio *in vivo*, obteniendo buenos niveles de expresión génica en: riñón de rata por inyección intra arterial, tumores murinos, cerebro de ratón, inyección directa y en pulmones de conejo, sin embargo se han observado diversos efectos citotóxicos [154-156].

## **2.7. Polisacáridos como vehículos no virales para terapia génica.**

Los polisacáridos constituyen los más abundantes de las 4 macromoléculas biológicas que existen, se clasifican de acuerdo a su secuencia, a los enlaces que forman con su monosacárido principal, a la configuración anomérica de sus enlaces, al tamaño del anillo (furanosa o piranosa), a su configuración absoluta D o L y a la presencia de otras moléculas. Las propiedades fisicoquímicas de los polisacáridos pueden estar influenciadas por sus características a nivel estructural; y de acuerdo a todas esas propiedades, participan de distintas maneras en los organismos vivos como: almacenamiento, transporte de energía y estructurales.

El uso de polisacáridos como bloques constructores para el desarrollo de sistemas de liberación génica ha aumentado rápidamente, debido a sus propiedades como biocompatibilidad, biodegradación, baja toxicidad y bajo costo. Además la variedad en sus propiedades fisicoquímicas y facilidad en la realización de modificaciones químicas, permiten la posibilidad de diseñar una amplia variedad de compuestos para la

transferencia de moléculas con fines terapéuticos [157-158]. En el cuadro 10 se muestran los principales polisacáridos utilizados para la liberación de nucleótidos.

NOMBRE	ESTRUCTURA
<b>Quitosano</b>	
<b>Ciclodextrina</b>	
<b>Dextrán</b>	
<b>Dextrán-espermina</b>	
<b>Esquizofilan</b>	
<b>Pululán</b>	
<b>Ácido algínico</b>	

Cuadro 10. Principales polisacáridos utilizados en terapia génica.

## 2.8. Quitosano.

### 2.8.1. Síntesis de Quitosano.

El quitosano es un polisacárido de origen natural derivado de la quitina, la cual es un poli[ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranos], (GlcNAc) o también conocido como poli-N-acetilglucosamina (Figura 6), y es uno de los materiales orgánicos de origen natural más abundantes en el mundo.

La biosíntesis de la quitina es realizada por un gran número de organismos vivos, particularmente por crustáceos, moluscos e insectos, y es el principal componente del exoesqueleto de los artrópodos. La quitina también puede presentarse en ciertos hongos de la familia *Mucoracea* y en levaduras, formando parte de su pared celular.

La quitina puede encontrarse en tres aloformas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La  $\alpha$  quitina es la forma más abundante, mientras que la  $\beta$  quitina es rara y se encuentra asociada con proteínas en los calamares [159-160]. De acuerdo a las propiedades estructurales de la quitina, puede interaccionar generando una red organizada de fibras que le confiere rigidez y resistencia a los organismos que la contienen [161-162].

La quitina es un material altamente insoluble en agua y solventes orgánicos comunes. Químicamente no es reactivo; lo que limita sus aplicaciones. Sin embargo, la quitina puede modificarse químicamente en sus grupos amino primario y sus grupos hidroxilo libres, lo que favorece su solubilidad en agua y solventes orgánicos, lo que le permite ser utilizado para diversas reacciones y generar algunos derivados como el quitosano, el cual es producido por la desacetilación alcalina de la quitina [162-165].

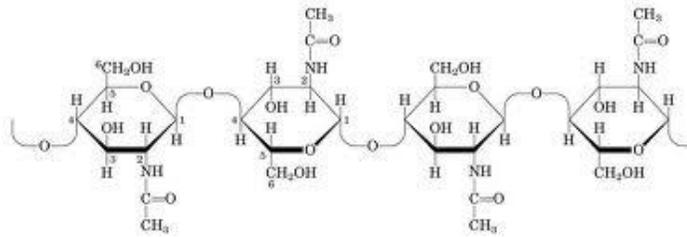


Figura 6. Estructura molecular de la Quitina. Conformada por copolimeros continuos de residuos de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina.

La principal fuente comercial de la quitina son los cangrejos y camarones, la cual contiene entre 30-40% de proteínas, 30-50% de carbonato de calcio, 20-30% de quitina, además de lípidos y pigmentos como: astaxantina, cantaxantina, luteína o  $\beta$ -caroteno. La síntesis del quitosano a partir de la quitina requiere de 4 pasos generales: desmineralización, desproteínización, decoloración y desacetilación [166-168], (Figura 7).

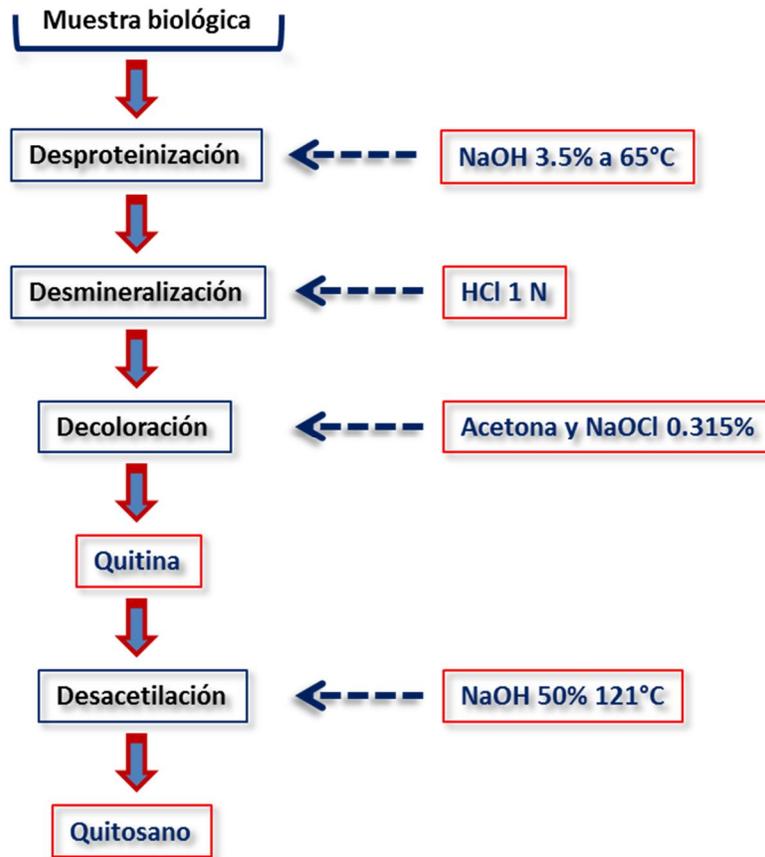


Figura 7. Diagrama de flujo de producción de Quitosano. Modificado de Kurita, K. 1986) [165].

La desmineralización consiste en un tratamiento ácido para eliminar el carbonato de calcio, seguida de una extracción alcalina para solubilizar las proteínas (desproteínización), o mediante hidrólisis enzimática (usando una quitina desacetilasa) [169-170]. Durante el proceso de desproteínización, se puede generar la formación de espuma, pero esta no es tan rápida e intensa como la que se produce durante la desmineralización. Adicionalmente se realiza un paso de decoloración, realizado para remover los pigmentos residuales y obtener un producto sin color. Esos tratamientos necesitan ser adaptados para cada fuente de quitina, debido a las diferencias en la ultraestructura del material inicial. Finalmente, se realiza una desacetilación parcial, bajo condiciones fuertemente alcalinas para remover los grupos acetilo y convertir la quitina en quitosano (Figura 8). Los grupos N-acetil, no pueden ser removidos mediante reactivos ácidos sin

hidrólisis del polisacárido, por lo que los métodos alcalinos son los que producen mejores resultados para la N-desacetilación [170]. Existen diversos factores críticos que afectan el grado de desacetilación de la quitina, los principales son: la temperatura y tiempo de desacetilación, la concentración del álcali, los tratamientos previos aplicados en la obtención de la quitina, la presión atmosférica, la proporción quitina-álcali, la densidad de la quitina y el tamaño de la partícula [171-172]. Todos esos parámetros son necesarios para la obtención del quitosano. Cuando la quitina alcanza un contenido de nitrógeno mayor al 7% de su peso, o cuando su grado de desacetilación es de alrededor del 50% es llamada quitosano [173].

Además de los métodos químicos para la obtención de quitosano, también se han desarrollado diversos procesos biotecnológicos basados principalmente en el uso de enzimas. Se han utilizado enzimas proteolíticas como: alcalasa, quimiotripsina y papaína para extraer las proteínas y obtener inicialmente la quitina, también se han utilizado tallos de bromelia obteniendo mejores resultados que con la papaína. Por otro lado, también se han utilizado proteasas de aislados bacterianos como: *Pseudomonas maltophilia*, *Bacillus sp.* *Pseudomonas aeruginosa* F722, *Nephrops norvegicus*, *Enterococcus faecium* y *Pediococcus acidilactici*. Cuando la quitina es obtenida, se han utilizado diversas enzimas para la obtención del quitosano, su principal funcionamiento es la desacetilación de la quitina, empleando quitina desacetilasa, la cual puede ser obtenida de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Mucor rouxii*, *Abisidia butleri* o *Aspergillus nidulans*. Sin embargo los distintos métodos de preparación, resultan en diferentes grados de desacetilación, variación en la distribución de los grupos acetilo, longitud de la cadena y estructuras conformacionales [174]. A pesar de las distintas variaciones que se han realizado en los métodos enzimáticos para la obtención del quitosano, el tiempo de reacción es mayor que cuando se utilizan métodos químicos. Además los costos de las enzimas son muy elevados comparado con el método químico; también se han reportado diversos problemas al tratar de realizar el escalamiento del proceso, por lo que la implementación de

los métodos enzimáticos a nivel industrial para la obtención de quitosano es aún limitado.

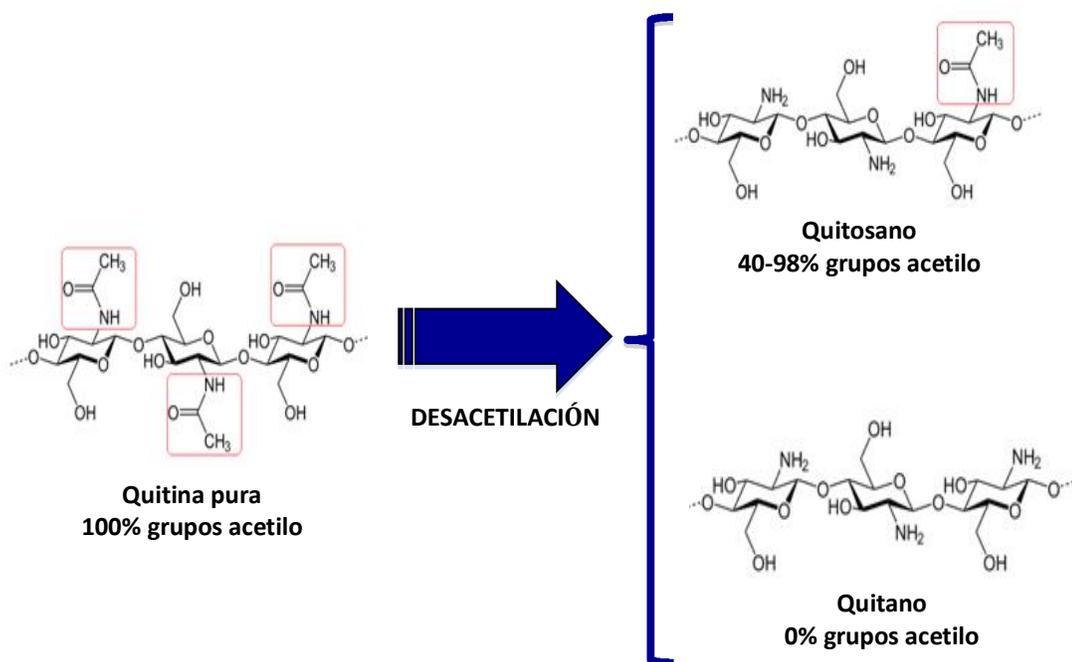


Figura 8. Desacetilación de la Quitina para obtención de Quitosano.

### 2.8.2. Propiedades fisicoquímicas.

El quitosano es un heteropolímero catiónico lineal de origen natural, que se obtiene a partir de la N-desacetilación de la quitina, y está compuesto por unidades de  $\beta(1-4)$  2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa (N-acetilglucosamina) ( $\alpha$  20%), y 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa (D-glucosamina) ( $\beta$  80%); unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$  (1,4) [159-160, 175-176]. La distribución de su cadena depende del método empleado para su obtención, pues debido a ello se puede obtener una variación en el grado de N-desacetilación, que casi nunca es completa. El quitosano contiene un grupo amino primario en los residuos de D-glucosamina, con un valor de pKa en el intervalo de 6.2 a 7 y dos grupos hidroxilo libres por cada monómero, su fórmula unitaria es  $C_6H_{11}O_4N$  [176-177]. Debido a los puentes de hidrógeno intermoleculares que contiene, y la ionización del grupo amino, el quitosano es insoluble a pH neutro o alcalino. A pH ácido, los grupos amino del polímero se encuentran protonados, lo que incrementa su solubilidad, sin

embargo su grado de desacetilación (entre el 40 al 98%) y su peso molecular (50 a 2000 kDa), pueden afectarla, lo cual impacta en la generación de formulaciones para su aplicación [34, 179]. Por otro lado, los azúcares que constituyen al quitosano (glucosamina y N-acetilglucosamina), se encuentran en los tejidos de los mamíferos, y permite su biocompatibilidad con tejidos animales y humanos [180], lo que ha permitido su autorización por la FDA (US Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) para su utilización en diversos dispositivos médicos (Datos disponibles en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMN/pmn.cfm>. (acceso Septiembre 10, 2012), sin embargo, debido a la gran variabilidad entre las propiedades fisicoquímicas del quitosano, su autorización en aplicaciones biomédicas requiere de mayor información en cuanto a la fuente, caracterización, pureza, destino, historia regulatoria y adherencia a la farmacopea y estándares internacionales (información disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>, <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/> y <http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/CDER/UCM135688.pdf>).

Los principales aspectos fisicoquímicos que deben ser analizados en el quitosano son: grado de pureza, peso y distribución molecular, longitud de la cadena, grado de desacetilación, densidad y distribución de la carga, formas de la sal, viscosidad y valor de retención de agua; pues todas esas propiedades determinan la aplicación final del polímero [34, 177-179].

### **2.8.3. Peso Molecular**

La determinación del peso molecular de los polisacáridos es de suma importancia para direccionar las aplicaciones más eficientes de los mismos. Existen diversas evidencias que indican que la mayoría de las actividades fisiológicas y propiedades funcionales del quitosano dependen de su peso molecular, pues este afecta sus propiedades de viscosidad, solubilidad, adsorción en sólidos, elasticidad y fuerza de ruptura [181].

El peso molecular del quitosano está definido por el número de unidades de azúcar por molécula de polímero (n) [4], y está influenciado por las variables

presentadas durante el proceso de desacetilación, tales como: el tiempo, la temperatura, la concentración y naturaleza del material de origen y las condiciones atmosféricas [182].

Dependiendo de la fuente y procedimiento de preparación del quitosano, su peso molecular promedio puede presentarse en un intervalo de 50 a 1000 kDa, 3.8 a 2000 kDa y de 50 a 2000 kDa [183-184], pero de manera general se clasifica como quitosano de bajo, mediano y alto peso molecular. A nivel termodinámico, el peso molecular del quitosano, favorece la posibilidad de generar asociaciones intracatenarias favorecidas por los puentes de hidrógeno. Cuando aumenta el peso molecular, la agregación entre las cadenas del polímero se vuelve favorable, y la fuerza iónica es suficientemente alta para favorecer la condensación de los contra-aniones, lo que le permite interactuar con diversas moléculas. Además el incremento en el peso molecular, produce un aumento en la viscosidad de la solución, por lo que resulta complicado preparar soluciones de quitosano con una concentración superior a 2-3%, y la disminución del peso molecular, podría aumentar potencialmente la concentración de la solución y mejorar la solubilidad del polímero [175, 185].

El peso molecular del quitosano puede ser determinado por diversos métodos como viscometría, cromatografía de permeación en gel, dispersión dinámica de luz y espectrofotometría [186]. Los principales efectos del peso molecular del quitosano se resumen en la figura 9.

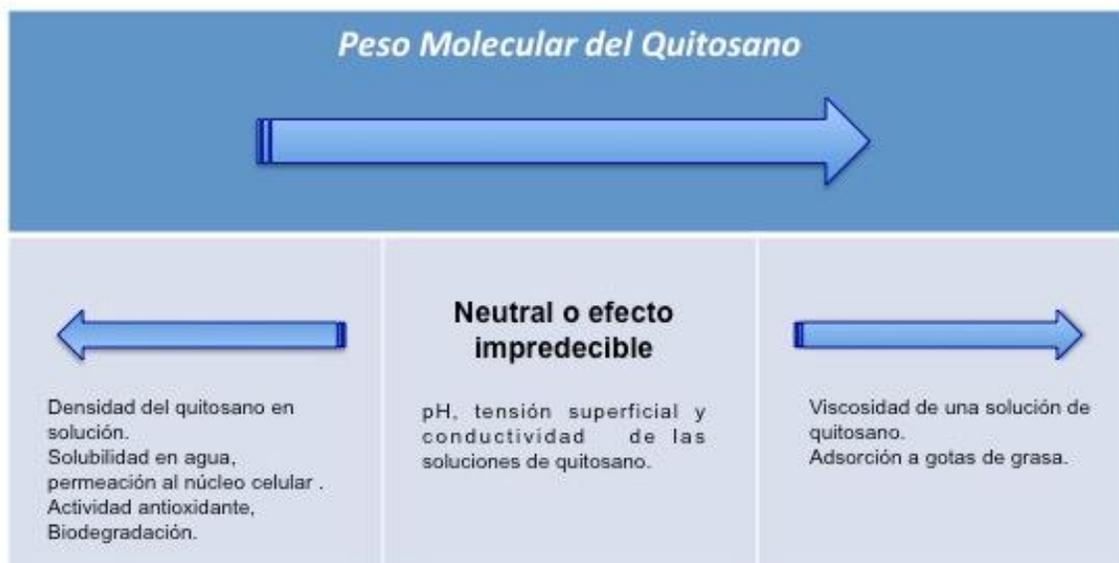


Figura 9. La influencia del peso molecular en algunas propiedades del quitosano y sus soluciones. Como consecuencia del incremento en el peso molecular, algunas propiedades Físicoquímicas y biológicas del quitosano y sus soluciones cambian, lo cual determina la bioactividad del material (Modificado de Kumirska, 2011) [187].

#### 2.8.4. Grado de desacetilación.

El grado de desacetilación (GD) es uno de los parámetros de gran importancia que deben ser evaluados en el quitosano, y corresponde a la proporción de residuos *N*-acetil-D-glucosamina por unidades estructurales de D-glucosamina. El grado de desacetilación permite diferenciar entre la quitina y el quitosano, cuando el número de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina es del 50% el biopolímero es llamado quitosano, sin embargo cuando el número de *N*-acetil-D-glucosamina es mayor al 50 % se le llama quitina. Por lo tanto el proceso de desacetilación involucra la remoción de los grupos acetilo de la cadena molecular de la quitina, manteniendo el grupo amino completo ( $-NH_2$ ) [188-189]. Para incrementar el contenido de grupos amino en el quitosano y aumentar el grado de desacetilación se debe realizar un tratamiento alcalino repetido de la quitina, sin embargo algunas variables en el proceso como el tiempo de tratamiento, la temperatura y la fuerza de la solución alcalina, pueden influenciar el grado de desacetilación final del quitosano, lo cual tiene un impacto en el grado de absorción de humedad, distribución de carga, viscosidad intrínseca y solubilidad del quitosano en soluciones acuosas, y determina

muchas de sus aplicaciones [4, 188, 190-191]. El grado de desacetilación mayor al 75% del quitosano, le proporciona un valor intrínseco de  $pK_a$  cercano a 6.5, lo cual favorece que el biopolímero pueda diluirse en soluciones acidas, lo anterior es debido a que los grupos amino que se encuentran protonados de los residuos de glucosamina en la solución ácida, lo cual interrumpe los enlaces de hidrógeno intracatenarios y favorecen interacciones polímero-solvente más favorables [175-181].

Existen diversos métodos para definir el grado de desacetilación, algunos de los principales son: espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, espectrofotometría ultra-violeta, Resonancia magnética nuclear  $H^1$ , varios métodos de valoración, análisis elemental, degradación ácida seguida de HPLC, análisis térmico, determinación de ácido nitroso, entre otros [186]. A nivel comercial el quitosano se encuentra disponible con grados de desacetilación entre 50-90%, 66-95% ó 40-98%, lo cual permite su utilización en diversas áreas de estudio (Sigma-Aldrich).

### **2.8.5. Solubilidad.**

El bajo grado de solubilidad del quitosano, es una de las principales limitantes para su aplicación. El quitosano puro tiene una  $pK_a \cong 6.5$ , por lo que es considerado un polielectrolito catiónico, y además debido a su estructura cristalina estable y rígida; es insoluble en agua, en medio alcalino, en soluciones acuosas con  $pH > 7$ , e incluso en solventes orgánicos. Sin embargo, puede disolverse en ciertos ácidos orgánicos e inorgánicos, entre ellos los ácidos hidrociorídrico, fosfórico, láctico, glutámico, málico, propiónico, succínico, acético, tartárico, cítrico y fórmico [162-168].

La propiedad del quitosano para diluirse en soluciones ácidas, depende de la distribución de sus grupos acetilo presentes a lo largo de la cadena; pero principalmente de la distribución y cantidad de grupos amino libres. Dichos grupos, le permiten modificar sus características conformacionales, mediante uniones de hidrógeno intra y/o intermoleculares; lo que ocasiona la generación de fuerzas asociativas entre las cadenas. Cuando el quitosano es disuelto en un medio acuoso ácido a un  $pH < 6.5$ , el polisacárido adquiere una carga positiva alta en los grupos  $-NH_3^+$ , lo que le permite interactuar con superficies cargadas negativamente [181, 192-194].

Por otro lado, el valor de  $pK_a$  del quitosano es altamente dependiente del grado de N-acetilación. Por lo tanto, su solubilidad es dependiente de su grado de disociación, el

método de desacetilación y el tipo de ácido utilizado para su producción. En este sentido, la solubilidad puede ser un factor limitante en su utilización; debido a que el quitosano es insoluble y poco efectivo para su absorción, lo cual es un factor limitante, principalmente en aplicaciones biomédicas a pH fisiológico (7.4), [195]. Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias para mejorar su solubilidad, y favorecer su implementación en sistemas con un amplio intervalo de pH. En este sentido, se han desarrollado estrategias basadas en la hidrólisis parcial del quitosano, para generar una disminución en su peso molecular, y permitir su fácil solubilidad en agua. El acortamiento de sus cadenas laterales y grupos amino libres; permite la obtención de quitosano de bajo peso molecular, con baja viscosidad y alta solubilidad a pH neutro [196].

#### **2.8.6. Viscosidad.**

La viscosidad es una propiedad de los fluidos, que direcciona de manera importante su utilización hacia una aplicación en particular. Las soluciones que contienen quitosano, presentan la capacidad de formar soluciones viscosas; las cuales pueden funcionar como agentes espesantes, estabilizadores o de suspensión.

Derivado de diversas pruebas reológicas, se ha demostrado que las soluciones que contienen quitosano; presentan propiedades de pseudoplástico y viscoelásticas. Sin embargo, su viscosidad puede ser afectada por factores propios del quitosano como: su grado de desacetilación, peso molecular, y además por factores propios de su síntesis, entre ellos, la concentración y tipo de solventes utilizados, temperatura, fuerza iónica y de manera muy importante el pH de la solución [181, 189].

Cuando una solución que contiene quitosano se encuentra a valores de pH menores a 4, la mayoría de sus grupos amino se encuentran protonados, lo cual genera un efecto de repulsión electrostática, entre los grupos con la misma carga; esto conduce al aumento en la expansión del polímero. Cuando el quitosano se encuentra en solución a pH 5.2, se generan estructuras inestables; mientras que a pH mayor a 6.5 (el cual es aproximadamente la  $pK_a$  del grupo amino del quitosano), el tamaño de los agregados aumenta, y se genera la fase de precipitación [192,197].

En el SIU (Sistema Internacional de Unidades), la unidad física de viscosidad dinámica es el pascal-segundo (Pa·s). El intervalo de viscosidad del quitosano comercial es de 10 a 1000 mPa·s, en una relación de quitosano al 1% p/v en ácido acético al 1%, a 25°C [186].

### 2.8.7. Reactividad química.

El quitosano y sus derivados contienen 3 tipos de grupos funcionales reactivos. Contiene un grupo amino en la posición C2 de cada unidad desacetilada, y dos grupos hidroxilo (primario y secundario), en las posiciones C6 y C3; los cuales pueden ser manipulados por medios fisicoquímicos, para mejorar su solubilidad a pH neutro y modificar su estructura [190, 198].

Los grupos amino del quitosano, pueden ser modificados por diversas reacciones químicas; lo que le permite su conjugación con diversas moléculas. Dichas interacciones favorecen que el quitosano pueda ser acarreado a diversos compartimentos, o generar diversos biomateriales, los cuales presentan características biocompatibilidad y baja o nula toxicidad [190, 199-200]. Algunos de los principales polímeros que han sido acoplados con el quitosano se enlistan en el cuadro 11.

Método de copolimerización	Polímero acoplado
<b>Radical (A partir del polímero acoplado)</b>	Metacrilatos Poliacrilamida Poli (N-isopropilacrilamida) Poliacrilonitrilo Polivinil acetato Ácido poliacrílico Poli(2-metil-2-oxazolina) Polivinilpirrolidona Poliestireno
<b>Apertura del anillo (A partir del polímero acoplado).</b>	Polipéptidos, Poli-L-lisina Policaprolactona Poli(etilen imina) Ácido poliláctico
<b>Apertura del anillo (del polímero injertado)</b>	Poli(2-oxazolina) Poli(isobutil vinil éter) Poli(etilen imina) Poliuretano Poli(dimetilsiloxano) Poloxamero Polietilenglicol Dendrímero poli(amido amina) Polisacáridos

Cuadro 11. Principales polímeros acoplados al quitosano (Novoa-Carballal, 2012) [201].

## **2.9. Propiedades Biológicas.**

El quitosano presenta diversas características fisicoquímicas, las cuales influyen en sus principales propiedades biológicas, entre ellas: biodegradación, biocompatibilidad, baja o nula toxicidad y mucoadhesión [167, 202-203], lo que posiciona al quitosano como uno de los principales biomateriales, para ser utilizado en diversos campos de estudio, principalmente en las áreas biomédica, farmacéutica, alimentaria e industrial. La mayoría de las propiedades biológicas del quitosano, están relacionadas con sus características catiónicas y por lo tanto con su grado de desacetilación; además de su peso molecular, estructura y solubilidad. De acuerdo a las diferentes estructuras que puede presentar el quitosano, también puede presentar diferentes actividades biológicas, entre ellas actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, efectos de coagulación sanguínea, actividad antidiabética, neuroprotectora, dietética, entre otras [204].

### **2.9.1. Biocompatibilidad.**

La biocompatibilidad es una de las propiedades biológicas más importantes que deben considerarse en un biomaterial que pretende ser transplantado. En el caso del quitosano, la biocompatibilidad es considerada como la capacidad del polímero para interactuar con células vivas, tejidos u órganos, sin ser tóxico, no desencadenar reacciones inmunológicas locales o sistémicas, ni rechazos en sistemas *in vivo*. Los ensayos de biocompatibilidad *in vitro*, son fundamentales para la adecuada selección preliminar de los materiales y poder determinar la citocompatibilidad, genocompatibilidad y hemocompatibilidad. Una vez que se ha demostrado la biocompatibilidad en modelos *in vitro*, es posible evaluarla utilizando modelos en animales y ensayos clínicos en humanos [205].

Diversas publicaciones relacionadas con la biocompatibilidad del quitosano han sido reportadas, sin embargo muchos de esos reportes se basan en ensayos *in vitro*, y aún no han evaluado la totalidad de las pruebas biológicas recomendadas por los diversos organismos internacionales, que regulan la

seguridad de un producto. Una de las principales recomendaciones relacionadas al uso del quitosano en humanos, ha sido la de garantizar la ausencia de reactividad alérgica en individuos sensibles a la glucosamina o a los mariscos. En este sentido se realizó un estudio con 15 pacientes con reacción sistémica a los mariscos, y se comprobó que no existe una reacción cuando fueron retados con glucosamina [206], posiblemente porque las alergias a los mariscos, son reacciones a las proteínas, y no a la quitina o quitosano.

### **2.9.2. Biocompatibilidad *in vitro***

La evaluación de biocompatibilidad *in vitro* del quitosano y sus derivados, involucran ensayos de bioseguridad y biofuncionalidad. Cuando la finalidad es la aplicación del quitosano en humanos, se recomienda en primera instancia, el desarrollo de ensayos de citocompatibilidad y hemocompatibilidad; y posteriormente los ensayos de genotoxicidad e inmunobiocompatibilidad. La evaluación de la biocompatibilidad del quitosano mediante cultivos *in vitro*, permite reproducir de manera artificial, las condiciones que garantizan la viabilidad de las células y tejidos obtenidos de un organismo vivo, al estar en contacto con la sustancia de estudio. La alta biocompatibilidad del quitosano, parece estar relacionada al grado de desacetilación de las muestras, cuando la carga positiva del polímero incrementa, las interacciones entre el quitosano y las células también aumentan, debido a la presencia de grupos amino libres [206], por lo tanto la evaluación de biocompatibilidad *in vitro*, sirve como evaluación inicial para establecer la respuesta biológica al quitosano.

Los cultivos *in vitro*, pueden clasificarse en: órganos, tejidos y cultivos celulares; y en todos ellos ha sido evaluada y comprobada la biocompatibilidad del quitosano [207-209].

La citocompatibilidad *in vitro*, involucra la evaluación de la citotoxicidad y del crecimiento celular. Las pruebas de citotoxicidad consisten en la evaluación morfológica y cuantificación de las células que han muerto, después de haber sido expuestas al quitosano. Algunos de los métodos empleados incluyen el monitoreo

de la actividad de la enzima endógena hexosaminidasa, la prueba de lactato deshidrogenasa, ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), ensayo de azul de Alamar, ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-caboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol (MTS), ensayo de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazol-5-carboxanilida (XTT), ensayo de bromodioxiuridina (BrdU), y el ensayo de timidina- $H^3$  [209-214]. Así la citotoxicidad del quitosano *in vitro*, ha sido evaluada en diversas líneas celulares normales y cancerosas, incluyendo: queratinocitos, fibroblasto de pulmón fetal humano (HFL-1), células del ligamento periodontal humano (PDLCs), fibroblastos de ratón L929, células de carcinoma cervical (HeLa), carcinoma hepatocelular (HepG2) y células de adenocarcinoma de colon humano (COLO) [214, 215-216]. De manera general, se ha observado que el quitosano en líneas celulares normales presenta baja toxicidad, y que las líneas celulares transformadas son más resistentes a los efectos citotóxicos del quitosano, comparado con las células normales. También se ha demostrado en cultivos celulares, que el quitosano de bajo peso molecular puede activar el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la vía de la arginasa, participando en la curación de heridas [214]. Sin embargo se ha observado en estudios de hematocompatibilidad, que las características policatiónicas del quitosano, favorecen su unión a diversas proteínas y a sitios de unión inespecíficos de las membranas celulares de los eritrocitos y las plaquetas, lo que puede inducir trombosis; por lo que el quitosano puede ser inadecuado para administrarlo por vía sanguínea [217].

En el caso de la evaluación de la genotoxicidad, se ha demostrado que el quitosano media múltiples actividades biológicas, incluyendo la prevención de la toxicidad genómica [218], sin embargo deben evaluarse sus efectos en la implantación o su exposición por largo tiempo.

### **2.9.3. Biocompatibilidad *in vivo*.**

La evaluación de la biocompatibilidad *in vivo* del quitosano, puede realizarse mediante análisis histológicos, con los cuales se intenta determinar el tipo y número de células, que rodean el área que cubre el sitio de administración del

quitosano; incluyendo aquellas células pertenecientes al sistema inmune, sin embargo la limitante de estos métodos es que, debido a la realización del corte histológico, únicamente se puede realizar la evaluación en ese momento del estudio. Por otro lado, también se han utilizado métodos basados en imágenes por fluorescencia en modelos tumorales, modelos de artritis, inflamación pulmonar y rechazo de transplantes [219-221].

Se ha observado que la respuesta biológica al quitosano puede variar dependiendo del sitio de la administración y de las modificaciones químicas o estructurales del polímero. De manera general se ha observado, que cuando el quitosano es administrado se presenta una respuesta inicial por monocitos y neutrófilos, y posteriormente se observa propagación de fibroblastos y células endoteliales vasculares [222]. Cuando el quitosano se encuentra acoplado con etilendiamina y es administrado en el cuádriceps de conejos, se presenta irritación local e inflamación, y después de 24 horas se puede observar la filtración de neutrófilos y linfocitos, sin que se observe necrosis lo cual refleja una respuesta normal del hospedero después de la inyección de una sustancia extrínseca; mientras que al día 7 no se observan células inflamatorias en el tejido muscular inyectado; por lo que la combinación del polímero y la vía de administración son consideradas biocompatibles [223]. Adicionalmente, se ha demostrado que la esterilización del quitosano favorece su biocompatibilidad *in vivo*. Los métodos empleados en la esterilización del quitosano incluyen: exposición a calor seco, vapor saturado a varias temperaturas, óxido de etileno e irradiación gamma. La esterilización del quitosano además de favorecer su biocompatibilidad *in vivo*, permite su alta estabilidad y almacenamiento a largo plazo para su utilización [205, 225].

#### **2.9.4. Biodegradación.**

El empleo del quitosano como vehículo para la liberación controlada de drogas, requiere que el biopolímero no únicamente sea biocompatible, sino

además biodegradable. La biodegradación del quitosano se refiere a la ruptura del polímero en fracciones más pequeñas, con la obtención de monómeros de D-glucosamina y N-acetil-glucosamina. Los métodos empleados para la biodegradación del quitosano tanto *in vivo* como *in vitro* incluyen: radiación, métodos químicos ( hidrólisis ácida o degradación por óxido-reducción), o métodos enzimáticos; el cual es uno de los más utilizados, debido a que la biodegradación puede ser controlada por medio del pH, la temperatura y el tiempo de reacción [205, 225]. No obstante la tasa de degradación del quitosano depende de su estructura química, su peso molecular y el medio que rodea el sitio de la aplicación. Por otro lado, la velocidad de degradación del quitosano, se puede manipular de acuerdo a su aplicación final. Si el empleo del biopolímero es para acarrear drogas podría ser degradado de manera relativamente rápida, pero de manera controlada favoreciendo su liberación continúa, pues la cinética de degradación puede afectar el crecimiento celular, la regeneración del tejido y la respuesta del hospedero [205].

La degradación enzimática del quitosano es un fenómeno complicado, se refiere a la degradación catalizada por enzimas. El quitosano es susceptible a su degradación por una gran variedad de enzimas de diversas fuentes incluyendo enzimas no específicas (Cuadro 12), y enzimas específicas como las quitosanasas. Éstas últimas catalizan la endohidrólisis de los enlaces entre los residuos glucosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) y los residuos de D-Glucosamina del quitosano parcialmente acetilado (Figura 10).

Enzima	Origen / Presencia	Función	Referencia
$\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (Quitinobiasa)	<i>Serratia marcescens</i> .	Degradación de [(GlcNAc) <sub>2</sub> ] en monómeros de GlcNAc.	[226]
Exo- $\beta$ -D-glucosaminidasa (GlcNasas)	<i>Amycolaptosis orientalis</i> .	Corte de grupos $\beta$ -D-glucosaminidina formando monómeros GlcN.	[227]
Lisozima	Diversos organismos. Lágrimas, saliva, sangre, leche, mucosas, macrófagos.	Hidrólisis de los enlaces glucosídicos $\beta$ -(1→4), generando residuos N-acetil-D-glucosamina.	[228]
Pronasa	<i>Streptomyces griseus</i>	Proteasa no específica. Funcionamiento no claro en quitosano.	[229]
Papaína	<i>Carica papaya</i>	Hidrólisis de proteínas con amplia especificidad para enlaces peptídicos, preferencia con aminoácidos con cadena lateral hidrófoba en posición P2. Función no clara en quitosano.	[230]
Pectinasa	<i>Aspergillus niger</i>	Corta la pectina y diversos polisacáridos. Función no clara en quitosano.	[231]
Celulasas	Hongos, bacterias y protozoarios	Hidrólisis de celulosa. Función no clara en quitosano.	[232]
Quitina desacetilasa	<i>M. rouxii</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>Sacharomyces cerevisiae</i> y recientemente de insectos y bacterias marinas.	Hidrólisis de los enlaces N-acetamido.	[233-235]

Cuadro 12. Principales enzimas inespecíficas que favorecen la biodegradación del quitosano.

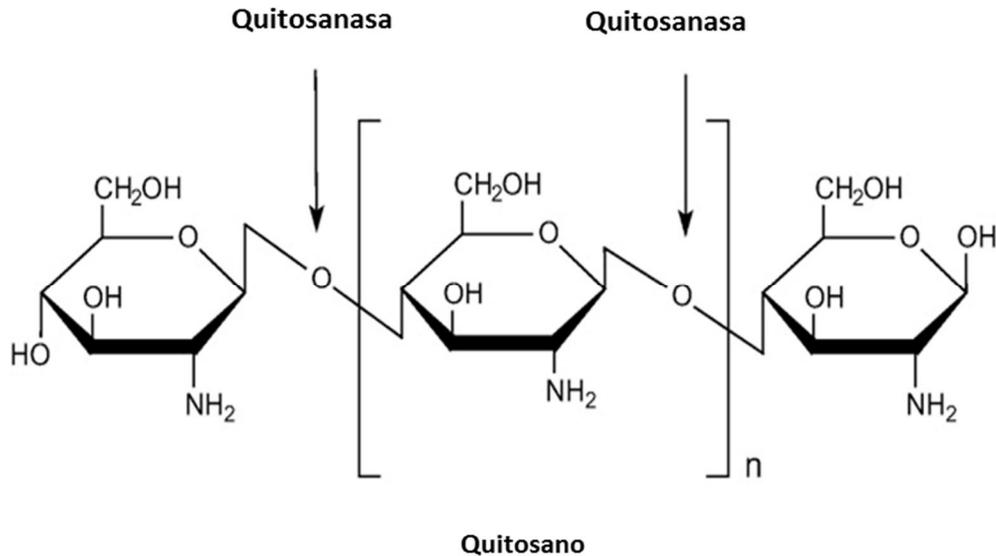


Figura 10. Especificidad de la quitosanasa. Las unidades D-glucosamina  $\beta$ -(1-4) del quitosano, son hidrolizadas específicamente por quitosanasas.

Las quitosanasas (E.C. 3.2.1.132), pertenecen a las glucósido hidrolasas y se encuentran en las familias: 5, 7, 8, 46, 75 y 80. Son producidas por una gran variedad de organismos incluyendo bacterias gram positivas y negativas, hongos y virus (Cuadro 13). Las quitosanasas están clasificadas en 3 subclases (I-III), de acuerdo al sustrato específico del quitosano [235-236]. La subclase I, divide los enlaces GlcNAc-GlcN (*Bacillus pumilus* BN262, *Penicillium islandicum* y *Streptomyces sp.*). Las quitosanasas subclase II (*Bacillus sp.* cepa N174), limitan su especificidad de escisión exclusivamente a los enlaces GlcN-GlcN; mientras que las quitosanasas subclase III pueden dividir ambos enlaces, GlcN-GlcN y GlcNAc-GlcN (*Streptomyces griseus*, *Bacillus circulans*, *Nocardia orientalis*) [236]. La función metabólica de las quitosanasas, es hidrolizar el quitosano en pequeños quito-oligosacáridos, que pueden ser introducidos a la célula como fuente de carbono y nitrógeno; y de esta manera proteger a los microbios contra la actividad anti-microbiana provocada por el quitosano [237-238].

Familia de quitosanasa	Origen	Función	Referencia
5	<b>Bacterias Gram positivas</b> "Streptomyces spp." "Streptomyces griseus"	Actividad enzimática de quitosanasa, celulasa, liqueninasa, mananasa y xilanasa. Mecanismo de retención.	[239-240]
7	<b>Bacterias termófilas anaerobias</b> "Clostridium thermocellum." "Clostridium cellulolyticum"	Actividad de quitosanasa y celulasa. Mecanismo de retención.	[241]
8	<b>Bacterias Gram positivas</b> "Bacillus sp. K17" "Paenibacillus sp. No.7M" "Bacillus circulans WL-12"	Actividad de quitosanasa verdadera. Mecanismo de inversión.	[242-245]
46	<b>Bacterias Gram positivas</b> "Amycolatopsis spp." "Bacillus circulans MH-K1." "Nocardioides spp." "Streptomyces sp N174." <b>Bacterias Gram negativas</b>  "Burkholderia spp." <b>Virus</b> "Chlorella virus"	Actividad exclusiva de quitosanasa. Mecanismo de inversión.	[246-249]
75	<b>Fungi</b> "Aspergillus spp." "Fusarium spp."	Actividad exclusiva de quitosanasa. Mecanismo de inversión.	[249-251]
80	<b>Bacterias Gram negativas</b> "Matsuebacter spp." "Sphingobacterium spp."	Actividad exclusiva de quitosanasa. Mecanismo de inversión.	[252-254]

Cuadro13. Diversas quitosanasas identificadas en diferentes microorganismos.

La degradación química se refiere al proceso de degradación que es catalizado por sustancias químicas y soluciones a pH ácido. Cuando el quitosano es degradado, los oligómeros obtenidos pueden ser absorbidos; mientras que el quitosano que no es degradado es excretado sin ser absorbido; los oligómeros

obtenidos son excretados por la orina, por lo tanto no presenta una acumulación nociva en el cuerpo [205, 255].

El peso molecular del quitosano influye en la velocidad, eficiencia de su degradación, y destino final. Cuando el biopolímero presenta un peso molecular de 200 000 Da, es degradado a más de un 90% después de 35 días, mientras que el quitosano con un peso molecular de 450 000 Da, es degradado alrededor de un 62% en el mismo tiempo [256], por lo que se ha determinado que el quitosano de bajo y mediano peso molecular pueden ser degradados más rápidamente por métodos químicos o enzimáticos. Por otro lado, el grado de desacetilación (GD), del quitosano también es un factor clave en su degradación. Cuando el biopolímero presenta alto GD (71.7-93.5%) su degradación es lenta, mientras que con bajo GD (52.6-62.4%) presenta una degradación significativa [257-258]. Además la estructura del quitosano, es otro factor importante para su biodegradación cuando ésta se realiza por métodos enzimáticos. El quitosano contiene grupos funcionales hidroxilo y amida; los cuales son sitios que pueden ser reconocidos por las enzimas, por lo que cuando el biopolímero es modificado químicamente, puede modificar la tasa y ruta de su degradación; en algunos casos la modificación acelera su degradación, mientras que en otros es disminuida [258-260].

La evaluación de la biodegradación *in vivo*, ha sido realizada por vía intraperitoneal, inyección subcutánea y administración oral [205, 261-262]. La biodegradación por vía intraperitoneal, se ha postulado que es mediada por lisozima y que se obtienen azúcares simples [262]. Cuando el quitosano es administrado por vía oral, parte de la biodegradación ocurre en el tracto gastrointestinal, y la digestión ocurre principalmente en el intestino [263]. Por otro lado, cuando el quitosano se encuentra presente en sangre, induce a células específicas u órganos a la liberación de lisozima como una función de defensa, seguida de la activación de los macrófagos [264]. Finalmente, aunque se ha evaluado la biodegradación del quitosano en diversos modelos, es necesario desarrollar otros modelos de estudio que permitan evaluar la biodegradación del

quitosano bajo una condición específica (modelos tumorales, trasplante de órganos, etc.), que permitan obtener la información adecuada para su futura extrapolación a ensayos clínicos en humanos.

## **2.10. Generación de micropartículas de quitosano para aplicación biomédica.**

El quitosano ha sido considerado un buen biomaterial para aplicaciones biomédicas, principalmente por sus propiedades de biocompatibilidad, baja o nula toxicidad y biodegradación, por lo que se ha formulado en diversas presentaciones incluyendo: hidrogeles, películas, fibras, esponjas y microesferas. Cuando el quitosano se utiliza para encapsular o recubrir un material sólido, se obtienen micropartículas que generalmente presentan una forma irregular, debido a que el material de cubierta se deposita en la superficie de las partículas que se encapsularan y adopta su forma original. Si la sustancia que se encapsulará es un líquido, una solución, una emulsión o una dispersión, se pueden obtener estructuras capsulares (microcápsulas) o matriciales (microesferas). La microencapsulación de medicamentos inició en la década de los 50, con la finalidad de conseguir una liberación sostenida o prolongada de los fármacos, y actualmente; se han desarrollado micropartículas de diversos materiales. En este sentido, las microesferas de quitosano se han empleado para la liberación de drogas como: antibióticos, antihipertensivos, anticancerígenos, péptidos, vacunas, además de proteínas y ácidos nucleicos. Las microesferas de quitosano son sistemas homogéneos en los que las moléculas asociadas al polímero están dispersas en una matriz polimérica, y constituyen uno de los sistemas de liberación controlada de fármacos más estudiados, tanto para su administración parenteral como por vía oral. Las micropartículas de quitosano asociadas a una molécula terapéutica, además de controlar la liberación de principios activos, mejoran la biodisponibilidad de sustancias degradables como las proteínas y promueven la absorción de fármacos hidrosolubles a través de las membranas epiteliales. Para la obtención de un tipo de estructura u otro (microesferas o micropartículas) depende de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y

del material de recubrimiento, así como del proceso tecnológico elegido, algunos de los principales métodos son: gelificación inotrópica, precipitación, atomización o spray-drying, coacervación, entrecruzamiento térmico, entrecruzamiento químico, evaporación del disolvente, acilación interfacial, recubrimiento sobre micropartículas preformadas, entrecruzamiento con químicos e interacción con aniones (Figura 11) [175, 186-190].



Figura 11. Principales métodos para la preparación de esferas de quitosano. (Adaptado de Sinha, 2004), [184].

### 2.10.1. Generación de micropartículas de quitosano por el método de coacervación.

Actualmente se han desarrollado diversos métodos para la obtención de microesferas, micropartículas y nanopartículas de quitosano acopladas a moléculas con interés biomédico. Sin embargo, el método de coacervación es uno de los métodos más eficientes para la obtención de micropartículas de quitosano acoplados a ADN [265]. La coacervación o separación de fases, se basa en el fenómeno de agregación macromolecular o separación de fases líquidas que se presentan en el seno de un sistema coloidal. La microencapsulación por

coacervación, involucra una serie de técnicas basadas en la inducción de la desolvatación del polímero que, posteriormente, se deposita en forma de complejos del coacervado alrededor de la molécula encapsulada. Durante el proceso se obtienen dos fases líquidas inmiscibles, una rica (coacervado) y otra pobre en coloides (sobrenadante). Por lo que la coacervación es considerada una etapa intermedia entre disolución y precipitado, (una desolvatación parcial en contraposición a la desolvatación exhaustiva asociada al proceso de precipitación), una vez alcanzada esta etapa, diversos factores como: cambio en la temperatura, modificación del pH, la adición de un “no solvente”, una sal o un polímero incompatible, puede inducir a la desolvatación del polímero generando el fenómeno de coacervación [265-266].

El proceso de microencapsulación por coacervación consta de las siguientes etapas [265-268]:

- I. Dispersión. Durante este proceso es necesaria la agitación de manera adecuada y controlada del compuesto que se va a ser encapsulado, ya sean sustancias en un medio líquido o partículas sólidas, con la solución que contiene el polímero encargado de formar la cubierta.
- II. Inducción de la coacervación. Basada en la separación de fases líquidas por alguno de los procedimientos señalados, durante la cual el sistema coacervado presenta una opalescencia con apariencia semejante al de una emulsión.
- III. Deposición. Consiste en la adsorción del coacervado alrededor de los núcleos que va a encapsular. En esta etapa el sobrenadante, que inicialmente se observa opalescente, se clarifica a medida que transcurre el proceso de coacervación. La deposición continua de la cubierta es promovida por una reducción de la energía libre interfacial del sistema, ocasionado por una disminución del área superficial

durante la coalescencia de las moléculas del polímero en solución líquida.

- IV. Coalescencia. En esta etapa los coacervados forman una cubierta continua alrededor de los núcleos de la molécula a encapsular.
- V. Endurecimiento de la cubierta de coacervado. Esta etapa puede ser opcional y puede realizarse mediante el enfriamiento, o añadiendo un agente reticulante. Finalmente, las micropartículas generadas son aisladas por centrifugación o filtración.

#### **2.10.2. Factores que afectan la eficiencia de encapsulamiento del quitosano.**

Existen diversos factores que pueden afectar la eficiencia de encapsulamiento de las microesferas de quitosano, algunos de los principales son: la naturaleza de la molécula a ser encapsulada, la concentración del quitosano, la proporción del polímero con respecto a la molécula encapsulada, la velocidad de agitación, el grado de desacetilación del quitosano y su peso molecular. Uno de los factores más importantes es la concentración de quitosano, cuando ésta es elevada, la eficiencia de encapsulamiento es mayor, en comparación a la que se obtiene cuando se utilizan concentraciones bajas del polímero [269-270]. Por otro lado, se ha demostrado que cuando se combinan quitosano de bajo y alto peso molecular, se obtiene una buena encapsulación de drogas, independientemente de la proporción polímero/droga [271]. También se ha determinado que la concentración del ácido acético en la solución polimérica influye en la eficiencia de encapsulación del quitosano [272].

#### **2.10.3. Factores que afectan la liberación de moléculas terapéuticas a partir de micropartículas de quitosano.**

Existen diversos parámetros que determinan la liberación de moléculas terapéuticas a partir de micropartículas de quitosano, algunos de los principales

son: la concentración y peso molecular del quitosano, el tipo y concentración de moléculas intercaladas al polímero, la velocidad de agitación durante la preparación de las micropartículas, los aditivos utilizados durante el procesamiento y la proporción polímero/droga. En el caso del peso molecular del quitosano, se ha demostrado en diversos modelos, que la liberación de la droga disminuye con el incremento en el peso molecular del polímero, de igual manera, cuando el polímero se intercala con otras moléculas también afecta la liberación de las moléculas terapéuticas [273-275]. Por otro lado, el tamaño de las microesferas es uno de los factores que más afectan e influyen en la internalización de las mismas, en mucosas y tejidos epiteliales, además de su internalización a la célula; debido a que la carga superficial de las microesferas, determina sus propiedades mucoadhesivas, y su habilidad para escapar a la acción de los endolisosomas para liberar el principio activo. Ambas características pueden ser controladas variando condiciones y variables del proceso de obtención, como la concentración de quitosano, la proporción entre el quitosano con el principio activo, y el pH de la solución [268].

#### **2.10.4. Estabilidad de las microesferas de quitosano.**

Diversos estudios han reportado que, las microesferas de quitosano obtenidas por precipitación en un medio ácido o por sulfato de sodio, presentan una pobre estabilidad, pero cuando las microesferas son entrecruzadas con moléculas como glutaraldeído, su estabilidad puede ser incrementada [268, 276]. La adición de sulfato de sodio a una solución de quitosano en ácido acético, conduce a la neutralización iónica de los grupos amino cargados positivamente del quitosano, generando compuestos poco solubles. Cuando se adiciona el ácido, se genera un aumento en la generación de protones, desplazando el equilibrio hacia la solubilización del quitosano, provocando que las microesferas se disuelvan [273, 277].

### **2.11. Quitosano como vehículo para la liberación de genes terapéuticos.**

El uso del quitosano como vehículo para la liberación de genes, fue descrito por primera vez por Mumper en 1995. Los complejos quitosano-ADN obtenidos, presentaron un tamaño de partícula entre 150-600 nm dependientes del peso molecular del quitosano utilizado [278]; desde entonces se han desarrollado diversos modelos de estudio *in vitro* e *in vivo*, explorando la capacidad del quitosano para transferir genes, como una alternativa segura y eficiente comparado con los vectores no virales [37, 279-280].

De acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del quitosano, es posible su interacción con diversas biomoléculas y drogas. Para lograr dicha interacción, las moléculas deben presentar diversas propiedades fisicoquímicas que favorezcan su asociación. El ADN es una de las biomoléculas capaz de interactuar con el quitosano, lo anterior se debe principalmente a sus propiedades polielectrolíticas y estructurales. Las características estructurales del ADN, son consideradas el punto de partida para la generación de sistemas de liberación. Las principales propiedades consideradas son: el diámetro de la doble cadena, el sentido de la hélice, el tamaño y la forma de los surcos mayor y menor (Figura 12).

El conocimiento del ordenamiento estérico de los grupos fosfato, permite la elección del agente catiónico adecuado para la generación de complejos. Los agentes di y policatiónicos, pueden unirse a los fosfatos adyacentes de la hélice, dependiendo de las distancias entre los motivos cargados positivamente [280-282].

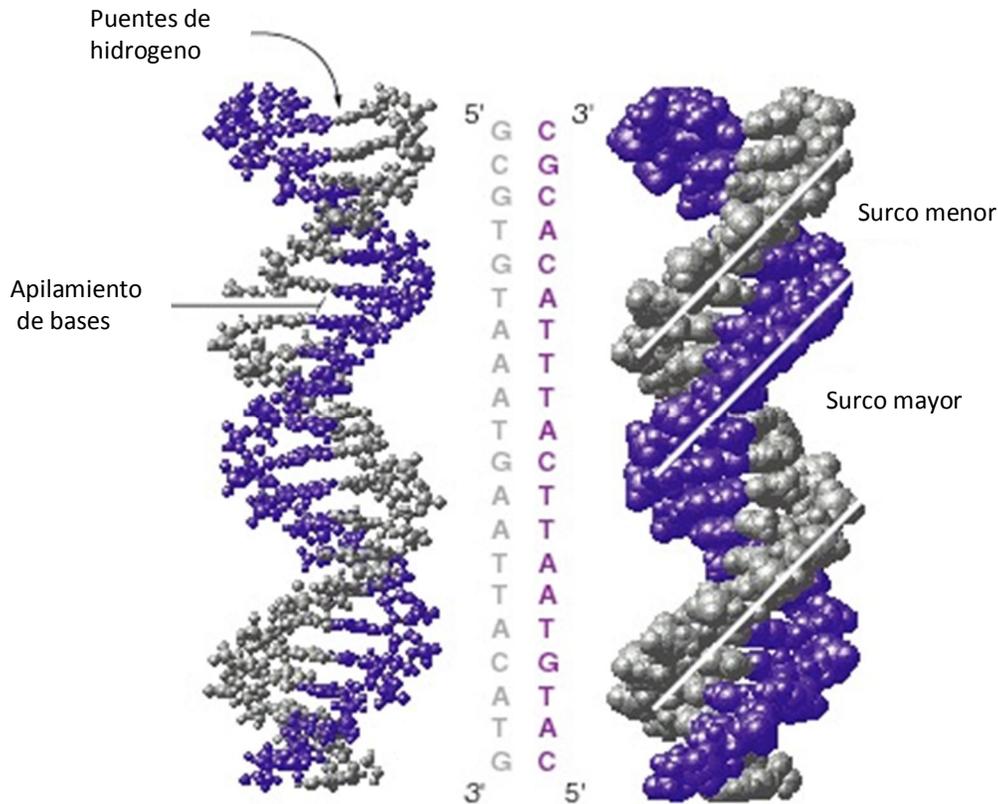


Figura 12. Estructura del DNA-B. Se muestran las principales características estructurales para la interacción con policationes.

Las propiedades fisicoquímicas del ADN también son esenciales para su asociación con policationes, debido a que el ADN es un polianión cargado negativamente debido a cada uno de sus grupos fosfato; lo que le permite generar una fuerte repulsión entre el esqueleto de azúcares y fosfato. Éstas cargas altamente negativas provocan que el ADN interaccione fuertemente con cationes que se encuentran en su medio. El ambiente polielectrolítico del ADN es fundamental para su unión, condensación y empaquetamiento con ligandos cargados positivamente; en este sentido el quitosano es capaz de generar interacciones electrostáticas con el ADN, provocando su condensación y favoreciendo la obtención de complejos que pueden ser empleados como sistemas no virales para la liberación génica [282-283].

La mezcla de ADN con iones multivalentes cargados positivamente conducen a la formación de complejos, y si el ADN es neutralizado

suficientemente se genera un colapso espontáneo que produce estructuras compactadas por condensación. La condensación del ADN en solución por cationes multivalentes, conduce a la formación de estructuras toroidales o tipo barras [283-284]. Para la generación de partículas con morfología toroidal es necesaria una longitud de 400 pares de bases del ADN como mínimo [285]. Se han sugerido dos modelos para la formación de estructuras toroidales, Hud y colaboradores proponen un modelo cinético basado en la probabilidad del ADN para formar bucles [286]; mientras que Marx y su grupo de trabajo proponen el modelo de carrete, en el que se sugiere que el ADN se envuelve en una circunferencia de manera unidireccional; lo cual ha sido observado mediante microscopía electrónica [287]. Cuando el ADN queda empaquetado dentro de los condensados toroidales, se puede observar un ordenamiento hexagonal de las hebras del ADN con un espacio interhelical de 2.5-3.8 nm, dependiendo del policationamiento [288-289].

El proceso por el cual el quitosano puede interactuar con el ADN se debe a la interacción electrostática entre las aminas protonadas del polímero, con los grupos fosfato del ADN que contienen cargas negativas, dicha interacción permite que el ADN se condense dentro de las partículas de quitosano formando micropartículas con estructura toroidal (Figura 13). Además, el valor  $pK_a$  del quitosano (alrededor de 6.2 – 7.0), le proporciona un ambiente policationómico en solución, por lo que es insoluble a valores de pH neutro y alcalino, pero puede ser soluble utilizando soluciones ácidas, lo cual es uno de los factores fundamentales para la obtención de las micropartículas que pueden ser utilizadas para transferir genes con potencial terapéutico [35, 290-292].

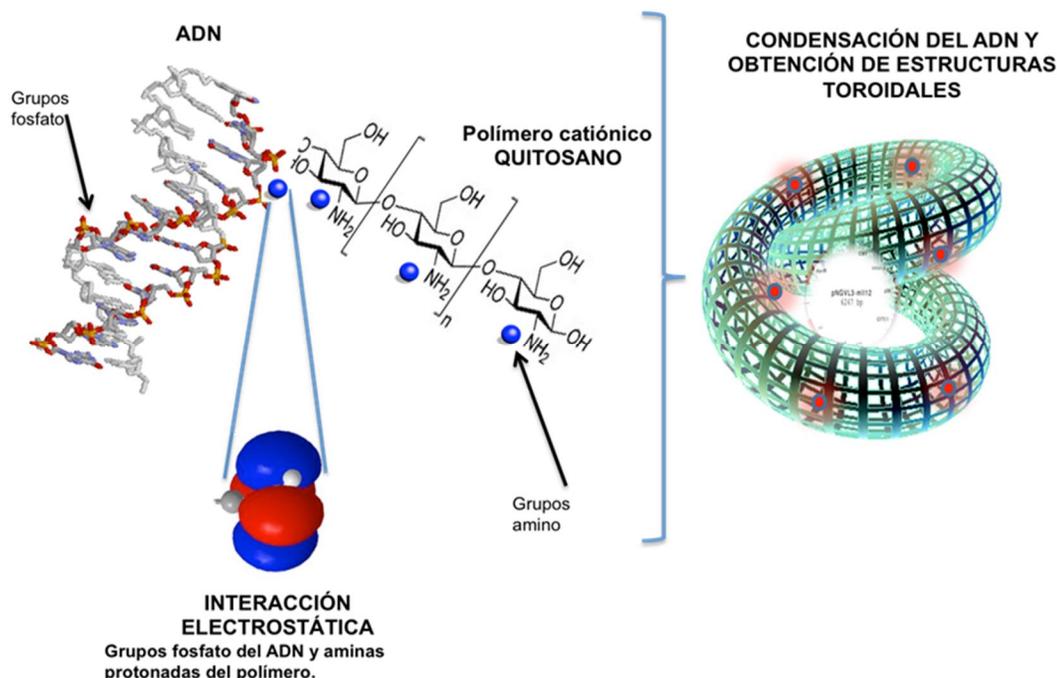


Figura 13. Generación de complejos DNA-policación y obtención de estructuras toroidales.

Los complejos quitosano/ADN representan un sistema seguro y eficiente para la liberación de genes. Diversos métodos como: fluorescencia con bromuro de etidio, retardación en gel, microscopía de fuerza atómica, y dispersión dinámica de luz, han demostrado la afinidad de unión al ADN, la morfología, la fuerza de interacción, y la estructura y estabilidad de los complejos quitosano/ADN [41, 293-294]. Además, se ha demostrado que el quitosano protege al ADN de su degradación por las DNAsa I y II [41, 43, 294-296]. También los complejos quitosano/ADN median una alta eficiencia de transfección comparado con otros complejos catiónicos y, su grado de toxicidad es muy bajo [42, 296-299]. Adicionalmente se ha demostrado, que el peso molecular del polímero, el grado de desacetilación, la proporción amino-fosfato (N/P), el pH del medio de transfección y las modificaciones químicas del polímero, pueden ser manipulados para optimizar su eficiencia de transfección [45, 300-307].

Por otro lado, aunque la eficiencia de los complejos quitosano/ADN para la transfección de genes, se ha demostrado en diversos modelos *in vivo* e *in vitro*; el

mecanismo de transfección no ha sido determinado, aunque se ha propuesto que las rutas predominantes de entrada a la célula por parte de los poliplejos es la endocitosis de absorción, seguida de un mecanismo de envoltura de clatrina, o por endocitosis de fase líquida [134, 301, 308-309], sin embargo también se han determinado que durante el proceso de transfección, se presentan diversas barreras celulares que influyen en que los poliplejos alcancen el sitio de acción específico y desplieguen el efecto terapéutico deseado (Figura 14). Se ha especulado que dos de los principales pasos en el proceso de la transferencia exitosa de genes, es la captación celular de los complejos y el escape de la vía endolisosomal [301].

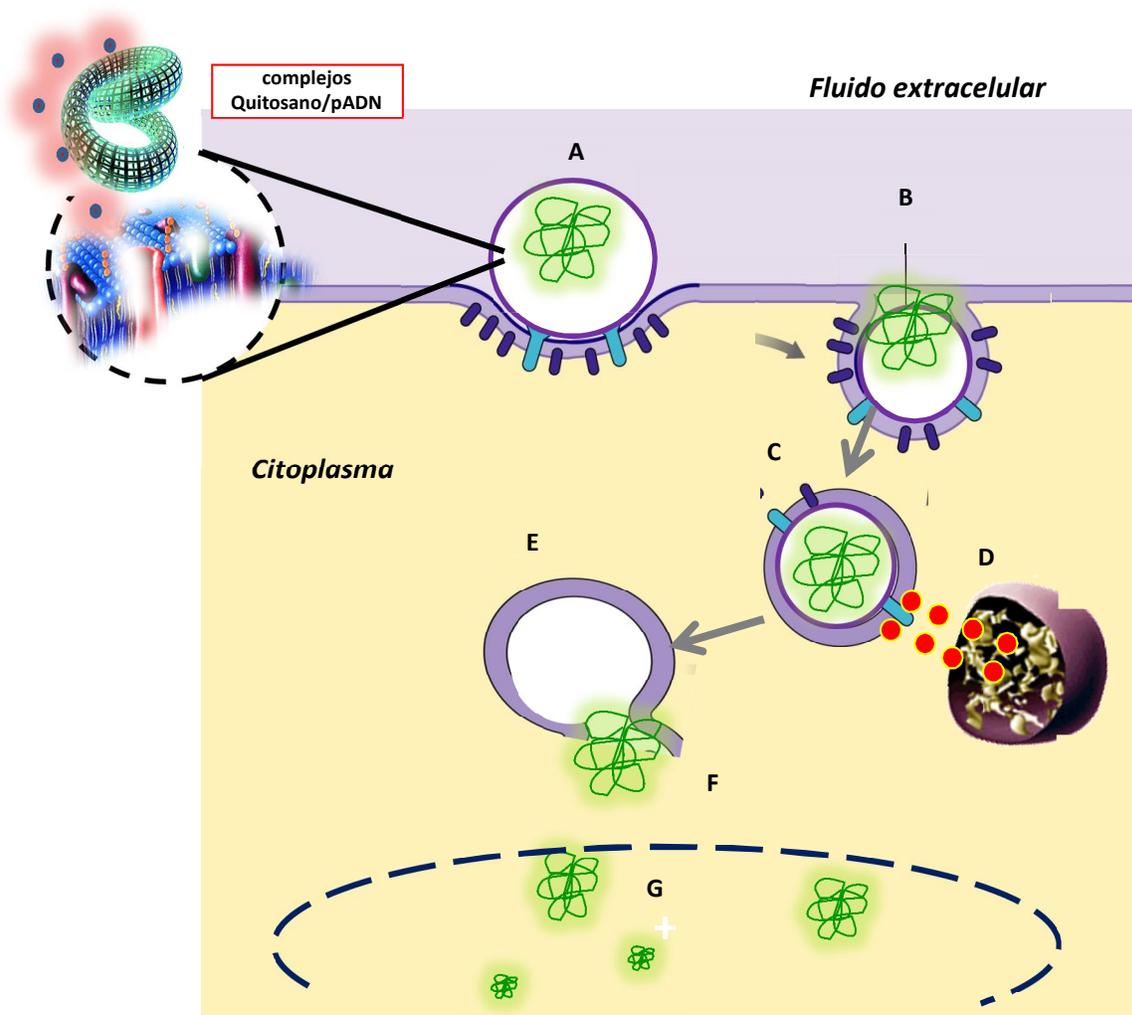


Figura 14. Vías de liberación del ADN y las 3 principales barreras: bajo ingreso a través de la membrana plasmática, inadecuada liberación de moléculas de ADN con limitada estabilidad y falta

de orientación nuclear. (A) Formación del complejo ADN–polímero. (B) Captación. (C) Endocitosis (endosoma). (D) Escape del endosoma. (E) Degradación (endosoma). (F) Liberación Intracelular. (G) Degradación (citosol). (H) Entrada al núcleo y expresión. Modificado de Luo y Saltzman 2000 [301].

## **2.12. Captación celular de los complejos.**

El ingreso a la célula por parte de los complejos policatiónicos es el proceso fundamental para su utilización como vehículo transportador de genes. Los mecanismos propuestos de ingreso a la célula (endocitosis de absorción, seguida de una cubierta de clatrina), son favorecidos por la presencia de glicoproteínas, proteoglicanos y glicerofosfatos presentes en las membranas celulares y que le confieren una carga negativa a la superficie celular, permitiendo la interacción con los polímeros que presentan carga positiva [309-311]. Una vez que se ha realizado la fusión entre los complejos poliméricos y la membrana citoplasmática, se genera un endosoma que facilita la internalización del complejo a la célula; sin embargo el mecanismo por el cual esto ocurre no ha sido completamente determinado [320]. La fusión del complejo polimérico con la membrana celular puede ser aumentado mediante procesos como: cationización de los complejos, incorporación de dominio de transducción de proteínas virales (PTD) o acoplamiento a los complejos de motivos, o anticuerpos que permitan su localización específica (p.e. fibronectina, transferrina, sacáridos, anti-tirosina quinasa, anti-moléculas de adhesión plaqueto-endoteliales (PECAM), entre otros) [312], sin embargo a pesar de mejorar la internalización de los complejos, no necesariamente es traducido a un aumento en la expresión del transgen.

### **2.12.1. Escape endosomal.**

Una vez que los complejos se han introducido a la célula, el siguiente paso es su escape de las vesículas endocitóticas en el citoplasma. Se han propuestos dos mecanismos para el escape del endosoma: I) Esponja de protones y II) desestabilización de la membrana.

- I) Efecto de esponja de protones. Este mecanismo se basa en la capacidad de amortiguamiento endosomal de los complejos quitosano/ADN, inicialmente propuesto por Boussif et al, para el sistema PEI/DNA [144]. De acuerdo a dicha hipótesis, la capacidad de amortiguamiento del acarreador conduce a un incremento en la afluencia de protones y de iones de cloro durante la acidificación endolisosomal. Lo cual conduce a un incremento en la presión osmótica al interior de la vesícula y favorece la difusión pasiva de agua, provocando el hinchamiento y posteriormente la ruptura de la vesícula. Además la repulsión de las cargas positivas del polímero puede contribuir a la desestabilización de la vesícula [147].
  
- II) Desestabilización de la membrana. Este mecanismo es poco comprendido y se basa en la capacidad del polímero para perforar la membrana endosomal, debido a las interacciones electrostáticas entre los polímeros catiónicos y los fosfolípidos aniónicos de los compartimentos intracelulares, generando una deformación estructural de las vesículas, lo cual provoca su ruptura y la consiguiente liberación del contenido endosomal al citoplasma [313-316].

### **2.13. Disociación del ADN de los complejos y expresión génica.**

Diversos estudios se han realizado, enfocados en determinar el mecanismo de escape del ADN de los complejos poliméricos; y se ha determinado que la disociación es atribuida a las moléculas aniónicas presentes en el citoplasma celular capaces de reemplazar el ADN aniónico, además de componentes de la membrana endosomal o pre-lisosomal [157, 315-316]; también se ha sugerido que en algunos casos la disociación del ADN ocurre en el núcleo [311].

Existen 2 vías de entrada del ADN al núcleo. I) Durante la mitosis se genera un desensamble de la membrana nuclear, favoreciendo el ingreso de moléculas de gran tamaño [317-319] y II) durante la interfase, el ingreso al

núcleo se realiza a través de los complejos del poro nuclear (CPN), mediante difusión pasiva. En ésta vía, el tamaño y las propiedades estéricas del ADN plasmídico dificultan su ingreso por esta vía [320-323]. Adicionalmente, se han desarrollado diversas estrategias para aumentar el ingreso nuclear y la expresión del transgen, lo cual ha resultado muy exitoso al transfectar *células in vitro*; pero dichos resultados no correlacionan con los obtenidos en diversos modelos *in vivo* [324-325]; por las diferencias en la biología, funcionalidad y complejidad de ambos modelos de estudio, por lo cual es necesario evaluar la eficacia de los complejos quitosano/ADN de manera específica para cada modelo de estudio.

#### **2.14. Complejos Quitosano/ADN en terapia génica contra cáncer.**

La terapia contra cáncer es una de las áreas de la medicina con un gran interés. Se han propuesto diversas estrategias con un énfasis especial en el aumento de su eficacia y la disminución de los efectos colaterales. En este sentido, el quitosano ha emergido como uno de los principales vehículos para su aplicación como oligómero acoplado a drogas o formando complejos con ácidos nucleicos. Las principales estrategias del empleo de ácidos nucleicos como estrategia terapéutica contra cáncer son: DNA plasmídico (pDNA), ARN de interferencia y oligonucleótidos antisentido. Cuando el ácido nucleico empleado es ARN, se ha observado una baja estabilidad comparado con el pADN, el cual ha sido probado en diferentes líneas celulares como: COS-1, MG63, HEK293, A549, células de melanoma, células HeLa, y células Caco-2, a pesar de la dificultad de entrar al núcleo celular debido a su tamaño [44, 326-328].

Actualmente se están desarrollando alrededor de 1728 estudios en fase clínica de terapia génica contra distintos tipos de cáncer, de los cuales 22 corresponden a cáncer cervicouterino; pero ninguno ha reportado el uso de quitosano acoplado a ADN en estudios clínicos contra CaCu, ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) el 30 de noviembre de 2012). Sin embargo diversos estudios de terapia génica basadas en el uso de quitosano en fase pre-clínica se han realizado en otros modelos de estudio.

Los resultados obtenidos en la utilización de quitosano como vehículo para la transferencia de genes contra cáncer son variables, pues influyen diversos factores como: el grado de desacetilación, pues éste afecta su tasa de degradación, estabilidad, tamaño de partícula y eficiencia en el transporte de genes [329]. Algunos de los estudios en fase pre-clínica se enlistan en el cuadro 14.

<b>Formulación del polímero</b>	<b>Plásmido/proteína expresada</b>	<b>Modelo de estudio</b>	<b>Resultados principales</b>	<b>Referencia</b>
<b>Quitosano (P.M. 200, 400 kDa GD 87%)</b>	pCXWN-hIL-2 / Interleucina-2	MAT-LyLu	Alto nivel de expresión de IL-2 mediante microesferas de quitosano. Se observa mayor expresión de IL-2 con quitosano de 200 kDa que con el de 400 kDa.	320
<b>Quitosano (P.M. 150 kDa, GD 75-85%)</b>	pCXWN-hIL-2 / Interleucina-2	3T3 HeLa	La eficiencia de transfección de los complejos es más baja comparada con PEI y DOTAP.	321
<b>Quitosano (P.M. 390 kDa)</b>	pcDNA3-VP1 / Principal proteína estructural de Coxsackievirus B3	Ratones BALB/c	Inmunización intranasal proporciona un 42.9% de protección contra la infección con Coxsackievirus B3.	322
<b>Quitosano (DDA 85%)</b>	pcDNA3.1-IL-1Ra / IL-1Ra humana	Conejo osteoartritis	Severidad de lesiones de cartílago en los conejos tratados se redujo significativamente.	323
<b>Quitosano con andamios de gelatina</b>	pCMV-TGF- $\beta$ 1 / Factor de crecimiento transformante	Condrocitos primarios	Los condrocitos transfectados expresan la proteína en 3 semanas.	324

<b>Quitosano (baja viscosidad)</b>	PEDF / PEDF (Factor angiogénico)	Ratones BALB/c	La transfección del complejo produce una disminución en el crecimiento de tumores primarios, reduce la lisis del hueso y reduce la metástasis en ratones.	325
<b>Quitosano</b>	IL-12	Ratones hembra C57BL/6 (Cáncer de vejiga)	Respuesta antitumoral sostenida y respuesta completa a tumor intravesical.	326

Cuadro 14. Micropartículas de quitosano utilizados en terapia génica contra cáncer.

Adicionalmente en estudios de inmunoterapia *in vivo* utilizando quitosano/IL-12 en un modelo de tumor sólido, se demostró que la administración de IL-12 con 1.5% de quitosano, aumentan la retención de citocinas en el microambiente tumoral durante 5 a 6 días, y que la IL-12 se mantiene al menos 3 veces más que cuando es administrada sola. También la IL-12 circulante puede completar la IL-12 local y expandir las poblaciones de células T CD8+ y poblaciones de células NK, generando un efecto antitumoral. Sin embargo la administración de IL-12 recombinante necesita ser administrada de manera controlada por sus efectos citotóxicos [287-289]; por lo que el quitosano es un buen vehículo para su administración, y en este sentido actualmente se están desarrollando diversos estudios basados en la generación complejos quitosano acoplado al gen de IL-12, como estrategia terapéutica contra distintos tipos de cáncer [327-333].

### **2.15. Complejos quitosano/DNA IL-12 como tratamiento para cáncer cervicouterino.**

Recientemente, se ha propuesto el uso de complejos de quitosano/DNA conteniendo genes de citocinas como estrategia terapéutica contra el cáncer. El uso de citocinas se basa en sus propiedades inmunomoduladoras y su actividad

antitumoral. La IL-12 es una citocina proinflamatoria que participa en: 1) la diferenciación de las células TH1, 2) la proliferación de las células T activadas y las células asesinas naturales (NK) y 3) aumentando la inmunidad mediada por células. Dentro de los agentes de inmunoterapia con un alto potencial para su uso en el tratamiento del cáncer, la IL-12 fue clasificada recientemente como la tercera en importancia de una lista completa de agentes [289-290]. En los estudios preclínicos, la IL-12 ha demostrado notables efectos antitumorales contra una variedad de neoplasias malignas [35, 290], y se ha demostrado que las terapias basadas en IL-12 pueden potenciar la memoria inmunológica y mediar la protección contra la re exposición a tumores [291-292].

Desafortunadamente, el éxito de la IL-12 recombinante en ensayos clínicos ha sido limitado, y se han presentado efectos adversos tras su administración intravenosa [291], por lo que se ha apoyado la idea de que un método más seguro y efectivo de inmunoterapia basada en la IL-12, es a través de la administración local [292], pues se reduciría la toxicidad que se presenta cuando la IL-12 es administrada sistémicamente, por lo que la generación de complejos quitosano/pDNA y su administración local, permitiría la liberación prolongada del gen de la IL-12 en un modelo tumoral VPH positivo, y su posible utilización como estrategia terapéutica contra el cáncer cervicouterino.

# CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 3.1 Hipótesis

El uso de quitosano, acoplado al plásmido pCMVIL-12; será un buen vehículo para la liberación del gen IL-12, y permitirá un efecto anti-tumoral constante en un modelo tumoral experimental VPH 16 positivo.

## 3.2 Objetivo general

Evaluar una estrategia terapéutica basada en el uso de quitosano acoplado al gen de la IL-12, que favorezca su liberación en un modelo experimental tumoral murino VPH 16 positivo.

## 3.3 Objetivos específicos

- 1.- Generar un complejo de quitosano acoplado a un plásmido con el gen de la IL-12.
- 2.- Caracterizar fisicoquímicamente los complejos quitosano/pADN en función de su capacidad de encapsulamiento, estabilidad, disociación y protección del ADN plasmídico en un modelo *in vitro*.
- 3.- Evaluar la biocompatibilidad y biodegradación de los complejos quitosano/pADN.
- 4.- Desarrollar un modelo tumoral experimental murino en ratones Balb/c singénicos VPH 16 positivo.
- 5.- Evaluar el efecto antitumoral por la administración del complejo quitosano/DNAIL-12 en el modelo tumoral murino.

## CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Cultivo de las células

La línea celular de ratón BMK-16/myc está transformada con el genoma del VPH tipo 16 y expresa constitutivamente los oncogenes E6 y E7, fue donada amablemente por la Dra. Sophie Halez (Université Libre de Bruxelles, Rhode-saint-genése, Bélgica) [334]. Esta línea se cultivó en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 50 U/ml de penicilina, 50 ug/ml de streptomycin, 2 mM L-glutamina y 250 ng/ml de fungisona (Invitrogen Life Technologies, San Diego California) a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Bajo las condiciones anteriormente mencionadas también se cultivaron las líneas celulares SiHa (ATCC), HeLa (ATCC) y C33-A (ATCC).

### 4.2 Purificación de los plásmidos.

El plásmido pNGVL3-mIL-12 fue obtenido del Centro de Vectores de la Universidad de Michigan, el cual tiene un tamaño molecular de 6.247 kb y codifica para las subunidades p40 y p35 de IL-12 de ratón. Adicionalmente cuenta con un promotor de CMV y genes de resistencia a kanamicina. El vector fue amplificado en bacterias *E.coli* DH5- $\alpha$ , que posteriormente fueron inoculadas en medio de cultivo selectivo LB, y se mantuvieron a 37°C en agitación constante durante toda la noche. El plásmido se purificó mediante columnas de intercambio iónico que tienen la capacidad de eliminar endotoxinas (EndoFree plasmid Mega kit, Qiagen). Posteriormente su concentración se determinó mediante espectrofotometría a una longitud de onda 260/280 nm. El plásmido fue caracterizado mediante digestión enzimática con las enzimas Bgl II y Eco RV (Invitrogen). De la misma manera se purificaron los vectores pcDNA3 (Invitrogen) que fue usado como control de inmunización, pSV- $\beta$ -Galactosidasa (Promega) para determinar la eficiencia de transfección y pEGFP-N3. El plásmido pcDNA3 tiene un tamaño molecular de 5.446 kb, y no contiene genes terapéuticos, presenta resistencia a neomicina y ampicilina; mientras que el plásmido pSV- $\beta$ -Galactosidasa, tiene un tamaño molecular de 6.820 kb y codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa; por lo que se utilizó como gen reportero para medir la transfección, adicionalmente contiene genes que le confieren resistencia a neomicina y ampicilina. De igual manera los plásmidos fueron amplificados y purificados como se mencionó anteriormente y se determinó su concentración mediante espectrofotometría.

Después de ser purificados y cuantificados, todos los plásmidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, los plásmidos fueron resuspendidos en agua estéril desionizada (Golden bell); y fueron almacenados a -20 °C hasta su uso. La caracterización de los plásmidos se realizó mediante digestión enzimática y fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, al igual que la pureza del plásmido (Anexo 3).

#### **4.3 Preparación y caracterización de los complejos quitosano/DNAIL-12.**

Los complejos quitosano/DNAIL-12 fueron preparados por el método de coacervación [335]. Se utilizó quitosano de bajo (BPM), mediano (MMW) y alto (HMW) peso molecular (PM), con un 75-85% de acetilación ( $C_{12}H_{24}N_2O_9$ , No. Catalogo 448869, 448877, 419419, respectivamente; Sigma-Aldrich). Los complejos quitosano/DNAIL-12 se prepararon con 0.25%, 0.50% y 0.75% de los tres polímeros y 50  $\mu$ g de ADN plasmídico. 2.5 mg de quitosano fueron diluidos en 1 ml de ácido acético al 2% (Sigma Aldrich) y se agitó durante 1 hora. 100  $\mu$ l de la solución de quitosano se mezclaron con 100  $\mu$ l del plásmido previamente diluido ([500  $\mu$ g/ml de pDNA]) en  $Na_2SO_4$  al 20%. La solución 1:1 (v/v) de quitosano/DNAIL-12 se mezclaron y se mantuvieron en agitación durante 1 hora para la generación de los complejos.

Los complejos fueron recuperados y precipitados por centrifugación a 2 000 rpm durante 8 minutos. El ADN no encapsulado se midió por absorción UV a 260 nm, y se almacenaron a temperatura ambiente, mientras que los complejos precipitados se lavaron 2 veces con agua desionizada y almacenados a temperatura ambiente.

Los complejos quitosano/DNAIL-12 se analizaron por un ensayo de retardación en gel mediante electroforesis. Se realizó la separación de los complejos en gel de agarosa al 0.8% y fueron teñidos con bromuro de etidio para su observación.

#### **4.4 Eficiencia de encapsulamiento del pADN.**

La cantidad de ADN que fue retenido por el quitosano, se determinó mediante espectrofotometría utilizando un nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000) y utilizando la siguiente fórmula:

$$\%R = ((pADN_{Total} - pADN_{Libre}) / pADN_{Total}) \times 100$$

Dónde:

%R= Porcentaje de retención.

pADN<sub>Total</sub> = Cantidad total de pADN.

pADN<sub>Libre</sub> = Cantidad de pADN sin encapsular.

#### **4.5 Protección a la degradación del ADN encapsulado.**

Para determinar la protección del ADN acoplado al quitosano de su degradación por parte de las nucleasas celulares, el ADN desnudo y los complejos quitosano/ADN<sub>IL-12</sub> se incubaron con una Unidad de DNasa I (Fermentas, Life Sciences) durante 12 horas a 37 ° C. La reacción se inhibió agregando 5 µl de EDTA 0,5 M a temperatura ambiente. Posteriormente, los complejos fueron digeridos con una Unidad de quitosanasas de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich) durante 12 horas a 37 ° C. La integridad del ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

#### **4.6 Estabilidad de los complejos.**

La integridad de los complejos a los cambios de temperatura se determinó mediante el almacenamiento de los complejos a temperatura ambiente y a 3°C durante 30 días. Durante ese período se obtuvieron muestras de sobrenadante de los complejos y se cuantificaron mediante espectrofotometría, además de un ensayo de retardación en gel de agarosa al 0.8% para determinar el mantenimiento de los complejos.

#### **4.7 Liberación del plásmido del complejo quitosano/DNAIL-12.**

La liberación del DNA de los complejos de quitosano se determinó incubando el complejo en PBS a los pH 7.1, 6.8, 6 y 5 con agitación constante, a temperatura ambiente durante diferentes intervalos de tiempo. Una vez alcanzado el tiempo de medición, la muestra fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos, se obtuvo el sobrenadante y se midió el ADN liberado del complejo por espectrofotometría hasta 72 horas.

#### **4.8 Transfección *in vitro* con el complejo quitosano/DNAIL-12 y evaluación de la citotoxicidad.**

Las líneas celulares humanas SiHa y HeLa transformadas con VPH 16 y 18 respectivamente, C-33A negativa a la infección de VPH y la línea celular de ratón BMK-16/myc transformada con VPH 16; fueron cultivadas en placas de 96 pozos y tratadas con los complejos quitosano/DNAIL-12 y Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen). Un total de  $5 \times 10^3$  células fueron colocadas a cada pozo y se transfectaron con 5 y 10  $\mu\text{g}$  del plásmido pSV- $\beta$ -galactosidasa, acoplado a quitosano de bajo y mediano peso molecular al 0.25 y 0.50%. Por otro lado, las preparaciones anteriormente descritas fueron realizadas para transfectar las células utilizando 3  $\mu\text{l}$  de lipofectamina por cada 5  $\mu\text{g}$  de plásmido. Después de 48 horas de incubación, se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa mediante el kit comercial  $\beta$ -galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer (Promega), debido a la conversión de nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranososa en el compuesto coloreado de nitrofenol y galactosa por medio de la acción de la  $\beta$ -galactosidasa. El producto obtenido fue cuantificado mediante un lector de ELISA a 414 nm de absorancia.

Por otro lado, se determinó la toxicidad de los complejos de acuerdo a la proliferación celular observada a las 48 horas de la transfección mediante un ensayo de MTT, el cual se basa en la reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en formazan, lo que determina la funcionalidad mitocondrial en las células vivas.

#### **4.9 Ratones.**

Se utilizaron ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad. Los ratones para este estudio no tienen ninguna deficiencia inmunológica para no alterar la estrategia terapéutica. Los ratones se obtuvieron de la Unidad del Bioterio del INSP, la fuente de las cepas de los ratones son de: The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine USA).

#### **4.10 Generación del modelo tumoral.**

El modelo tumoral murino VPH 16 positivo se generó en ratones hembras inmunocompetentes Balb/c de 6 semanas de edad y la línea celular BMK-16/myc de origen epitelial de riñón transformada con el genoma del VPH 16 y con el proto-oncogen c-myc. Antes de la generación del tumor, el dorso de los ratones fue rasurado para que hacer más evidente y medible el volumen tumoral. Aproximadamente,  $3 \times 10^5$  células BMK-

16/myc se inyectaron por vía sub-cutánea en el dorso de ratones Balb/c. El crecimiento tumoral se midió por medio de un calibrador electrónico cada tres días a partir de que el tumor fue palpable.

El volumen tumoral se obtuvo de la siguiente manera:

Volumen tumoral ( $V = \text{diámetro mayor} \times \text{diámetro menor}^2$ ).

Una vez que los ratones alcanzaron un volumen tumoral entre 20 y 30 mm<sup>3</sup> (aproximadamente en los días 15 al 20) se realizaron grupos para los ensayos de inmunización.

#### **4.11. Administración de complejos polímeros/DNA en el modelo tumoral murino.**

Se utilizaron ratones con un volumen tumoral entre [20 a 30] mm<sup>3</sup>. A partir del volumen tumoral considerado, se realizó la primera inmunización y se consideró como día cero. Los complejos quitosano/pADN se prepararon con una concentración de 25 y 50 µg del plásmido, con quitosano de bajo peso molecular al 0.50% en un volumen final de 30 µl por dosis. Los complejos fueron administrados por vía intratumoral y se midió su efecto de inhibición tumoral a diferentes tiempos, evaluando el volumen tumoral cada tres días.

Se realizaron dos grupos experimentales de trabajo por cada tratamiento (quitosano/pCMVmIL-12, quitosano/pcDNA3, quitosano y PBS) y se determinaron los siguientes parámetros:

<b>Grupo</b>	<b>No. de Ratones</b>	<b>Determinación</b>
I	5	Curva de volumen tumoral y sobre-vivencia
II	10	Biodegradación de los complejos quitosano/pADN

Cada grupo se organizó con diferente número de ratones de acuerdo a los parámetros evaluados.

#### **4.12. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis descriptivo de cada una de las variables estudiadas, y de la población de ratones en estudio. En la evaluación del modelo animal, se describieron sus características así como el volumen tumoral promedio y un análisis de supervivencia en los grupos experimentales murinos. La comparación del promedio del volumen tumoral en los diferentes grupos de estudio, se realizó mediante la prueba Mann Withney con una significancia  $p < 0.05$ .

Todos los datos se expresaron en media aritmética con el error estándar de la media. Se realizó la comparación del promedio del volumen tumoral, en los diferentes grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico Microsoft Excel 2010. La comparación entre los grupos, se realizó mediante un análisis de la varianza ANOVA de una vía. Los valores con una  $p < 0.05$  se consideraron significativos. Todos los experimentos se realizaron cumpliendo con los requisitos de estudios experimentales de repetición, aleatorización y control.

## CAPÍTULO 5. RESULTADOS

### 5.1 Generación y caracterización de los complejos quitosano/pADN.

Los complejos quitosano/pADN fueron obtenidos mediante el método de coacervación como se mencionó anteriormente. Con la finalidad de determinar si el quitosano es capaz de encapsular el ADN plasmídico y si el peso molecular del plásmido podría afectar en la generación de los complejos, se midió la eficiencia de encapsulación de manera indirecta mediante espectrofotometría. Las formulaciones fueron realizadas por triplicado utilizando quitosano de bajo, mediano y alto peso molecular al 0.25%, 0.50% y 0.75%. La figura 15 muestra la alta eficiencia de encapsulamiento de los distintos plásmidos por el quitosano. El porcentaje de encapsulamiento se determinó con la fórmula:

$$\%ADN_{\text{Encapsulado}} = (\text{pADN}_{\text{Total}} - \text{pADN}_{\text{Libre}})$$

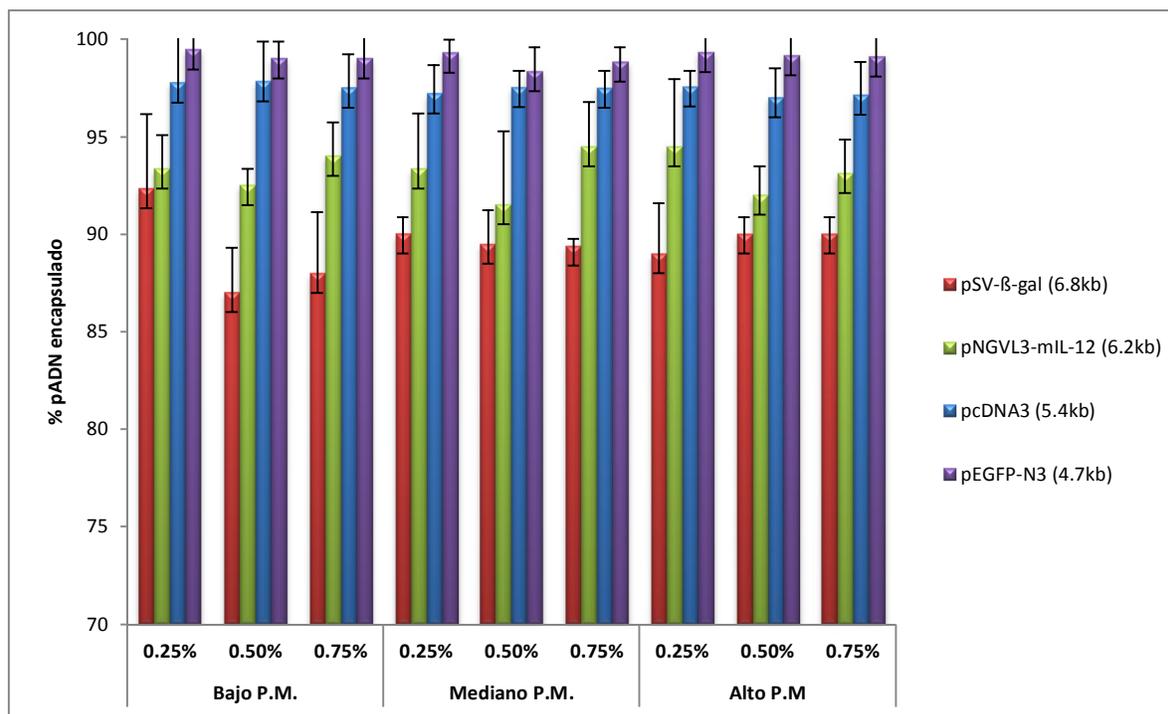


Figura 15. Eficiencia de encapsulamiento del pADN por el quitosano de bajo, mediano y alto peso molecular. Cada valor de la figura esta representado como la media de la desviación estándar ( $\pm$  SD),  $n=3$ .

Se pudo determinar que la eficiencia de encapsulamiento disminuye ligeramente conforme aumenta el peso molecular del plásmido, pues la mayor eficiencia se obtuvo con el plásmido pEGFP-N3 que tiene un peso molecular de 4.7 Kb, seguido de los plásmidos pc DNA 3 y pNGVL3-mIL-12 con 5.4 y 6.2 Kb respectivamente. De acuerdo al análisis de varianzas se pudo determinar que la relación entre el peso molecular del plásmido y la eficiencia de encapsulamiento del quitosano es estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ). Por otro lado las diferencias entre el quitosano de bajo y mediano peso molecular no afectan la encapsulación del plásmido, pues para el caso de los plásmidos pcDNA3 y pNGVL3-mIL-12 se obtuvo una eficiencia de encapsulamiento entre el 89-92% del ADN total, lo cual es una eficiencia mayor con respecto a otros trabajos realizados bajo la misma metodología [334]. Por otro lado el quitosano de alto peso molecular presenta mayor capacidad de encapsulamiento de alrededor del 96%, e incluso aumenta al 98% conforme aumenta la concentración del quitosano, lo cual concuerda con otros reportes [334-336]. Sin embargo el uso de quitosano de alto peso molecular produce una mayor viscosidad en la solución, comparado con la viscosidad obtenida con los quitosano de bajo y mediano peso molecular, lo cual provoca dificultades en su manipulación y podría ser un factor limitante para su administración mediante inyección directa. En éste sentido, aunque el quitosano de bajo peso molecular presenta la eficiencia de encapsulación más baja; su viscosidad permite su fácil manipulación, por lo que se utilizó para los ensayos posteriores.

Una vez determinado el porcentaje de encapsulamiento, se realizó la caracterización de los complejos, mediante ensayos de retardación en gel de agarosa al 0.8%. Previamente a la generación de los complejos, el ADN fue resuspendido en sulfato de sodio al 20%; con la finalidad de aumentar las cargas negativas y de esta manera favorecer la interacción con el quitosano, y la generación de los complejos.

Una vez obtenidos los complejos fueron precipitados mediante centrifugación y posteriormente se realizaron 2 lavados con agua desionizada estéril, con la finalidad de eliminar el ácido acético en que fue diluido el quitosano y determinar si

los lavados afectaban la conformación de los complejos. La figura 16 muestra la integridad del plásmido purificado y tratado con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 20% (líneas 2 y 3 respectivamente). Se observó que el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , no afectó la calidad del ADN plasmídico.

Por otro lado en las líneas 5, 7, 9 y 10, se observan los complejos quitosano/ADN en la parte superior del gel, que debido a su peso molecular no son capaces de migrar; adicionalmente se observa que los complejos (líneas 7 y 9) son estables y no son degradados por efecto del lavado con agua desionizada. En las líneas 6 y 8 se colocaron los sobrenadantes obtenidos del proceso de lavado, y no se observó la presencia de ADN liberado; sin embargo la nula observación podría ser debida a que la cantidad de ADN que es liberada de los complejos por el lavado es muy baja o nula (Figura 16).

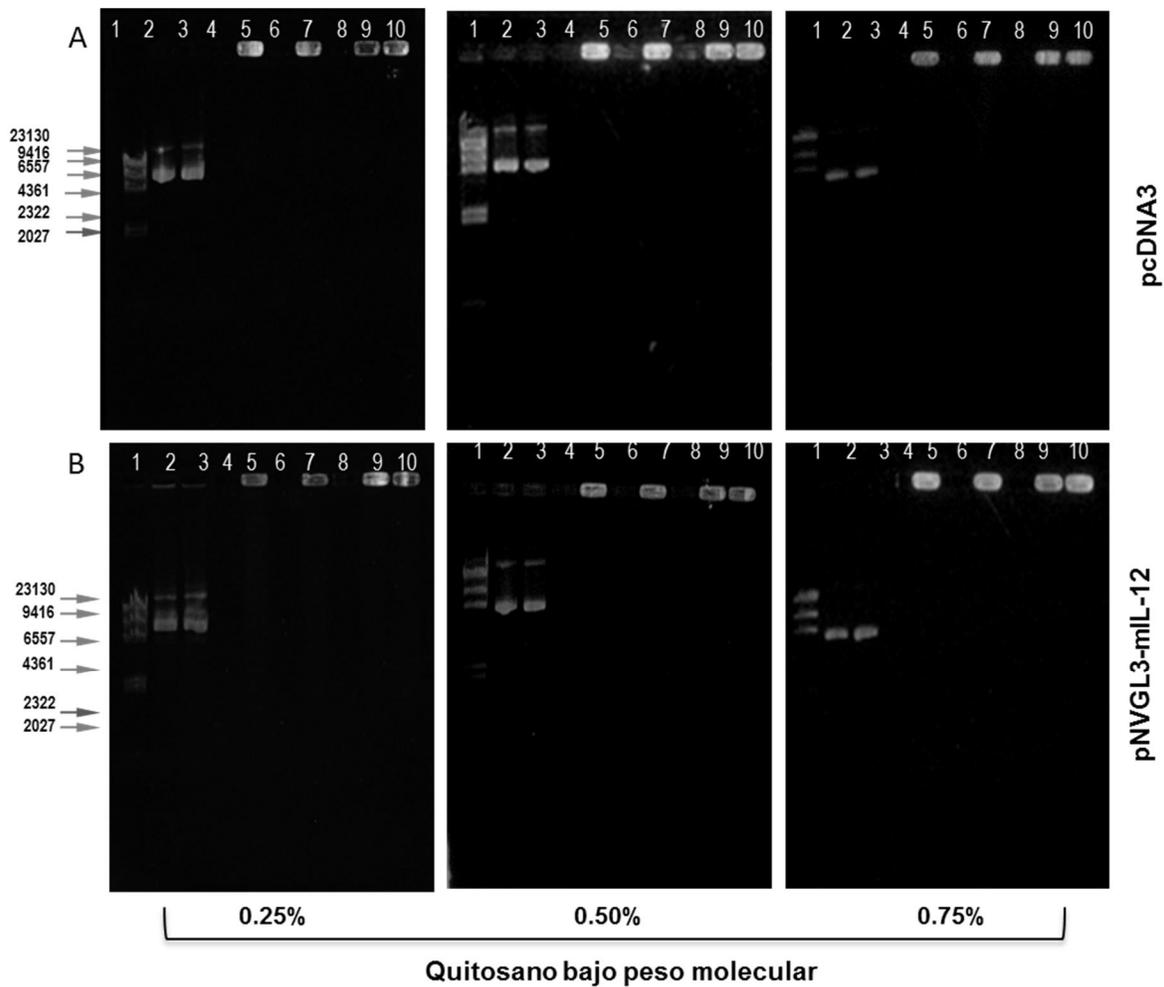


Figura 16. **Ensayo de retardación en gel de los complejos Quitosano/ADN.** A) Quitosano BPM + pcDNA3, B) Quitosano BPM + pCMVIL-12. Línea 1) Marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III, 2.- Plásmido, 3.- Plásmido + Sulfato de sodio 20%, 4.- quitosano + Sulfato de sodio 20%, 5.- Complejo, 6.- Sobrenadante lavado 1, 7.- Complejo lavado 1, 8.- Sobrenadante lavado 2, 9.- Complejo lavado 2, 10.- Complejo filtrado.

## 5.2 Protección del ADN encapsulado de su degradación por la DNAsa I.

Para determinar si los complejos generados pueden proteger de la degradación por nucleasas al ADN encapsulado, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, la integridad del ADN plasmídico al ser sometido al ataque hidrolítico por la DNAsa I. Inicialmente el ADN plasmídico y los

complejos fueron tratado con DNAsa I, y posteriormente se incubaron los complejos con quitosanasa I de *Streptomyces griseus*.

En la figura 17 se observa la integridad del ADN plasmídico utilizado en el ensayo (línea 2). Cuando el plásmido desnudo fue tratado con la DNAsa I, se observa el ADN completamente degradado (línea 3). En la línea 4 se observan los complejos quitosano/pADN generados, y al ser tratados con DNAsa I (línea 5) los complejos se mantienen estables. Sin embargo cuando los complejos fueron tratados con quitosanasa (línea 6), se produce la hidrólisis de las unidades D-glucosamina  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) del quitosano, favoreciendo la liberación del plásmido previamente encapsulado. El plásmido liberado se observa completamente íntegro, lo cual indica que los complejos quitosano/pADN, son capaces de retener efectivamente el ADN encapsulado y lo protege de su degradación por la DNAsa I, lo cual favorecería su utilización para transporte de material genético en estrategias de terapia génica no viral.

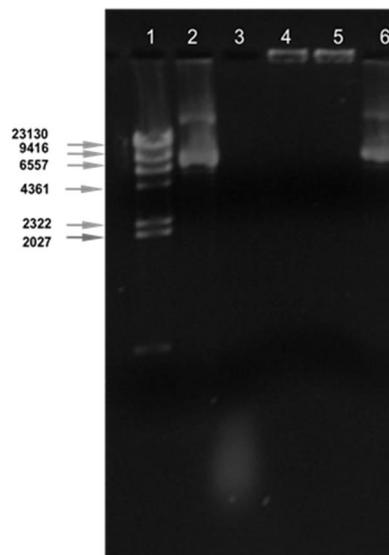


Figura 17. **Protección de la degradación por DNAsa I del pADN encapsulado en los complejos quitosano/pADN.** Línea 1: Marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III; línea 2: ADN plasmídico purificado; línea 3: ADN plasmídico incubado con DNAsa I; línea 4: complejos quitosano/pADN; línea 5: complejos quitosano/pADN tratados con DNAsa I; línea 6: complejos quitosano/pADN tratados con DNAsa y quitosanasa.

### **5.3 Estabilidad de los complejos quitosano/pADN en solución.**

La estabilidad de los complejos durante su tiempo de almacenamiento, es fundamental para su viabilidad y disponibilidad como vectores para transferencia génica. Diversos estudios han demostrado su estabilidad, sin embargo es necesario determinar la estabilidad de nuestros complejos en solución. Para determinar si los complejos quitosano/pADN contenidos en solución, se ven afectados por efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento y tienen algún efecto sobre la eficiencia de encapsulación (pérdida de ADN plasmídico previamente encapsulado), se prepararon complejos con el quitosano de bajo y mediano peso molecular, a una concentración de 0.25% y 0.50% en ácido acético al 2%. Posteriormente fueron almacenados a 3°C y ≈25°C durante un periodo de 30 días. El pADN fue cuantificado cada 2 días mediante espectrofotometría utilizando un nanodrop. Los complejos quitosano/pADN fueron preparados por el método de coacervación previamente descrito. Se utilizaron los plásmidos pNGVL3-mIL-12 y pcDNA3 a la concentración de 25 µg y 50 µg.

En la figura 18 se observa la eficiencia de encapsulación de los plásmidos pNGVL3-mIL-12 y pcDNA3. Los complejos en solución fueron almacenados a 3°C y a temperatura ambiente. La eficiencia de encapsulación al inicio del ensayo concuerda con los datos reportados en la figura 15. En las gráficas 18A y 18B se observa la estabilidad de los complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12 a temperatura ambiente y a 3°C respectivamente.

Después de 30 días de seguimiento se determinó que los complejos se mantienen estables, sin embargo se observó menor liberación del pADN de los complejos cuando fueron mantenidos a 3° comparados con los que se mantuvieron a temperatura ambiente. Además cuando los complejos fueron preparados a la concentración más baja (0.25%), independientemente del peso molecular del quitosano (bajo o mediano peso molecular), se observó una mayor liberación del pADN comparado con los preparados con 0.50% de quitosano. Sin embargo a pesar de la pérdida de ADN plasmídico de los complejos, el porcentaje de encapsulamiento es mayor del 85% a temperatura ambiente y arriba del 88% a 3°C, por lo que los complejos se mantienen parcialmente estables después de 30

días en solución, y su eficiencia de encapsulación no se vio afectada por la temperatura de almacenamiento.

Las gráficas 18C y 18D, representan la estabilidad de los complejos quitosano/pcDNA3 a temperatura ambiente y a 3°C respectivamente. Los resultados presentan la misma tendencia que los obtenidos con los complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12. La figura 18E, muestra las preparaciones de los complejos que fueron analizados.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de retardación en gel de agarosa al 0.8% con el fin de determinar la estabilidad de los complejos en solución. En el cuadro E, se observan los complejos quitosano de bajo peso molecular al 0.25% con 50 µg de pNGVL3-mIL-12, a los 0, 15 y 30 días a temperatura ambiente (líneas 4, 5 y 6), por lo que se pudo observar la integridad de los complejos después de 30 días de seguimiento en solución.

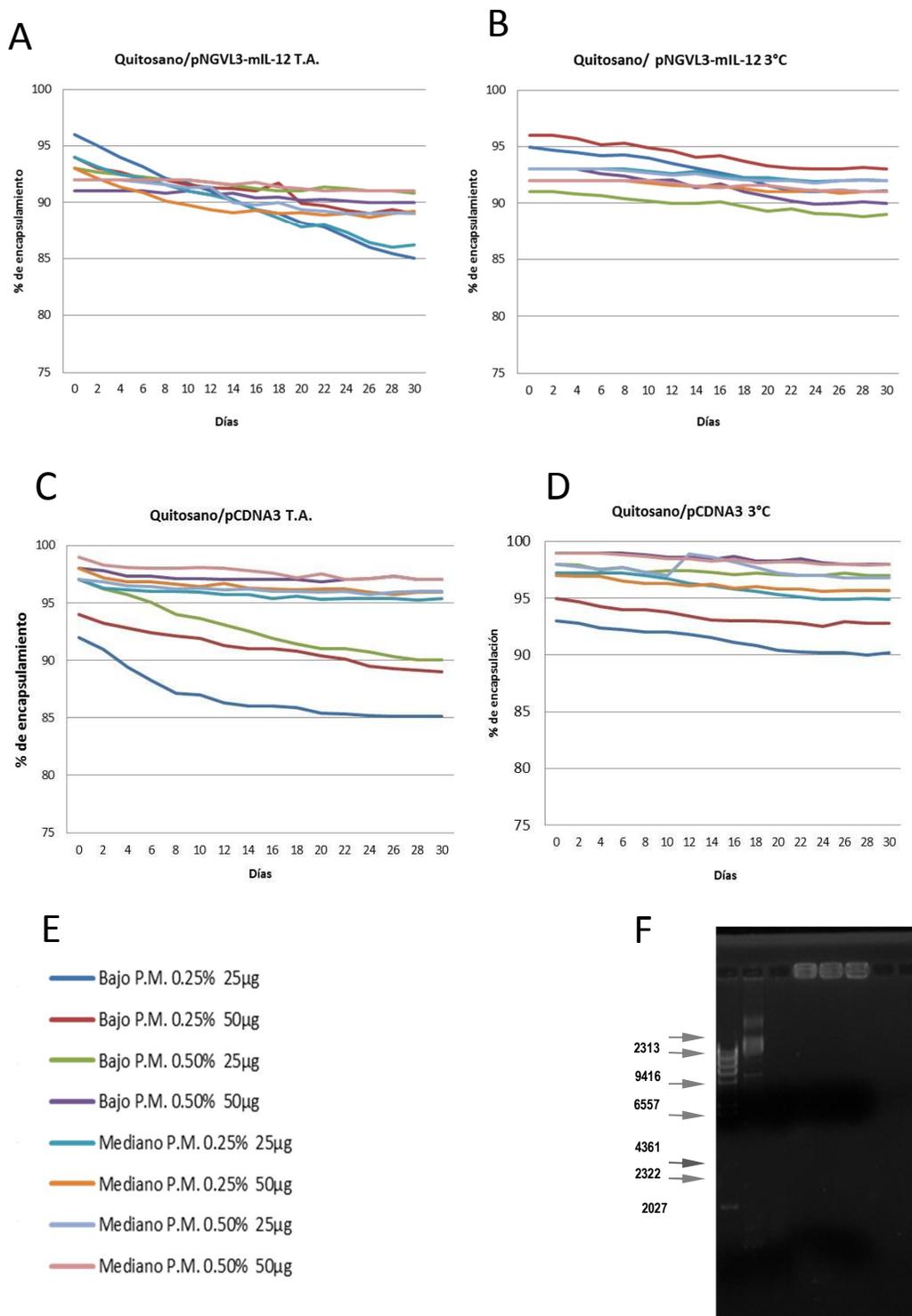


Figura 18. Efecto de la temperatura de almacenamiento del quitosano en solución sobre la eficiencia de encapsulación del plásmido pNGVL3-mIL-12. A) Complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12 a temperatura ambiente, B) Complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12 a 3°C, C) Complejos quitosano/pcDNA3 a temperatura ambiente, D) Complejos quitosano/pcDNA3 a 3°C, E) Preparaciones de los complejos evaluados. F) Estabilidad de los complejos quitosano de bajo peso molecular al 0.25% con 50 µg de pNGVL3-mIL-12; línea 1 Marcador de peso molecular  $\lambda$

Hind III, línea 2 plásmido pNGVL3-mIL-12, línea 3 plásmido sin encapsular, líneas 4, 5 y 6 complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12 a los 0, 15 y 30 días respectivamente (Los ensayos fueron realizados por triplicado).

#### **5.4 Influencia del pH en la degradación de los complejos.**

Se ha determinado que diversas propiedades fisicoquímicas del quitosano como: pKa, grado de desacetilación y el peso molecular, favorecen su degradación por efecto del pH, además las propiedades estructurales de los complejos, y la metodología para su formulación también influyen en el proceso de su degradación. En este sentido y con la finalidad de evaluar el porcentaje de disociación de los complejos por efecto del pH, se prepararon complejos quitosano/pADN (quitosano al 0.25%, 0.50% y 0.75% de bajo, mediano y alto peso molecular) con 33µg de plásmido. Una vez obtenidos los complejos, fueron precipitados por centrifugación y posteriormente re suspendidos en PBS 1X estéril a pH 7.1, 6.8, 6.5, 6.0 y 5.0. Los complejos incubados con PBS a distintos pH's se mantuvieron a temperatura ambiente con agitación constante durante 72 horas.

Cada 24 horas se midió la cantidad de pADN liberado por efecto del pH mediante espectrofotometría. Para ello, los complejos fueron centrifugados y el sobrenadante conteniendo el pADN liberado de los complejos fue cuantificado, mientras que el botón correspondió a los complejos precipitados. Una vez realizada la determinación del pADN libre, los complejos fueron nuevamente re suspendidos en PBS fresco, hasta su posterior lectura.

En la figura 19 se observa la liberación del pADN por efecto de la degradación de los complejos quitosano/pADN favorecida por el pH. En el cuadro A se observa que la liberación del ADN plasmídico es de aproximadamente 18% a pH 7.1 a las 72h. Siendo los complejos preparados con el quitosano de bajo peso molecular al 0.25%, los que se degradan más rápidamente (a las 24 h). Sin embargo, a mayor tiempo no aumenta sustantivamente su degradación y se mantiene estable la cantidad de pADN liberado, alcanzando un nivel similar a las otras preparaciones, lo cual indica que el pH básico tiene muy poca influencia en la degradación de los complejos quitosano/pADN. Por otro lado, cuando los complejos son tratados a pH 6.8 (cuadro B), se observa que el 25% del ADN es

liberado a las 72h, los complejos formados con quitosano de mediano peso molecular a una concentración del 0.75%, presentan una liberación de ADN plasmídico del 45% en 48h. De manera general, se observa una mayor liberación de pADN en estas condiciones, comparado con los complejos incubados a pH 7.1. Los complejos preparados con quitosano de bajo y mediano peso molecular al 0.50% y 0.75% respectivamente, incubados a pH 6.5 presentan una liberación de ADN de alrededor del 40% a las 48h, y esta condición se mantiene en constante aumento hasta un 65% a las 72h para los complejos de mediano peso molecular al 0.75% (Cuadro C). Cuando los complejos son incubados a pH 6 se observa un incremento variable pero significativo en la liberación del pADN, con una media del 40% a las 72h (Cuadro D), alcanzando porcentajes de liberación desde el 30% hasta el 80% en la mayoría de los casos. Sin embargo para los complejos incubados a pH 5 a las 48h, el aumento en la liberación del pADN fue considerable comparado con las condiciones anteriores, pues el porcentaje de liberación se encontró entre el 45% al 70%, mismos que se mantuvieron constantes y en algunos casos en aumento a las 72 h (Cuadro E). Estos resultados indican, que el pH influye en la degradación de los complejos de quitosano/pADN; y se observa una relación entre el aumento de la degradación de los complejos conforme aumenta el grado de acidez del medio. Adicionalmente, la velocidad de degradación de los complejos parece estar influenciada por el peso molecular del quitosano y su concentración. Estos resultados corroboran las propuestas de la influencia del pH en la estabilidad de los complejos, lo cual es de suma importancia en la transgénesis.

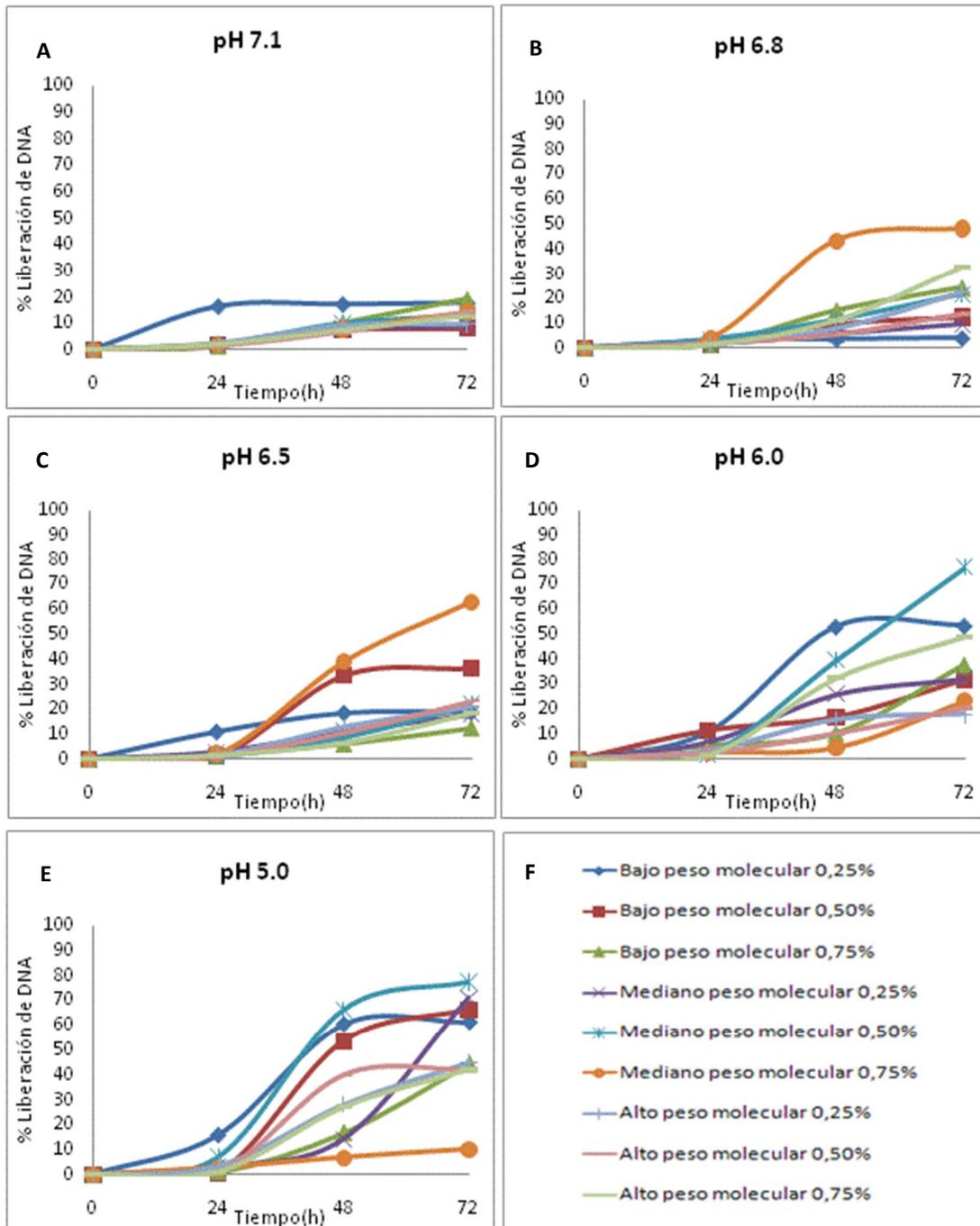


Figura 19. Efecto del pH sobre la liberación de pADN encapsulado en los complejos quitosano/pADN. Cuadros A) Complejos quitosano/pADN a pH 7.1, B) Complejos quitosano/pADN a pH 6.8, C) Complejos quitosano/pADN a pH 6.5, D) Complejos quitosano/pADN a pH 6.0, E) Complejos quitosano/pADN a pH 5, F) Preparaciones evaluadas. Cada valor de la figura esta representado como la media de la desviación estándar ( $\pm$  SD),  $n=3$ .

## **5.5 Influencia del peso molecular del quitosano en su degradación.**

Para determinar si el peso molecular del quitosano influye en la velocidad de degradación de los complejos por efecto del pH, se prepararon complejos quitosano/pADN, utilizando quitosano de bajo, mediano y alto peso molecular a los porcentajes de 0.25%, 0.50% y 0.75% de bajo, mediano y alto peso molecular, acoplados a 33µg de ADN plasmídico. Los complejos se incubaron en PBS estéril 1X a pH 7.1, 6.8, 6.5, 6.0 y 5.0 y se mantuvieron a temperatura ambiente con agitación constante durante 72 horas.

Cada 24 horas los complejos fueron centrifugados y el sobrenadante conteniendo el pADN se midió por espectrofotometría, posteriormente los complejos fueron re suspendidos nuevamente en PBS fresco.

En la figura 20 se observa la degradación de los complejos preparados con quitosano de distintos pesos moleculares y como consecuencia la liberación del pADN. El cuadro A muestra el ADN plasmídico liberado de los complejos preparados con quitosano de bajo peso molecular al 0.25%, al ser incubados con PBS a los valores de pH previamente mencionados. La mayoría de los complejos alcanzan su cantidad máxima de liberación entre las 24 y 48 horas, siendo los complejos incubados a pH 5 y 6 los de mayor liberación (entre 65 y 60% respectivamente).

En el cuadro B, se observa que la liberación máxima de pADN se alcanzó a partir de las 48 horas. Para el caso de los complejos incubados a pH 5, su nivel máximo de liberación se alcanzó a las 72 horas con alrededor del 70%. Adicionalmente se pudo observar que conforme aumenta el nivel de acidez en que fueron incubados los complejos también aumenta el porcentaje de liberación a través del tiempo. Cuando los complejos fueron preparados con quitosano de alto peso molecular (Cuadro C), se mantuvo la misma tendencia que en las preparaciones anteriores, sin embargo la cantidad máxima de liberación fue de alrededor del 15% a las 72 horas para los complejos incubados a pH5.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que la degradación de los complejos en relación con el peso molecular del quitosano, está influenciada con el pH del medio, consecuentemente, es posible determinar la velocidad de

liberación del pADN de acuerdo a la formulación empleada (peso molecular del quitosano – pH del medio), lo cual podría manipularse para la elaboración de sistemas de liberación controlada de moléculas terapéuticas.

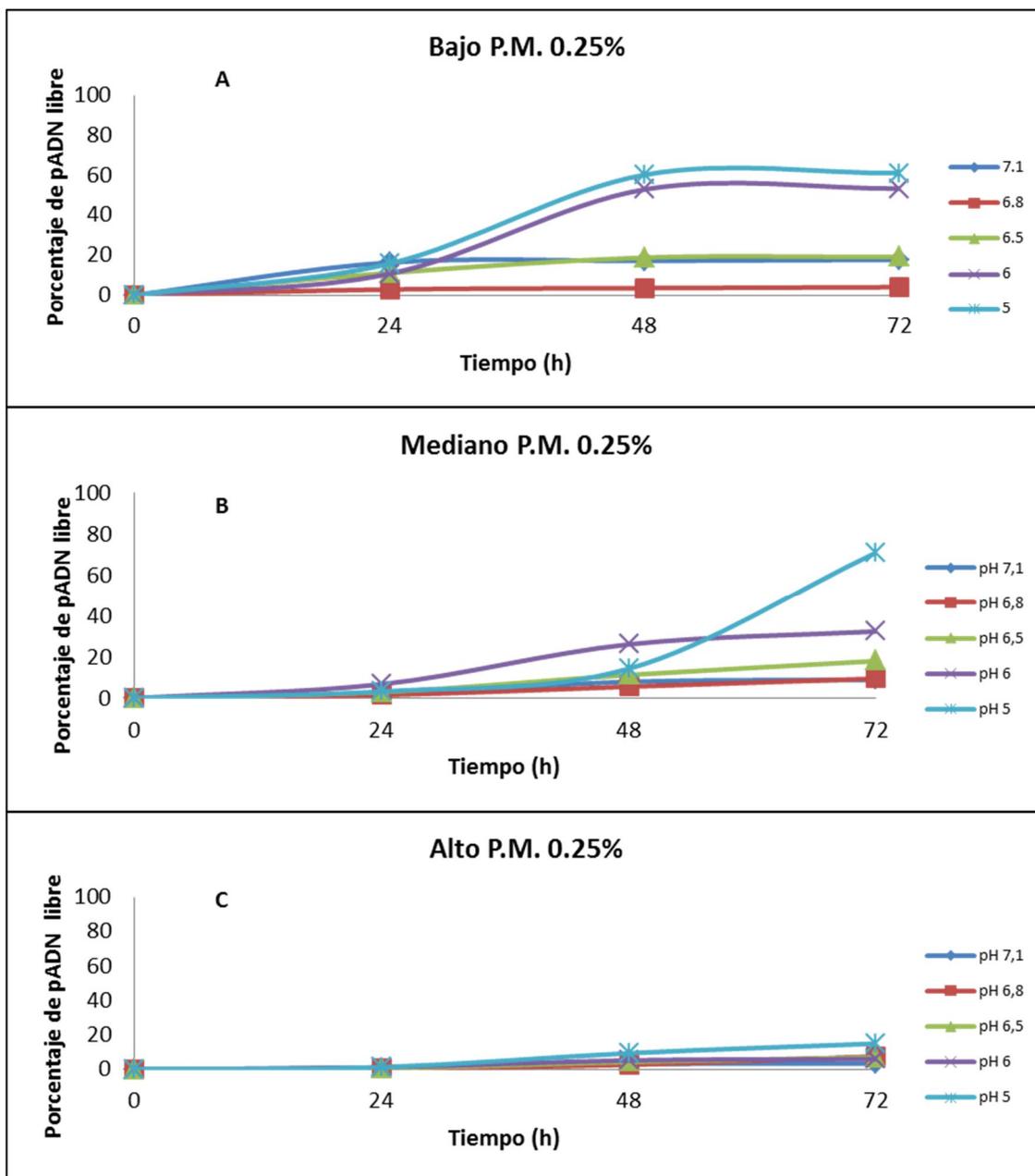


Figura 20. **Influencia del peso molecular del quitosano en la degradación de los complejos.** Cuadro A) Degradación de los complejos preparados con quitosano de bajo peso molecular al 0.25% con 33  $\mu$ g pADN incubados a distintos pH. B) Degradación de los complejos preparados con quitosano de mediano peso molecular. C) Degradación de los complejos preparados con quitosano de alto peso molecular. Cada valor de la figura esta representado como la media de la desviación estándar ( $\pm$  SD),  $n=3$ .

## 5.5 Eficiencia de transfección de los complejos quitosano/pADN.

Para determinar la eficiencia de transfección de los complejos quitosano/pADN, inicialmente se cultivaron las líneas celulares humanas SiHa, HeLa, C-33 A y la línea celular murina BMK-16/myc. Una vez que las células alcanzaron un nivel de confluencia del 80% fueron transfectadas con los complejos quitosano/pADN. Los complejos fueron preparados con quitosano de bajo y mediano peso molecular al 0.25% y 0.50% y el plásmido pSV- $\beta$ -galactosidasa a una concentración de 0, 5 y 10  $\mu$ g. Los complejos obtenidos se mantuvieron en PBS estéril a pH 7.1. Con la finalidad de determinar la eficiencia de transfección de los complejos, adicionalmente se transfectaron las mismas líneas celulares usando *Lipofectamina*<sup>TM</sup> 2000 con las mismas concentraciones de ADN plasmídico. La eficiencia de transfección se determinó midiendo la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa usando el *kit* comercial *-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer* a las 48 h posteriores a la transfección.

La figura 21 muestra la eficiencia de transfección de los complejos quitosano/pADN. Cuando los complejos se realizaron con 5  $\mu$ g de ADN plasmídico y quitosano de bajo y mediano peso molecular al 0.50%, se observó preferentemente la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en las líneas celulares BMK-16/myc y HeLa respectivamente. Sin embargo cuando los complejos fueron preparados con 10 $\mu$ g de plásmido; todas las líneas celulares fueron transfectadas. La mayor eficiencia de transfección en las líneas celulares se obtuvo al utilizar quitosano de mediano y bajo peso molecular al 0.50%. Sin embargo dichos resultados varían de acuerdo a la línea celular transfectada, por lo que independientemente de la estandarización y optimización de las propiedades fisicoquímicas de los complejos, las propiedades biológicas inherentes al modelo de estudio podrían influir en la eficiencia de transfección. Por otro lado, cuando la transfección se realizó utilizando *Lipofectamina*<sup>TM</sup> 2000 con 5 $\mu$ g de ADN plasmídico, se observó actividad preferente de  $\beta$ -galactosidasa en las líneas celulares SiHa y BMK-16/myc, y en esta última línea celular, el nivel de actividad de la enzima fue poco más del doble, comparado con las células transfectadas con los complejos; pero cuando se utilizó lipofectamina con 10 $\mu$ g de ADN

plasmídico todas las células fueron transfectadas; para el caso las células BMK-16/myc los valores de transfección obtenidos fueron similares a los obtenidos con quitosano de mediano peso molecular al 0.50%. La línea celular SiHa presentó mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa al ser transfectada con quitosano de bajo peso molecular al 0.50% y 10 $\mu$ g de pADN comparado con los obtenidos con lipofectamina.

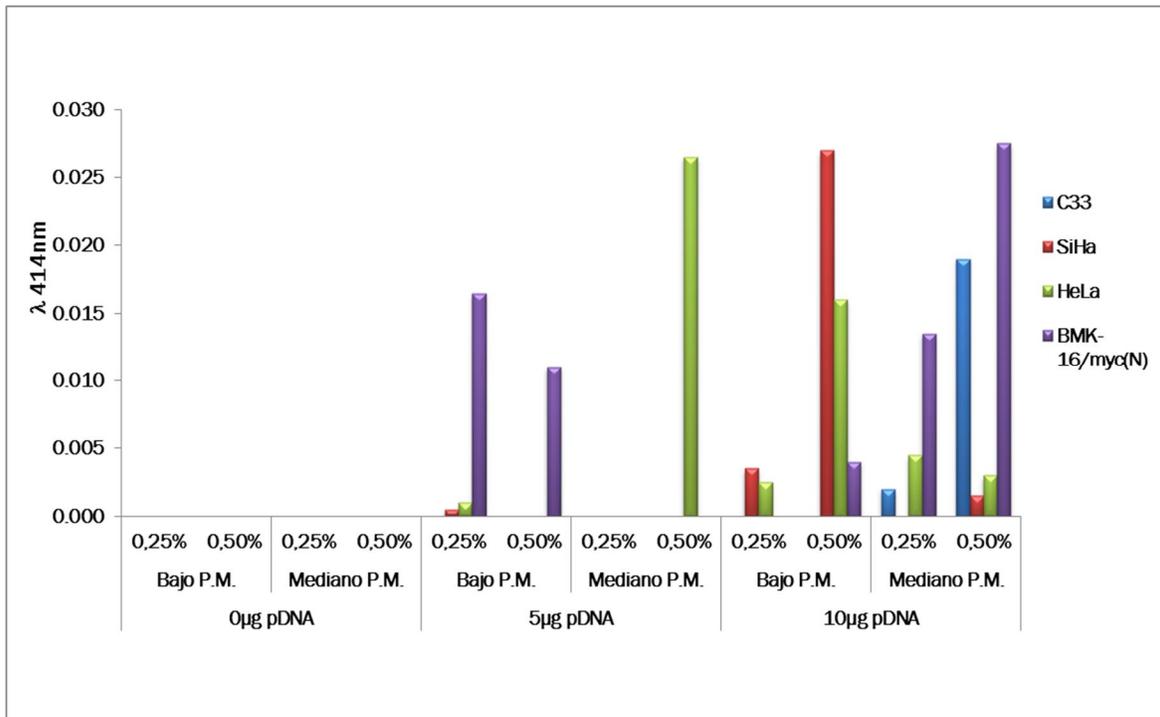


Figura 21. **Eficiencia de la transfección de los complejos quitosano/pADN.** Se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa como reportero de la eficiencia de transfección.

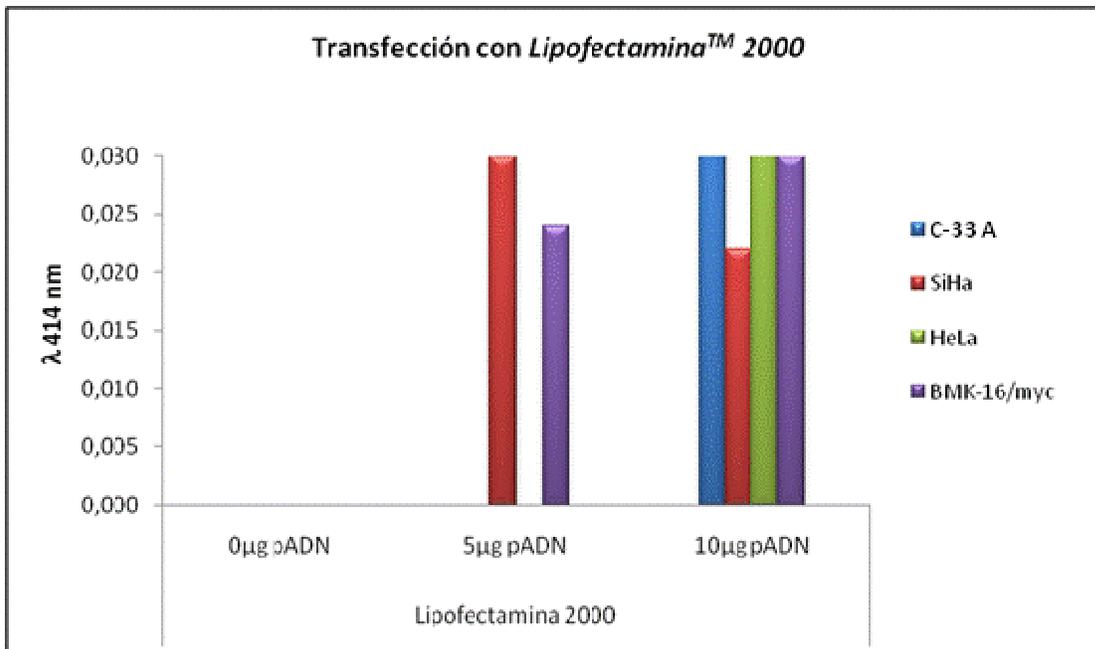


Figura 22. **Eficiencia de transfección usando Lipofectamina™ 2000.** Se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa como reportero de la eficiencia de transfección.

### 5.6 Biocompatibilidad de los complejos quitosano/pADN.

Para evaluar la biocompatibilidad de los complejos quitosano/pADN, se realizaron transfecciones de las líneas celulares SiHa, HeLa, C-33 A y BMK-16/myc bajo las condiciones de transfección previamente descritas. Una vez realizada la transfección se midió la proliferación celular mediante un ensayo de MTT después de 48 horas; donde la proliferación celular está inversamente relacionada con la toxicidad celular. Adicionalmente se realizó la transfección de las líneas celulares utilizando Lipofectamina™ 2000 con la finalidad de comparar el efecto citotóxico del vehículo de transfección utilizado.

La figura 23 muestra el efecto del quitosano sobre la proliferación celular. Las líneas celulares transfectadas únicamente con quitosano de bajo y mediano peso molecular no afectaron la proliferación celular después de 48 horas, de igual manera cuando la transfección fue realizada con los complejos tampoco se

observó afectación en la proliferación celular, independientemente de la concentración de quitosano o de pADN utilizado.

Por otro lado, cuando las células fueron transfectadas con *lipofectamina*<sup>TM</sup>2000 (Figura 24), se observó que la proliferación celular disminuyó considerablemente comparada con las células sin tratar. La disminución en la proliferación celular se observó en todas las líneas celulares evaluadas, sin embargo la mayor afectación se observó en las células C-33 A independientemente de la formulación probada. En este sentido se determinó que la *lipofectamina*<sup>TM</sup>2000 es altamente tóxica para las líneas celulares evaluadas y además la afectación es mayor cuando se administran conjugados *lipofectamina*<sup>TM</sup>2000/pADN, mientras que la proliferación celular no se ve afectada por la administración de quitosano, ni por los complejos quitosano/pADN, lo que demuestra que el quitosano no es tóxico para las líneas celulares SiHa, HeLa, C-33 A y BMK-16/myc y puede ser utilizado como vehículo para la liberación génica en esas líneas celulares.

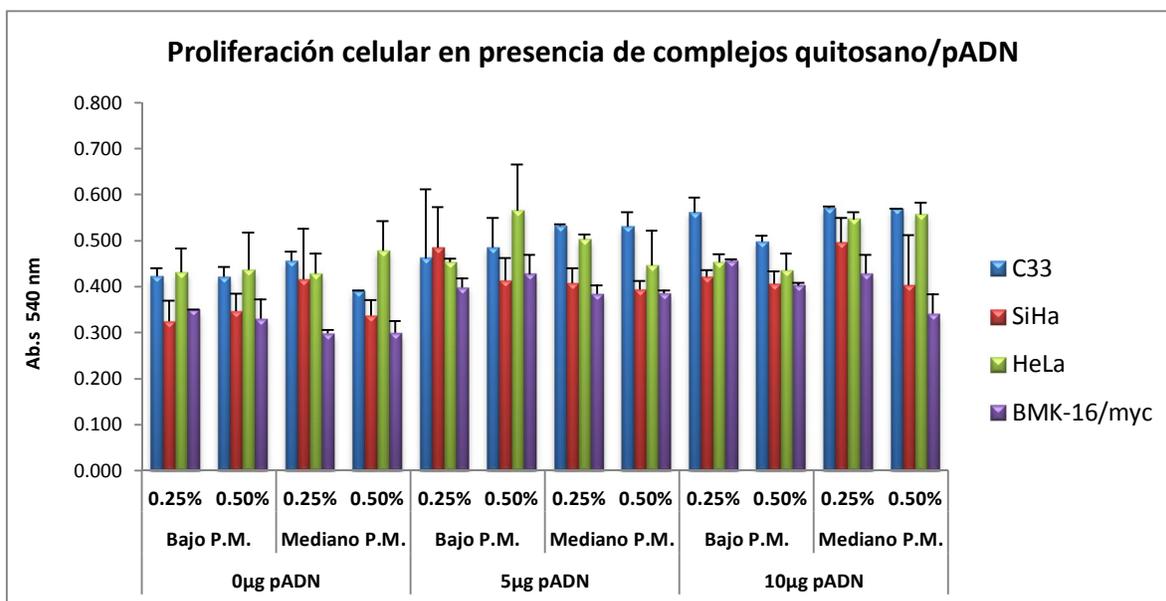


Figura 23. **Evaluación de la citotoxicidad asociada a complejos quitosano/pADN.** Cada valor de la figura esta representado como la media de la desviación estándar ( $\pm$  SD),  $n=3$ .

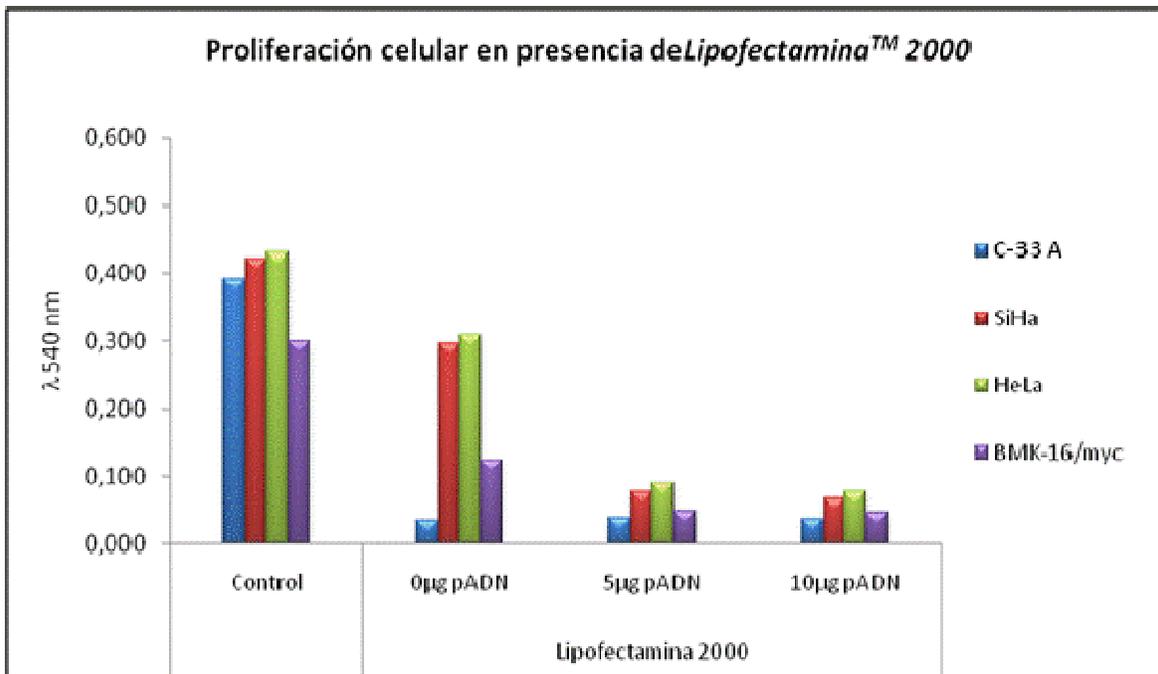


Figura 24. Evaluación de la citotoxicidad asociada a *Lipofectamina™ 2000*.

### 5.7 Biodegradación *in vivo* de los complejos quitosano/pADN.

Para determinar si el quitosano y los complejos quitosano/pADN pueden ser biodegradados *in vivo*. Ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad fueron inyectadas en el dorso por vía subcutánea con agua destilada estéril, quitosano de bajo peso molecular al 0.50% resuspendido en agua a pH 7.1, sulfato de sodio al 20% y complejos quitosano/pcDNA3 en un volumen final de 30 µl cada uno. Los complejos quitosano/pcDNA3 fueron preparados con quitosano de bajo peso molecular al 0.50% + 25 µg del plásmido pcDNA3. Una vez que las formulaciones fueron inyectadas en el modelo de estudio, se generó una protuberancia que fue medida utilizando un vernier electrónico, evaluando la variación en su volumen durante un período de 15 días.

Adicionalmente otro grupo de ratones tratados bajo las mismas condiciones de estudio, fueron sacrificados al día 15 con el fin de evaluar la presencia o ausencia de los complejos en el modelo *in vivo*. La determinación de su

degradación se realizó por electroforesis mediante un ensayo de retardación en gel.

La figura 25 muestra el volumen de las protuberancias generadas por la inyección subcutánea del quitosano y de los complejos quitosano/pADN. Las ratonas inyectadas con agua destilada y sulfato de sodio al 20% no pudieron ser medidas, debido a que las formulaciones fueron absorbidas y no se generó la protuberancia. Sin embargo las ratonas inyectadas con quitosano presentaron una protuberancia de aproximadamente  $105 \text{ mm}^3$ ; misma que comenzó a disminuir de manera constante a partir del día 2 hasta alcanzar un volumen aproximado de  $10 \text{ mm}^3$  después de 15 días de medición. Por otro lado, cuando los complejos fueron inyectados en el dorso de las ratonas; generaron una protuberancia de alrededor de  $120 \text{ mm}^3$ , sin embargo a partir del día 2 se observó un aumento en su diámetro alcanzando un volumen de cerca de  $170 \text{ mm}^3$ . Posteriormente al aumento del volumen en la protuberancia se observó una disminución constante hasta alcanzar un volumen aproximado de  $10 \text{ mm}^3$  después de 15 días de seguimiento.

Adicionalmente, los complejos fueron identificados en las protuberancias generadas en las ratonas después de 15 de su inyección. En la figura 26, se observan mediante electroforesis en gel los complejos generados previos a su inyección (línea 2); mientras que en la línea 3 se muestra la formulación de quitosano de bajo peso molecular al 0.50% inyectada en las ratonas. A pesar de que dicha formulación generó una protuberancia en las ratonas, en el gel no se pudo determinar debido a la ausencia de pADN. La líneas 5 muestra las protuberancias generadas en las ratonas al ser inoculadas con quitosano vacío, mientras que la línea 6 muestra los complejos quitosano/pcDNA3 presentes en las protuberancias generadas en las ratonas a los 15 días de su inoculación.

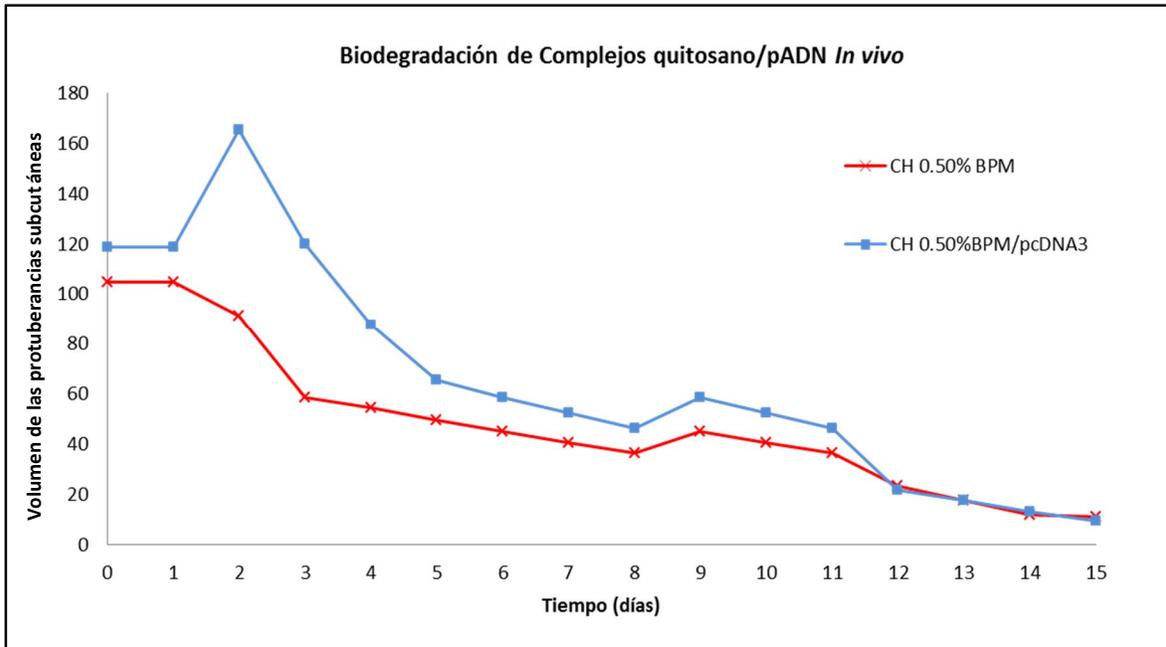
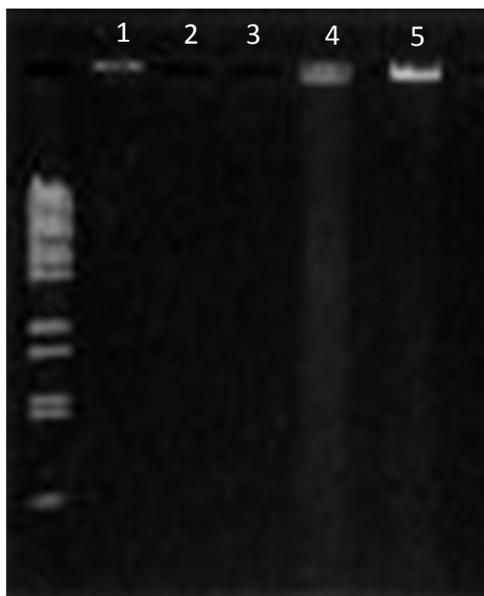


Figura 25. Biodegradación de los complejos quitosano/pADN *in vivo*.



\*Agarosa 1%, TBE 1X, 100v/1hr.

Figura 26. Identificación de los complejos quitosano/pcDNA3 en el modelo *in vivo*.

La figura 27, muestra el tejido subcutáneo de las ratonas tratadas con el quitosano y con los complejos quitosano/pcDNA3 después de 15 días de su inoculación. La ratona número 1 al ser inyectada con el quitosano de bajo peso molecular al 50%, mostró una protuberancia en una estructura aparentemente encapsulada y de manera uniforme, sin embargo las ratonas 2 y 3 presentaron una aparente invaginación o degradación total del polímero. Interesantemente las ratonas tratadas con los complejos quitosano/pcDNA3, presentaron una aparente invaginación (2 y 3), mientras que en la muestra 3 no se observó el encapsulamiento uniforme, además el tamaño de la protuberancia fue menor que la observada en la muestra número 1 de las ratonas inyectadas solo con quitosano.

Los resultados anteriormente descritos permitieron demostrar que tanto el quitosano como los complejos quitosano/pADN pueden ser biodegradados al ser administrados en un modelo de estudio *in vivo*.

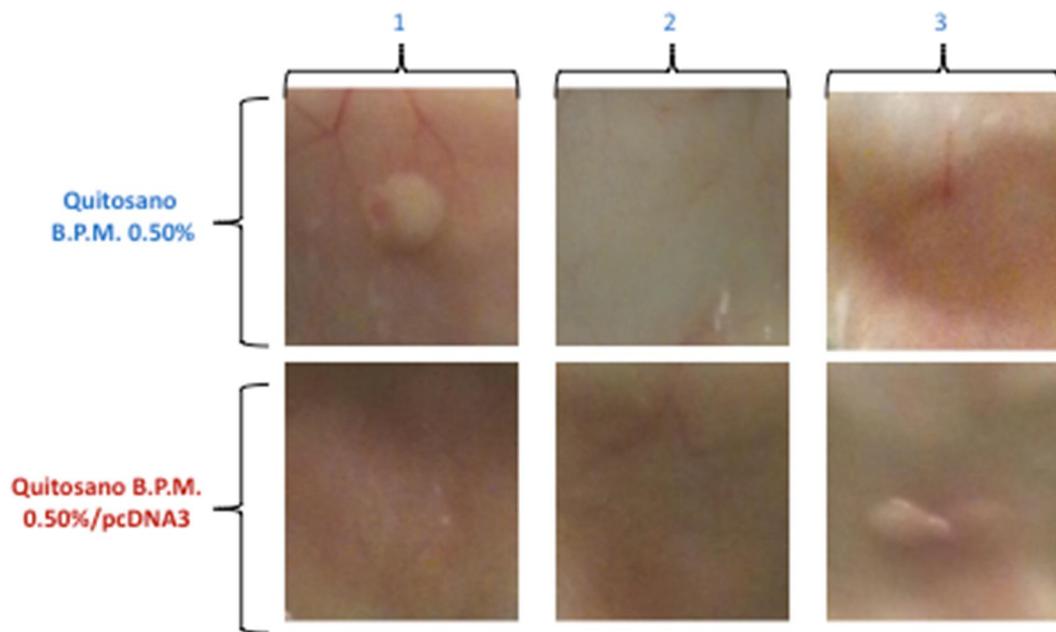


Figura 27. Biodegradación del Quitosano 15 días después de su aplicación en ratones hembra Balb/c.

## **5.8 Evaluación del crecimiento tumoral *in vivo* por efecto de los complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12.**

La determinación del potencial terapéutico de los complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12 se evaluó mediante la inhibición o disminución del crecimiento tumoral. De manera inicial, se generó el modelo tumoral murino de acuerdo a la metodología previamente descrita. Una vez que las ratonas alcanzaron el volumen tumoral requerido (20 a 30 mm<sup>3</sup>), fueron inyectadas por vía intratumoral con los complejos quitosano/pcDNA3 y quitosano/pNGVL3-mIL-12. El crecimiento tumoral fue monitoreado durante un período de 30 días.

La figura 27 muestra la inhibición del crecimiento tumoral por la inyección de los complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12, la administración de una dosis única de los complejos formulados con quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 0.50% con 25 µg de ADN plasmídico, confiere inhibición en el crecimiento tumoral hasta 14 días después de la administración. Sin embargo después de los 14 días de contención en el crecimiento tumoral, se observó un aumento gradual en el tamaño del tumor; no obstante dicho crecimiento es aproximadamente un 30 y 40% menor comparado con el volumen tumoral alcanzado por los ratones tratados con los complejos quitosano/pcDNA3 y los ratones que no recibieron tratamiento. Estos resultados muestran un claro efecto de la inhibición tumoral por los complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12, y confirman la propiedad antitumoral de la IL-12.

Adicionalmente se evaluó en el modelo tumoral murino el efecto del quitosano con PBS. Al inicio del seguimiento se observó un crecimiento en el volumen tumoral durante los primeros 3 días. Sin embargo después se observó una división en el tumor, manteniéndose como 2 tumores independientes por lo que su medición fue compleja.

Por otro lado, durante el tiempo de seguimiento del crecimiento tumoral se evaluó el tiempo de supervivencia de los ratones. Al día 30, los ratones que fueron tratados con los complejos quitosano/pcDNA3 y los que no recibieron tratamiento presentaron un crecimiento tumoral excesivo por lo que fueron sacrificados; en

contraste los ratones que fueron tratados con los complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12 se mantuvieron hasta los 60 días y posteriormente fueron sacrificados, sin embargo durante este período ninguno de los ratones alcanzó el volumen tumoral ni presento las mismas manifestaciones que los ratones control.

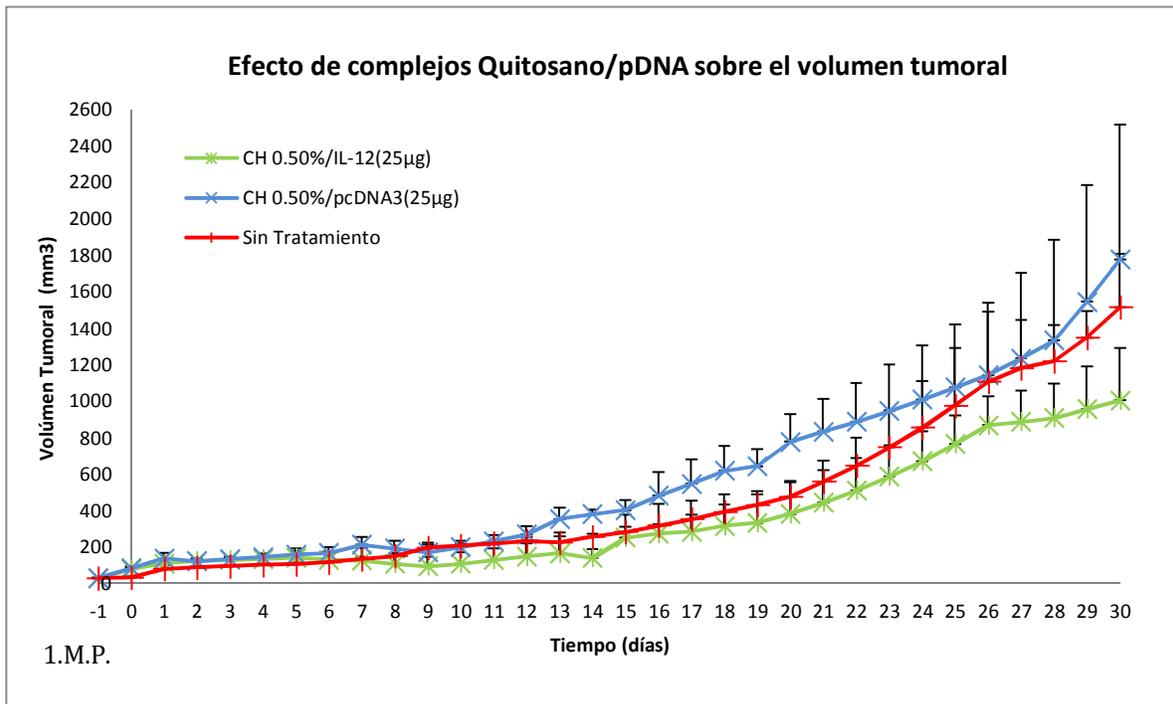


Figura 28. **Inhibición del crecimiento tumoral por la inyección de los complejos quitosano/pNGVL3-mIL-12.** Cada valor de la figura esta representado como la media de la desviación estándar ( $\pm$  SD),  $n=3$ .

## CAPITULO 6 DISCUSIÓN

El cáncer cervicouterino representa un importante problema de salud pública en México y en el mundo, y aunque se utilizan diversas estrategias terapéuticas, éstas no han incidido de manera importante en la disminución del problema, para ello se están evaluando nuevas moléculas con potencial terapéutico como la interleucina 12 (IL-12), que ha demostrado ser un potente inductor de la inmunidad antitumoral, sin embargo es necesario desarrollar biomateriales para su transporte. El quitosano, es un polímero biodegradable cuyas propiedades fisicoquímicas y de biocompatibilidad, han permitido utilizarlo como acarreador de genes en terapia génica no viral, en este sentido, nuestra propuesta fue generar complejos quitosano-pNGVL3-mIL-12 para la liberación del gen IL-12 en un modelo tumoral murino como estrategia terapéutica contra el CaCu.

La prueba de concepto se desarrolló en un modelo *in vitro* utilizando las líneas celulares HeLa, SiHa, C33-A y BMK-16/myc transfectadas con los complejos quitosano-pNGVL3-mIL-12 previamente caracterizados.

Los complejos fueron obtenidos mediante el método de coacervación y fueron examinados en función de su eficiencia de encapsulamiento, estabilidad, degradación por efecto del pH y peso molecular del quitosano, biocompatibilidad y biodegradación *in vivo*.

Nuestros resultados demostraron que la eficiencia de encapsulamiento de los complejos incrementa conforme aumenta el peso molecular del quitosano, además para el caso del quitosano de alto peso molecular el aumento en su concentración también favorece su capacidad de encapsulamiento, sin embargo su viscosidad aumenta lo que complica su manipulación y posterior administración. Adicionalmente se comprobó que el peso molecular del plásmido y su concentración influye en la eficiencia de encapsulamiento, los resultados mostraron que a mayor peso molecular de los plásmidos, disminuye la eficiencia de encapsulación. Los valores de retención del ADN plasmídico por el quitosano de bajo y mediano peso molecular oscila entre el 89 y 92%, mientras que al utilizar quitosano de alto peso molecular el porcentaje de encapsulamiento es de alrededor del 96%, nuestros datos mostraron una mayor eficiencia de encapsulamiento que los reportados por Dastan y Turan en el 2004 [334], y que

fueron realizados bajo la misma metodología, sin embargo en nuestras formulaciones el tiempo de la dilución del quitosano en ácido acético al 2% fue mayor; lo cual podría estar relacionado con un aumento en la protonación de los grupos amino del quitosano [335], provocando un aumento en su densidad de carga positiva y provocando una mayor interacción con las cargas negativas del ADN, lo cual favorece la generación de los complejos. Estos resultados sugieren que el tipo y proporción de quitosano-ADN usado en la formulación de los complejos es fundamental para una buena eficiencia de encapsulamiento.

Por otro lado, durante el proceso de generación de los complejos; el quitosano es diluido en ácido acético al 2%, mientras que el pADN en sulfato de sodio al 20%; lo cual favorece la formación de las interacciones electrostáticas necesarias para la generación de los complejos por el método de coacervación. Una vez que los complejos fueron obtenidos, se sometieron a lavados con agua desionizada y centrifugación con la finalidad de eliminar las soluciones empleadas en su formulación; dichos procedimientos podría afectar la estructura de los complejos o afectar a las biomoléculas empleadas (quitosano y/o ADN). Nuestros resultados demostraron mediante un análisis electroforético que tanto el ADN plasmídico como los complejos, se mantienen intactos después del proceso realizado para su obtención. El perfil electroforético demostró la generación de los complejos y su integridad de acuerdo a lo reportado por Ishi y colaboradores en 2001 [45], y presentan también el mismo comportamiento que el reportado para la obtención de nanopartículas de quitosano [336]. Dicha propuesta se basa en la afectación de la movilidad electroforética del ADN, debido al cambio en la carga eléctrica neta alcanzada durante la generación de los complejos [337-338]. Adicionalmente, el número de copias de ADN es uno de los factores más importantes que afectan el nivel de expresión en estrategias de terapia génica no viral. Estudios previos [205] demostraron que los complejos quitosano/ADN pueden prevenir la degradación del ADN de las nucleasas, en este sentido; mediante un análisis electroforético pudimos determinar la capacidad del quitosano utilizado en la formulación de nuestros complejos para proteger los plásmidos utilizados de su degradación enzimática por la DNAsa I, lo cual proporciona un método que favorece la biodisponibilidad de ADN plasmídico para su aplicación *in vivo*.

Con el objeto de determinar las condiciones del medio, que favorecieran el mantenimiento y/o degradación de los complejos, se formularon soluciones de PBS a distintos valores de pH. Los complejos fueron incubados en dichas soluciones y se determinó el perfil de liberación del plásmido, además del efecto de la temperatura durante el tiempo de almacenamiento de los complejos. De acuerdo a nuestros resultados, los complejos incubados en soluciones ácidas son degradados más rápidamente que los complejos incubados en soluciones a pH neutro. Con lo anterior podemos proponer que si se busca una liberación rápida del ADN encapsulado, el medio en el cual se encuentren los complejos, (ya sea inducido o propio del sistema biológico) deberá ser ácido, principalmente al trabajar con formulaciones realizadas con quitosano de bajo y mediano peso molecular a bajas concentraciones. Nuestros resultados permiten establecer que al incubar los complejos a pH 5, 6 y 6.5 la liberación del plásmido se inicia durante las primeras horas y se mantiene de manera sostenida hasta las 72, alcanzando una liberación máxima de aproximadamente un 80% a pH 5, en contraste con los complejos incubados a pH 6.8 y 7.1 donde el perfil de liberación del plásmido se observa a partir de las 24 horas, alcanzando un máximo de aproximadamente el 20% a las 72 horas a pH 7.1 en agitación constante. Lo anterior aporta datos relevantes relacionados con el sitio biológico de aplicación de los complejos, pues en el caso del cáncer cervicouterino el ambiente del cérvix presenta un pH de 5, lo cual podría favorecer la liberación rápida del ADN encapsulado en los complejos; además si se realizan combinaciones en cuanto al peso molecular y concentración del quitosano de los complejos, se podría generar un perfil de liberación continua y sostenida desde las primeras horas de su aplicación hasta diversos días.

En este sentido, nuestros resultados permiten determinar que la temperatura de almacenamiento de los complejos no afecta su estabilidad, sin embargo cuando los complejos son almacenados a 3°C su porcentaje de disociación se ve ligeramente disminuido con respecto a los complejos almacenados a temperatura ambiente (~25°C) durante un período de 30 días. Nuestros resultados concuerdan con otros trabajos previamente reportados [337-338], sin embargo las formulaciones no fueron las mismas a las evaluadas en este trabajo. Adicionalmente si se requiere generar complejos que deban ser almacenados a temperaturas más bajas o que requieran ser protegidas de su degradación al pH, es posible recubrir los complejos con compuestos como el alginato [339]. Con estos resultados podemos desarrollar sistemas de liberación génica que no sean afectados por la temperatura de almacenamiento, que sean biológicamente

funcionales durante un cierto período de tiempo y que permitan su transporte y contención bajo ciertas condiciones ambientales.

La eficiencia de transfección de los complejos así como su biocompatibilidad ha sido demostrada en diversas líneas celulares, sin embargo se ha demostrado que la eficiencia de transfección es variable dependiendo del tipo celular transfectado, la formulación de los complejos, el tamaño de las partículas, la adición de moléculas acopladas al polímero y el medio de transfección. La optimización de dichos parámetros favorece la transgénesis de los complejos, aun así la eficiencia de transfección se mantiene por debajo o igual, al compararse con los obtenidos con sistemas comerciales de transfección basados en lípidos, como la lipofectamina. Nuestros resultados de transfección *in vitro*, mostraron que el tipo celular influye en la transfección y su subsiguiente nivel de expresión génica. Las células BMK-16/myc y HeLa fueron transfectadas más eficientemente que las células SiHa y C33 A al utilizar quitosano de bajo y mediano peso molecular al 0.50%, con 5 µg de plásmido; sin embargo al utilizar la misma formulación de quitosano pero con 10 µg de plásmido, los complejos mostraron un nivel de expresión génica similar a los obtenidos por la transfección con lipofectamina. Adicionalmente también evaluamos el nivel de citotoxicidad presente en las células transfectadas. En contraste con las diferencias presentadas en la eficiencia de transfección, nuestros resultados mostraron que independientemente de la formulación de los complejos, la viabilidad celular se mantiene estable después de 48 horas de evaluación, por lo que el nivel de citotoxicidad inherente a los complejos, es nula o baja comparada con el nivel observado en las líneas celulares transfectadas con lipofectamina, nuestros datos concuerdan con diversos estudios previamente realizados en diversas líneas celulares, sin embargo esto no había sido evaluado en la línea celular BMK-16/myc.

Finalmente, se evaluó el efecto antitumoral de los complejos quitosano-pNGVL3-mIL-12, en el modelo murino. Los tumores generados en el dorso de ratones hembra balb/c, fueron tratados por la inyección intratumoral directa de los complejos. La inhibición del crecimiento tumoral se observó de manera transitoria hasta 14 días posteriores al tratamiento al ser comparado con los controles (figura 28). Lo anterior sugiere que los complejos quitosano-pNGVL3-mIL-12 presentan un efecto antitumoral sostenido, que pudiera estar relacionado con su velocidad de biodegradación *in vivo* (figura 27), lo cual favorece la liberación del plásmido y su

posterior expresión del transgen. Eventualmente el efecto antitumoral transitorio, pudiera ser sostenido o aumentado mediante la administración de dosis repetidas del complejo, también podría administrarse una mezcla de complejos que de acuerdo a su formulación presenten una tasa de biodegradación más prolongada (figura 20). Por otro lado, los ratones tratados con los complejos mantuvieron un efecto antitumoral constante que se vio reflejado en el tiempo de sobre vida. Los ratones control fueron sacrificados al día 30 debido al crecimiento tumoral excesivo y a las manifestaciones físicas mostradas, en cambio los ratones tratados, se mantuvieron hasta el día 60 sin haber alcanzado el mismo volumen tumoral. De manera muy particular, existen pocos reportes basados en la administración intratumoral de complejos de quitosano/pADN y quitosano siRNA [329, 339, 340], y además de la eficiencia de los complejos, se ha demostrado que éstos ejercen una actividad adyuvante; caracterizado por la expansión celular en los nódulos linfáticos locales, cambios a nivel de macrófagos y células NK, además de la formación de un depósito de antígeno, por lo que el quitosano podría generar una escenario ideal para la generación y co-estimulación de una respuesta inmune adaptativa. Adicionalmente, los complejos quitosano/pADN podrían considerarse como un adyuvante eficiente al ser administrado por vía parenteral.

El presente trabajo establece la viabilidad de los complejos quitosano-pNGVL3-mIL-12 como un sistema, no tóxico, biodegradable, biodisponible y eficiente para transferencia génica no viral como tratamiento contra el cáncer cervicouterino, sin embargo es necesario desarrollar un modelo de estudio en el cérvix, que permita evaluar de manera directa la actividad antitumoral, así como optimizar las formulaciones de acuerdo a las características bioquímicas del modelo de estudio. Adicionalmente es necesario evaluar si los complejos son capaces de biodegradarse en el sitio del tumor y mantener la actividad biológica de la IL-12 en el sitio del depósito, en este sentido es necesario determinar el perfil de citocinas involucradas en la actividad antitumoral activada por la expresión de la interleucina 12.

## CAPITULO 7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se generaron complejos quitosano/pADN mediante el método de coacervación. Los complejos pueden ser degradados a valores ácidos de pH, favoreciendo la liberación sostenida del ADN plasmídico por períodos de tiempo prolongados en sistemas *in vitro*; además el quitosano es capaz de proteger al ADN de su degradación por las nucleasas. Los complejos presentan una alta eficiencia de transfección y debido a su baja toxicidad son biocompatibles para estudios *in vivo*. El efecto antitumoral mostrado en el modelo tumoral murino, lo ubica como un excelente sistema para la liberación de genes con potencial terapéutico, para el control de neoplasias cervicales de alto grado asociadas a la infección por VPH.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Illum, L., Farraj, N.F., Davis, S.S. (1994) Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharmaceutical Research*; (8)11:1186-1190.
2. Wan, L.S.C., Lim, L.Y. and Soh, B.L. (1994) Drug release from chitosan beads. *S.T.P. Pharma Sciences*; (3)4:195-200.
3. Aspden, T.J.; Illum, L.; Skaugrud. (1995) The absence of chitosan toxicity when applied to nasal mucosa. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* (22) Controlled Release Society, Inc.
4. Dodane, V. and Vilivalam, V.D. (1998) Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT*; (6) 1:246-253.
5. Peniche, C., Elvira, C., San Roman, J. (1998) Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: preparation, characterization and modification by thermal treatment. *Polymer*, (39): 6549-6554.
6. Remuñán-López, C., Portero, A., Vila-Jato, J.L., Alonso, M. J. (1998) Design and evaluation of chitosan/ ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *J. Control. Release*; (55):143-152.
7. Bae, Y. H., Kim, S. W. (1993) Hydrogel delivery systems based on polymer blends, blockcopolymers or interpenetrating networks. *Adv. Drug. Del. Rev.* (11):109-135.
8. Chellat, F., Tabrizian, M., Dumitriu, S., Chornet, E., Rivard, C. H., Yahia, L. (2000) Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. *J. Biomed. Mater. Res.* (53):592-599.
9. Brunda, M. J., Luistro, L., Rumennik, L., Wright, R. B., Dvorozniak, M., Aglione, A., Wigginton, J. M., Wiltrout, R. H., Hendrzak, J. A., Palleroni, A. V. (1996) Antitumor activity of interleukin 12 in preclinical models. *Cancer Chemother Pharmacol*; (38) (Suppl):S16–21.
10. Colombo, M.P., Trinchieri, G. (2002) Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* (13):155–68.

11. Leonard, J.P., Sherman, M.L., Fisher, G.L., (1997) Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood*. (90):2541–8.
12. Organización Mundial de la Salud (2005), *The Impact of Cancer*.
13. Rangel, J.I., Pérez Rendón, M., Rivera, L., Velasco, H., Hernández-Girón, C., (2003) Prevalence of dysplasias and cervical cancer in women in the State of Querétaro (Mexico). *Clinical and Transplantation Oncology*; (5):471.475.
14. Palacio-Mejía, L.S., Rangel-Gómez, G., Hernández-Avila, M., Lazcano-Ponce, M. (2003) Cervical cancer, a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud pública Méx*; (45):315-325.
15. Smith-McCune, K., Kalman, D., Robbins, C., Shivakumar, S., Yuschenkoff, L. and Bishop, J.M. (1999) Intranuclear localization of human papillomavirus 16 E7 during transformation and preferential binding of E7 to the RB family member p130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; (96):6999-7004.
16. Jeon, S. and Lambert, P.F. (1995) Integration of HPV-16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6/E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci*; (92):1654-1658.
17. Siddiqui, M.A., and Perry, C.M. (2006) Vacuna recombinante tetravalente (tipos 6, 11, 16, 18) contra el virus del papiloma humano (Gardasil). *Drugs*; (66):1263-1271.
18. Frazer, I. H. (2004) Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.*; 4(1): 46-55.
19. Mota, F.; Rayment, N.; Chong, S.; Singer, A.; Chain, B. (1999) The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin. Exp. Immunol*; (16): 33-40.
20. Torres-Poveda, K.J., Burguete, A., Bermúdez-Morales, V.H., Madrid-Marina, V. (2008) Human papilloma virus infection and cervical cancer: a public health perspective. *Rev Invest Clin*; 60 (5):414-20.

21. Bermúdez, V.H.; Peralta, O.; Madrid-Marina, V. (2005) Gene therapy with cytokines against cervical cancer. *Salud Pub Mex*; (47): 458-468.
22. Alcocer-Gonzalez, J.M.; Berumen, J.; Tamez-Guerra, R.; Bermudez-Morales, V.; Peralta-Zaragoza, O.; Hernandez-Pando, R.; Moreno, J.; Gariglio, P.; Madrid-Marina, V. (2006) *In vivo* expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral. Immunol*; (19): 481-491.
23. Azar, K.K., Tani, M., Yasuda, H.; Sakai, A.; Inoue, M.; Sasagawa, T. (2004) Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum. Pathol*; (35): 1376-1384.
24. El-Sherif, A.M.; Seth, R.; Tighe, P.J.; Jenkins, D. (2001) Quantitative analysis of IL-10 and IFN- $\gamma$  mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J. Pathol*; (195):179-185.
25. Sharma, A.; Rajappa, M.; Saxena, A.; Sharma, M. (2007) Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. *Int. J. Gynecol. Cancer*; (17): 879-885.
26. Clerici, M.; Merola, M.; Ferrario, E.; Trabattoni, D.; Villa, M.L.; Stefanon, B.; Venzon, D.J.; Shearer, G.M.; de Clerici, E. (1997) Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with HPV infection. *J. Natl. Cancer. Inst*; (89): 245-250.
27. Bais, A.G.; Beckmann, I.; Lindemans, J.; Ewing, P.C.; Meijer, C.J.; Snijders, P.J.; Helmerhorst, T.J. (2005) A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J. Clin. Pathol*; (58): 1096-1010.
28. Stracham, T.; Read, A.P. (2004) New approaches to treating disease. *Human Molecular Genetics*, 616. New York, USA: Garland Publishing.
29. Schiedner, G.; Morral, N.; Parks, R J., Wu, Y.; Koopmans, S. C., Langston, C.; Graham, F. L., Beaudet, A. L., Kochanek, S. (1998) Genomic DNA

- transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet*; (18): 180-183.
30. Felgner, J. H.; Kumar, R., Sridhar, C. N.; Wheeler, C. J.; Yali J.; Border, T. R.; Ramsey, P.; Martin, M. and Felgner, P.L. (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulation. *Jour. Biol. Chem*; (296): 2550-2561.
  31. Wu, G. Y. and Wu, C. H. (1997) Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *Jou. Bio. Chem*; (262): 4429-4432.
  32. Zhang, S.; Xu, Y.; Wang, B.; Qiao, W.; Liu, D.; and Li, Z. (2004) Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J. Control Release*; (100): 165-180.
  33. Templeton, N.S. (2002) Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo. *Bioscience reports*; (22): 283-295.
  34. Hejazi, R. and Amiji, M. (2003) Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *J. controlled Release*; (89): 151-165.
  35. Tengamnuay, P.; Sahamethapat, A.; Sailasuta, A. and Mitra, A.K. (2000) Chitosans as nasal absorption enhancers of peptides: comparison between free amine chitosans and soluble salts. *Int. Jou. Pha*; (197): 53-67
  36. Florea, B.I., Thanou, M.; Junginger, H.E.; Borchard, G. (2006) Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear in vitro/in vivo correlation. *Journal Control Release*; (110):353-361.
  37. Kumar, M.; Kong, X.; Behera, A.K.; Hellermann, G.R.; Lockey, R.F.; Mohapatra, S.S. (2003) Chitosan IFN-gamma-pDNA nanoparticle (CIN) therapy for allergic asthma. *Genetic Vaccines Therapy*; (1): 3.
  38. Zhao, X.; Yu, S.B.; Wu, F.L.; Mao, Z. B.; Yu, C.L. (2006) Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles. *Journal Controlled Release*; (112):2, 223-228.

39. Thanou, M.; Florea, B. I.; Geldof, M.; Junginger, H. E.; Borchard, G. (2002) Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines. *Biomaterials*; (23): 153-159.
40. Corsi, K.; Chellat, F.; Yahia, L.; Fernandes, J. C. (2003) Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials*; (24): 1255-1264.
41. Richardson, S. C.; Kolbe, H. V.; Duncan, R. (1999) Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int. J. Pharm*; (178): 231-243.
42. Köping-Höggård, M.; Vårum, K.M.; Issa, M.; Danielsen, S.; Christensen, B.E. Stokke BT, Artursson P. (2004) Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Ther*; (19) 11:1441-52.
43. Cui, Z. (2005) DNA Vaccine. In non-viral vectors for gene therapy part II; 258-289, California, USA: Elsevier Academic Press.
44. MacLaughlin, F.C.; Mumper, R.J., Wang, J.; Tagliaferri, J.M.; Gill, I.; Hinchcliffe, M., and Rolland, A.P. (1998) Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release*; (56): 259-272.
45. Ishii, T.; Okahata, Y.; Sato, T. (2001) Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta*; (1):51-64.
46. Romoren K.; Pedersen S.; Smistad G.; Evensen O.; Thu B.J. (2003) The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. *International Journal of Pharmaceutics*; (261): 1, 115-127.
47. Kiang, T., Wen J., Lim, H.W, Leong, K.W. (2004) The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterial*; (25): 22, 5293-5301.
48. Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N., Buschmann, M.D. (2006) High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific

- combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*; (27): 4815-4824.
49. Sheu, B.C.; Chang, W.C.; Lin, H.H.; Chow, S.N.; Huang, S.C. (2007) Immune concept of human papillomaviruses and related antigens in local cancer milieu of human cervical neoplasia. *J. Obstet. Gynaecol. Res*, 33, (2), 103-113.
  50. Konya, J.; Dillner, J. (2001) Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv. Cancer Res*, 82, 205-38.
  51. Goncalves, M.A.; Donadi, E.A. (2004) Immune cellular response to HPV: current concepts. *Braz. J. Infect. Dis*, 8, 1-9.
  52. Giannini, S. L., Al-Saleh, W., Piron H. (1998) Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 113, no. 2, pp. 183–189.
  53. Díaz-Benítez, C. E., Navarro-Fuentes, K. R., Flores-Sosa, J. A. (2009) CD3 $\zeta$  expression and T cell proliferation are inhibited by TGF- $\beta$ 1 and IL-10 in cervical cancer patients. *Journal of Clinical Immunology*, vol. 29, no. 4, pp. 532–544.
  54. De Gruijl, T. D., Bontkes, H. J., Peccatori, F. (1999) Expression of CD3- $\zeta$  on T-cells in primary cervical carcinoma and in metastasis-positive and -negative pelvic lymph nodes. *British Journal of Cancer*, vol. 79, no. 7-8, pp. 1127–1132.
  55. Santin, A. D., Ravaggi, A, Bellone, S. (2001) Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressors and DR+ T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology*, vol. 81, no. 3, pp. 424–432.
  56. Sheu, B.C., Lin, R.H., Lien, H.C., Ho, H.N., Hsu, S.M., and Huang, S. C., (2001) Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor- infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 5, pp. 2972–2978.

57. Bermudez-Morales, V. H., Gutiérrez, L. X., Alcocer-González, J. M. Burguete, A. and Madrid-Marina, V., (2008) Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Investigation*, vol. 26, no. 10, pp. 1037–1043.
58. De Gruijl, T. D., Bontkes, H. J., Van den Muysenberg, A. J. C. (1999) Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *European Journal of Cancer*, vol. 35, no. 3, pp. 490–497.
59. Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, Howard, M., and O'Garra A. (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology*, T. R. vol. 147, no. 11, pp. 3815–3822.
60. Shondel, S. M., Helm, C. W., Gercel-Taylor, C., and Taylor D. D. (2007) Differential expression of T-cell CD3-zeta chains in patients with cervical dysplasia before and after treatment. *International Journal of Gynecological Cancer*, vol. 17, no. 6, pp. 1278–1282.
61. Peralta-Zaragoza, O.; Bermúdez-Morales, V.; Gutierrez-Xicotencatl, L.; Alcocer-Gonzalez, J.; Recillas-Targa, F.; Madrid-Marina, V. (2006) E6 and E7 oncoproteins from human papillomavirus type 16 induce activation of human transforming growth factor beta1 promoter throughout Sp1 recognition sequence. *Viral. Immunol*; (19): 468-480.
62. Ibrahim, R.; Frederickson, H.; Parr, A.; Ward, Y.; Moncur, J.; Khleif, S.N.; (2006) Expression of FasL in squamous cell carcinomas of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia and its role in tumor escape mechanism. *Cancer*; (106):1065-1077.
63. Guzmán-Olea, E., Bermúdez-Morales, V.H., Peralta-zaragoza, O., Torres-Poveda, K., and Madrid-Marina, V., (2011) Molecular mechanism and potential targets for blocking HPV-induced lesion development, *Journal of Oncology* 2012, pp. 1-11.
64. Trottier, H. and Franco, E. L., (2006) Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention; *American Journal of Managed Care*, vol. 12, no. 17, pp. S462– S472.

65. Stanley, M., (2006) Immune responses to human papillomavirus, *Vaccine*, vol. 24, no. 1, pp. S16–S22.
66. Bermúdez-Morales, V. H., Peralta-Zaragoza, O., Alcocer-González, J. M., Moreno, J., and Madrid-Marina, V., (2011) IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells, *Molecular Medicine Reports*, vol. 4, no. 2, pp. 369–375.
67. Stern, P., Kitchener, H. C., editors. (2008), *Vaccines for the prevention of cervical cancer*, 81.
68. Lai, M. C., The, B. H., and Tarn, W. Y., (1999) A human papillomavirus E2 transcriptional activator: the interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 17, pp. 11832–11841.
69. He, Z., Wlazlo, A. P., Kowalczyk, D. W. , Cheng, J., Xiang, Z. Q., Giles-davis, W. and Ertl, H.C. (2000) Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. *Virology*; (270):146-161.
70. Chiriva-Internati, M., Lui, Y., Salati, E., Zhou, W., Wang, Z., Grizzi, F., Roman, J.J., Lim, S.H. and Hermonat, P.L. (2002) Efficient generation of cytotoxic T lymphocytes against cervical cancer cells by adeno-associated virus/human papillomavirus type 16 E7 antigen gene transduction into dendritic cells. *Eur. J. Immunol*; (32):30-38.
71. Gao, L., Chain, B., Sinclair, C., Crawford, L., Zhou, J., Morris, J., Zhu, X. and Stauss, H. (1994) Immune response to human papillomavirus type 16 E6 gene in a live vaccinia vectors. *J. Gen. Virol*; (75):157-164.
72. Boursnell, M. E., Rutherford, E., Hickling, J.K., Rollinson, E.A., Munro, A.J., Rolley, N., McLean, C.S., Borysiewicz, L.K., Vousden, K. and Inglis, S.C. (1996) Construction and characterization of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine*; (14):1485-1494.
73. Velders, M.P., McElhiney, S., Cassetti, M.C., Eiben, G.L., Higgins, T., Kovacs, G.R., Elmishad, A.G., Kast, W.M. and Smith, L. R. (2001)

Eradication of established tumors by vaccination with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles delivering human papillomavirus 16 E7 RNA. *Cancer Res*; (61):7861-7867.

74. Reuter, J. D., Vivas-Gonzalez, B. E., Gomez, D., Wilson, J.H., Brandsma, J.L., Greenstone, H.L., Rose, J.K. and Roberts, A. (2002) Intranasal vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing cottontail rabbit's papillomavirus L1 protein provides complete protection against papillomavirus-induced disease. *J. Virol*; (76):8900-8909.
75. Zhao, K.N., Sun, X.Y., Frazer, I. H., Zhou, J. (1998) DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1. *Virology*; (243):482-491.
76. Shi, W., Liu, J., Huang, Y., Qiao, L. (2001) Papillomavirus pseudovirus: a novel vaccine to induce mucosal and systemic cytotoxic T-lymphocytes responses. *J. Virol*; (75):10139-10148.
77. Gunn, G.R., Zubair, A., Peters, C., Pan, Z.K., Wu, T.C., Paterson, Y. (2001) *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papillomavirus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J. Immunol*; (167):6471-6479.
78. Lin, C.W., Lee, J.Y., Tsao, Y.P., Shen, C.P. Lai, H.C., Chen, S.L. (2002) Oral vaccination with recombinant *Listeria monocytogenes* expressing human papillomavirus type 16 E7 can cause tumor growth in mice to regress. *Int. J. Cancer*; 629-637.
79. Revaz, V., Benyacooub, J., Kast, W.M., Schiller, J. T., De Grandi, P., Nardelli-Haefliger, D. (2001) Mucosal vaccination with a recombinant *Salmonella typhimurium* expressing human papillomavirus type 16 (HPV16) L1 virus-like particles (VLPs) or HPV16 VLPs purified from insect cells inhibits the growth of HPV16-expressing tumors cells in mice. *Virology*; 279:354-360.

80. Jabbar, I. A., Fernando, G. J., Saunders, N., Aldovini, A., Young, R., Malcolm, K., Frazer, I. H. (2000) Immune responses induced by BCG recombinant for human papillomavirus L1 and E7 proteins. *Vaccine*; 18:2444-2453.
81. Han, R., Reed, C. A., Cladel, N. M., Christensen, N. D. (1999) Intramuscular injection of plasmid DNA encoding cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6 and E7 induces T cell-mediated but no humoral immune responses in rabbits. *Vaccine*; (17):1558-1566.
82. Shi, W., Bu, P., Liu, J., Polack, A., and Fisher, S. and Qiao, L. (1999) Human papillomavirus type E7 vaccine: mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and antitumor activity. *J Virol*; (73):7877-7881.
83. De Marco, F., Hallez, S., Brulet, J. M., Gesche, F., Marzano, P., Flamini, S., Marcante, M. L. and Venuti, A. (2003) DNA vaccines against HPV-16 E7-expressing tumours cells. *Anticancer Res*; (23):1449-1454.
84. Gately, M. K., Desai, B. B., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Dwyer, C.M., Podlaski, F. J., Familletti, P. C., Sinigaglia, F., Chizzonite, R., Gubler, U., (1991) Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J Immunol*; 147 (3):874-82.
85. Gubler, U., Chua, A. O., Schoenhaut, D. S., Dwyer, C. M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Familletti, P. C., (1991) Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88 (10):4143-7.
86. Trinchieri, G., (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*; 13:251-76.
87. Sieburth, D., Jabs, E.W., Warrington, J.A., Li, X., Lasota, J., LaForgia, S., Kelleher, K., Huebner, K., Wasmuth, J.J., Wolf, S.F. (1992) Assignment of

- genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics*; Sep;14 (1):59-62.
88. Yoshimoto, T., Kojima, K., Funakoshi, T., Endo, Y., Fujita, T., Nariuchi, H. (1996) Molecular cloning and characterization of murine IL-12 genes. *J Immunol*; 156:1082–8.
89. Shirota, H., Sano, K., Hirasawa, N., Terui, T., Ohuchi, K., Hattori, T., Tamura, G. B. (2002) Cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *J Immunol*. 15; 169(2):787-94.
90. D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., (1992) Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med*; 176:1387–98.
91. Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., O'Garra, A. (2002) Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2- biasing ability. *Infect Immun*; 70:3656–64.
92. Rodríguez-Sosa, M., Satoskar, A.R., Calderón, R., Gomez-Garcia, L., Saavedra, R., Bojalil, R., Terrazas, L.I. (2002) Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2- biasing ability. *Infect Immun*; 70:3656–64.
93. Jianguo, L., Shanjin, C., Sunjung, K., Elaine, Y. C., Yoichiro, H., Xiuqin, G., Jimenez, V. and Xiaojing M., (2005) Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr Immunol Rev*. June; 1(2): 119–137.
94. Trinchieri G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. Feb; 3(2):133-46.

95. Song, K. and Prud'homme, G.J. (2000) IL-12 plasmid-enhanced DNA vaccination against carcinoembryonic antigen (CEA) studied in immune gene knockout mice. *Gene Therapy*; (7):1527-1535.
96. Thomas, G.R., Chien, Z., Enamorado, I., Bancroft, C. and Van Waes, C. (2000) IL-12 and IL-2- induced tumor regression in a new murine model of oral squamous-cell carcinoma is promoted by expression of the CD80 co-stimulatory molecule and interferon- $\gamma$ . *Int. J. Cancer*; (86):368-374.
97. Hull, G.W., Mccurdy, M.A., Nasu, Y., Bangma, Y. G., Shimura, S., Lee, H.M., Wang, J., Albani, J., Ebara, S., Sato, T., Timme, T.L. and Thompson, T.C. (2000) Prostate cancer gene therapy: comparison of adenovirus-mediated expression of interleukin 12 with interleukin 12 plus B7-1 for in situ gene therapy and gene-modified cell-based vaccines. *Clin. Cancer Res*; (6):4101-4109.
98. Lui, V.W., He, Y., Falo, L. and Huang, L. (2002) Systemic administration of naked DNA encoding interleukin 12 for the treatment of human papillomavirus DNA-positive tumor. *Hum. Gene Ther*; (13):177-185.
99. He, Y.K., Lui, V.W., Baar, J., Wang, L., Shurin, M., Almonte, C., Watkins, S.C. and Huang, L. (1998) Potentiation of E7 antisense RNA-induced antitumor immunity by co-delivery of IL-12 gene in HPV16 DNA-positive mouse tumor. *Gene Ther*; (5):1462-1471.
100. Ahn, W.S., Bae, S.M., Kim, T.Y., Kim, T.G., Lee, J.M., Namkoong, S.E., Kim, C.K. and Sin, J.I. (2003) A therapy modality using recombinant IL-12 adenovirus plus E7 protein in a human papillomavirus 16 E6/E7-associated cervical cancer animal model. *Hum. Gene Ther*; (14):1389-1399.
101. Janouskova, O., Sima, P. and Kunke, D. (2003) Combined suicide gene and immunostimulatory gene therapy using AAV-mediated gene transfer to HPV-16 transformed mouse cell: decrease oncogenicity and induction of protection. *Int. J. Oncol*; (22):569-577.
102. Mikyskova, R., Indrova, M., Simova, J., Jandlova, T., Bieblova, J., Jinoch, P., Bubenik, J., Vonka, V. (2004) Treatment of minimal residual

- disease after surgery or chemotherapy in mice carrying HPV16-associated tumours: Cytokine and gene therapy with IL-2 and GM-CSF. *Int. J. Oncol*; (24):161-167.
103. Rusconi, S., Ceppi, M. (2000) Vectors for gene delivery. *Gene Therapy for Rheumatoid Arthritis*, Ed, S. Gay; Humana Press 1-23.
  104. Bouragaize, D., Jewell T.R. and Buiser R.G. (2000) Genetic engineering: tools and techniques. *Biotechnology*, 138-169. California, USA: Addison Wesley Longman, Inc.
  105. Evans, C.H. Gouze, E., Gouze, J.N, Robbins, P.D, Ghivizzani, S.C. *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2006) 20 May, Volume 58, (2): 243–258.
  106. Heller, L.C., Ugen, K., Heller, R. (2005) Electroporation for targeted gene transfer. *Expert Opin Drug Deliv*; 2:255-268.
  107. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*; 1:841-845.
  108. Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., McCabe, 1990. D. *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87:9568-9572.
  109. Yang, N.S., Sun, W.H. (1995) Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nat Med*; 1:481-483.
  110. Lawrie, A., Brisken, A.F., Francis, S.E., Cumberland, D.C., Crossman DC, Newman CM. (2000) Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther*;7: 2023-2027.
  111. Liu, F., Song, Y., Liu, D. (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*; 6:1258-1266.
  112. Zhang, G., Budker, V., Wolff, J.A. (1999) High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther*; 10:1735-1737.

113. Neu, M., Fischer, D., Kissel, T. (2005) Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly (ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med*; 7:992-1009.
114. Liu, D., Ren, T., Gao, X. (2003) Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem*; 1307-1315.
115. Huang, L., Hung, M.C., Wagner, E. (1999) *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego, CA: Academic Press.
116. Mahato, R.I., Kim, S.W. (2002) *Pharmaceutical Perspectives of Nucleic Acid- Based Therapeutics*. London, UK: Taylor & Francis.
117. Sakurai, F., Inoue, R., Nishino, Y., Okuda, A., Matsumoto, O., Taga, T., Yanashita, F., Takakura, Y., Hashida, M. (2000). Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid DNA/cationic liposome complexes and subsequent gene expression. *J. Control Release*. 66:255-69.
118. Chen, J., Yang, W.L., Li, G. (2004). Transfection of mEpo gene to intestinal epithelium in vivo mediated by oral delivery of chitosan-DNA nanoparticles. *World J Gastroenterol*, 10:112–16.
119. Kobayashi, N., Kuramoto, T., Yamaoka, K., Hashida, M., Takakura, Y. (2001). Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J. Pharm. Exp Ther*. 297(3):853-60.
120. Ciftci, K., and R. J. Levy. (2001). Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Int. J. Pharm*. 21881-92.
121. Felgner, P. L. and Ringold, G. M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*; 337:387–388.
122. Wiethoff, C.M., Middaugh, C.R. (2003) Barriers to nonviral gene delivery. *J Pharm Sci*. Feb; 92(2):203-17.
123. Xiang, G. Keun-Sik K, and Dexi, L. (2007) *Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next*. *The AAPS Journal*; 9 (1) Article 9: E92-E104.

124. Zauner, A., Bullock, R., Kuta, A.J., Woodward, J., Young, H.F., (1996) Glutamate release and cerebral blood flow after severe human head injury. *Acta Neurochir. Suppl.* 67, 40–44.
125. Leong, K.W., Mao, H.Q., Truong-Le, V.L., (1998) DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J Control Release*, 53:183–93.
126. Takai, T. and Ohmori, H. (1990) DNA transfection of mouse lymphoid cells by the combination of DEAE-dextran-mediated DNA uptake and osmotic shock procedure. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1048, 105-109.
127. Godbey, W. T. Wu, Kenneth K. And. Mikos, Antonios G. (1999) Tracking the intracellular path of poly (ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (96): 5177–5181.
128. Merdan, T., Kopecek, J. & Kissel, T. (2002) Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev*; (54): 715-758.
129. Merdan, T.; Kunath, K.; Fischer, D.; Kopecek, J.; Kissel, T. (2002) Intracellular processing of poly (ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm. Res*; 19, 140–146.
130. Han, S.-O., Mahato, R.I., Sung, Y.K. & Kim, S.W. (2000) Development of biomaterials for gene therapy. *Mol Ther*; (4): 302-317.
131. Bennis, J. M.; Choi, J. S.; Mahato, R. I.; Park, J. S.; Kim, S. W. (2000) pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjug. Chem*, 11, 637–645.
132. Midoux, P.; Monsigny, M. (1999) Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug. Chem*, 10, 406–411
133. Yi, F., Wu, H., Jia, G.L. (2006) Formulation and characterization of poly (D, L lactide co glycolide) nanoparticle containing vascular endothelial growth factor for gene delivery. *J Clin Pharm Ther* 31(1):43-48.
134. Katas, H., Chen, S., Osamuyimen, A.A., Cevher, E., Oya Alpar, H. (2008) Effect of preparative variables on small interfering RNA loaded Poly

- (D, L-lactide-co-glycolide)- chitosan submicron particles prepared by emulsification diffusion method. *J Microencap* 25(8):541-548.
135. Wang, H., Zhao, P., Su, W., Wang, S., Liao, Z., Niu, R., Chang, J. (2010). PLGA/polymeric liposome for targeted drug and gene co-delivery. *Biomaterials* 31(33):8741-8.
136. Katas, H., Cevher, E., Alpar, H.O. (2009). Preparation of polyethyleneimine incorporated poly (d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles by spontaneous emulsion diffusion method for small interfering RNA delivery. *Int J Pharm* 369(1-2):144-154.
137. Kim, J.H., Park, J.S., Yang, H.N., Woo, D.G., Jeon, S.Y., Do, H.J., Lim, H.Y., Kim, J.M., Park, K.H. (2011) The use of biodegradable PLGA nanoparticles to mediate SOX9 gene delivery in human mesenchymal stem cells (hMSCs) and induce chondrogenesis. *Biomaterials* 32(1):268-78.
138. Fay, F., Quinn, D.J., Gilmore, B.F., McCarron, P.A., Scott, C.J. (2010) Gene delivery using dimethyldidodecylammonium bromide-coated PLGA nanoparticles. *Biomaterials* 31(14):4214-4222.
139. Maruyama, K., Iwasaki, F., Takizawa, T., Yanagie, H., Niidome, T., Yamada, E., Ito, T., Koyama, Y. (2004) Novel receptor-mediated gene delivery system comprising plasmid/protamine/sugar-containing polyanion ternary complex. *Biomaterials* 25: 3267-3273.
140. Park, Y.J., Liang, J.F., Ko, K.S., Kim, S.W., Yang, V.C. (2003) Low molecular weight protamine as an efficient and nontoxic gene carrier: in vitro study. *Journal of Gene Medicine* 5: 700-711.
141. Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. (1985) A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polymer J.* 17(1):117-132.
142. Toth, I., Sakthivel, T., Wilderspin, A. F., Bayele, H., Lee, C. A. and Florence, A. T. (1999) Novel cationic lipidic peptide dendrimer vectors-in vitro gene delivery. *STP Pharma Sciences* 9: 93-99.

143. Tang, M.X., Redemann, C.T. and Szoka, F.C. (1996). *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjugate Chemistry* 7: 703-714.
144. Boussif, O., Lezoualc, H.F., Zanta, A.M., Mergny, D.M., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7297–7301.
145. Garnett, M.C. (1999) Gene-delivery systems using cationic polymers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 16: 147-207.
146. Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., Göpferich, A. (2005) Polyethylenimine-based non-viral gene delivery Systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Volume 60, issue 2: 247-266.
147. Kichler, A., Leborgne, C., Coeytaux, E. and Danos, O. (2001). Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *The Journal of Gene Medicine*, vol. 3, no. 2: 135-144.
148. Jeong, J.H., Song, S.H., Lim, D.W., Lee, H., Park, T.G. (2001) DNA transfection using linear poly (ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly (2-ethyl-2- oxazoline). *J Control Release*. 73(2-3):391-399
149. Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsässer, H.P., Kissel, T. (1999). A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* -16(8):1273-1279.
150. Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G. (1999) Poly (ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release* .60(2-3):149-160.
151. Klemm, A. R., Young, D. and Lloyd, J. B. (1998) Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability. *Biochem. Pharmacol.* 56: 41-46.
152. Petersen, H., Fechner, P.M., Martin, A.L., Kunath, K., Stolnik, S., Roberts, C.J., Fischer, D., Davies, M.C., and Kissel, T. (2002). Polyethylenimine-graft-poly (ethylene glycol) copolymers: influence of

- copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug Chem* 13(4):845-854.
153. Mishra, S., Webster, P., Davis, M.E. (2004). PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur J Cell Biolog* 83(3):97-111.
  154. Gabrielson, N.P. and Pack, D.W. (2006). Acetylation of polyethyleneimine enhances gene delivery via weakened polymer/DNA interactions. *Biomacromolecules* 7: 2427-2435.
  155. Jeong, G.J., Byun, H.M., Kim, J.M., Yoon, H., Choi, H.G., Kim, W.K., Kim, S.J., Oh, Y.K. (2007) Biodistribution and tissue expression kinetics of plasmid DNA complexed with polyethylenimines of different molecular weight and structure. *Journal of Controlled Release* 118: 118-125.
  156. Wang, X., Wang, C., Zeng, J., Xu, X., Hwang, P.Y., Yee, W.C., Ng, Y.K. and Wang, S. (2005) Gene transfer to dorsal root ganglia by intrathecal injection: effects on regeneration of peripheral nerves. *Molecular Therapy* 12: 314-320.
  157. Shoshy, M. and Dan, P. (2012) Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. *Chem. Soc. Rev.*41: 2623-2640.
  158. Khan, W., Hosseinkhani, H., Ickowicz, D., Hong, Po-Da., Yu D.S. and Domb, A. J. (2012) Polysaccharide gene transfection agents. *Acta Biomaterialia. Advanced Functional Polymers for Medicine. Volume 8, Issue 12: 4224–4232.*
  159. Oyarzun-Ampuero, F. A., Garcia-Fuentes, M., Torres, D. and Alonso, M. J. (2010) Chitosan-coated lipid nanocarriers for therapeutic applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 20, 259–265.
  160. Bowman, K. and Leong, K. W. (2006) Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *Int.J.Nanomedicine*,1, 117–128.
  161. Muzzarelli, R.A.A. (1973) *Natural chelating polymers*, Pergamon Press, New York, NY, USA, pp. 83.
  162. Roberts, G.A.F. (1992) *Chitin chemistry*, 1st ed. MacMillan, London.

163. Lower, S.E. (1984) Polymers from the Sea Chitin and Chitosan I. *Manufacturing Chemist* 55, 73-75
164. Johnson, E.L., Peniston, Q.P. (1982) Utilization of Shellfish Waste for Chitin, Chitosan Production in *Chemistry and Bio-chemistry of Marine Food Products* (Martin, R.E., Flick, G.J., Hebard, C.E., Ward D.R., eds). pp.415-428, AVI Publishing Co, Westport, CT, USA
165. Kurita, K. (1986) Chemical Modifications of Chitin and Chitosan. *Chitin in Nature and Technology*, (Muzzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C., Gooday, G.W., eds.), pp. 287-293, Plenum Press, New York, USA.
166. Synowiecki, J.; Al-Khateeb, N.A. (2003) Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43: 145–171.
167. Aranaz, I.; Mengíbar, M.; Harris, R.; Paños, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras Á. (2009) Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr. Chem. Biol.* 3: 203–230.
168. Struszczyk, M.H. (2002) Chitin and Chitosan: Part I. Properties and production. *Polimery.* 47: 316–325.
169. Kean, T. and Thanou, M. (2010) Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv. Drug Deliv.Rev.*, 62, 3–11.
170. Muzarelli, R. A. A. (1977) Chitin, Pergamon Press, Oxford.
171. Rigby, G.W. (1936) U.S.Patent 2,040,879.
172. Hamman, J.H. (2010) Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar. Drugs*, 8, 1305–1322.
173. Tharanathan, R.N. and Kittur, F.S. (2003) Chitin—The undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 43:61–87.
174. Brück, W.M, Slater, J.W, and Carney, B.F. (2010) Chitin and chitosan from marine organism in: *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications. C/R/C.* Pp. 11-23.

175. Domard, A. and Domard, M. (2002) Chitosan: structure-properties relationship and biomedical applications, in *Polymeric Biomaterials*. Ed. S. Dumitriu, Dekker, New York.
176. Hejazi, R. and Amiji, M. (2002) Chitosan-based delivery systems: physicochemical properties and pharmaceutical applications, in *Polymeric Biomaterials* (ed. S. Dumitriu), Dekker, New York.
177. Dutta, P.K., Dutta, J. and Tripathi, V. S. (2004) Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *J.Sci.Ind. Res.*, 63, 20–31.
178. Muzzarelli, R.A.A., Tanfani, F., Emanuelli, M. & Mariotti, S. (1982) N-Carboxy-methylidene chitosans and N-carboxymethyl chitosans: Novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate. *Carbohydrate research*. 107: 199 - 214.
179. Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research*. 15(9): 1326-1331.
180. Senel, S. & McClure, S.J. (2004) Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced drug delivery reviews*. 56: 1467-1476.
181. Khan, T.A., Peh, K.K., Ch'ng, H.S. (2002) Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 5: 205-213.
182. Wu, A. C. M., W. A. Bough, E. C. Conrad, and Alden, K. E. (1976) Determination of molecular-weight distribution of chitosan by high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr.* 128:87-99.
183. Suh, J.K., Matthew, H.W. (2000) Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 21(24):2589-98.
184. Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S. (2004) Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm.* 15; 274(1-2):1-33.
185. Flory, P. J., (1967) *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press: Ithaca, New York.

186. Kumar, M. N. V. R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 46:1-27.
187. Kumirska, J., Weinhold, M.X., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., and Stepnowski, P. (2011). Influence of the Chemical Structure and Physicochemical Properties of Chitin- and Chitosan-Based Materials on Their Biomedical Activity en: *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science. InTech. Cap 2. Pp.27.*
188. Cho, Y. W., J. Jang, C. R. Park, and Ko, S. W. (2000). Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules* 1:609-614.
189. Wan, Y., Creber, K.A.M., Peppley, B. and Bui, V.T. (2003). Synthesis, characterization and ionic conductive properties of phosphorylated chitosan membranes. *Macromol. Chem. Physiol.*, 204: 850-858.
190. Singla, A. K. and M. Chawla. (2001) Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects - an update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53:1047-1067.
191. Sorlier, P.; Denuziere, A.; Viton, C.; Domard, A., (2001) Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*; 2 (3), 765-772.
192. Muzzarelli, R. A. A. (1998). Colorimetric determination of chitosan. *Anal. Biochem.* 260:255-257.
193. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M, Arguelles-Monal, W., Desbrieres, J., Rinaudo, M. (2001) An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42: 3569-3580.
194. Krajewska, B. (1991) Chitin and its derivative as supports for immobilization of enzymes. *Acta Biotechnol*, 11: 269–277.
195. Snyman, D., Hamman, J.H., Kotzé, A.F. (2003) Evaluation of the mucoadhesive properties of N-trimethyl chitosan chloride. *Drug Dev Ind Pharm*; 29:61–9.
196. Kim, S.K. and Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr Polym.* 62:357–368.

197. Nystrom, B., Kjoniksen, A.L., Iversen, C. (1999) *Adv Colloid Interface Sci*; 79:81–103.
198. Felt, O., P. Buri, and R. Gurny. (1998) Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24:979-993.
199. Guo, B., Yuan, J. and Gao, Q. (2007). Preparation and characterization of pH sensitive comb-shaped chitosan material for the controlled release of coenzyme A. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 18, 753–757.
200. Kim, S. Y., Cho, S. M., Lee, Y. M. and Kim, S.J. (2000) Thermo-and pH responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide. *J. Appl. Polym. Sci.*, 78, 1381–1391.
201. Novoa-Carballal, R., Riguera, R. and Fernandez-Megia, E. (2012) Chitosan copolymers for biopharmaceuticals, in: *Chitosan-based systems for biopharmaceuticals*. Wiley. Pp. 335.
202. Hirano, S., Seino, H., Akiyama, I. and Nonaka, I. (1990) Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration, in *Progress in Biomedical Polymers* (eds. C.G. Gebelein and R.L. Dunn), Plenum Press, New York.
203. Kumar, M.N.V.R., Muzarelli, R.A.A., Muzarelli, C. (2004) Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.*, 104, 6017–6084.
204. Cunha, T., Teixeira, B., Santos, B., Almeida, M., Dias, G. and Das Neves, J. (2012) Chitosan copolymers for biopharmaceuticals, in: *Chitosan-based systems for biopharmaceuticals*. Wiley. Pp. 75-96.
205. Halim, A.S., Keong, L.C., Zaino, I. I. and Abdul, A.H. (2012) Biocompatibility and biodegradation of chitosan and derivatives, in: *Chitosan-based systems for biopharmaceuticals*. Wiley. Pp. 57-73.
206. Hoemann, C.D., Chenite, A., Sun, J. (2007) Cytocompatible gel formation of chitosan-glycerol phosphate solutions supplemented with hydroxyl ethyl cellulose is due to the presence of glyoxal. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 83, 521–529.

207. Villacis, J., Rice, T. R., Bucci, L. R. (2006) Doshrimp-allergic individuals tolerate shrimp-derived glucosamine? Clin. Exp. Allergy, 36, 1457–1461.
208. Keong, L. C. and Halim, A. S. (2009) *In vitro* in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. Int. J. Mol. Sci., 10, 1300–1313.
209. Lim, C.K., Halim, A.S., Yaacob, N.S. and Ismail, Z. (2010) The *in vitro* biocompatibility of chitosan porous skin regenerating templates (PSRTs) using primary human skin keratinocytes. Toxicol. In Vitro, 24, 721–727.
210. Landegren, U. (1984) Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase: applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. J. Immunol. Methods, 67, 379–388.
211. Mao, S., Shuai, X., Unger, F. (2005). Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly (ethyleneglycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers. Biomaterials, 26, 6343–6356.
212. Kumari, R. and Dutta, P.K. (2010) Physicochemical and biological activity study of genipin-crosslinked chitosan scaffolds prepared by using supercritical carbon dioxide for tissue engineering applications. Int. J. Biol. Macromol., 46, 261–266.
213. Yuan, X., Shah, B.A., Kotadia, N.K. (2010) The development and mechanism studies of cationic chitosan-modified biodegradable PLGA nanoparticles for efficient siRNA drug delivery. Pharm. Res., 27, 1285–1295.
214. Guggi, D., Langoth, N., Hoffer, M.H. (2004) Comparative evaluation of cytotoxicity of a glucosamine-TBA conjugate and a chitosan-TBA conjugate. Int. J. Pharm., 278, 353–360.
215. Lim, C.K., Halim, A.S., Lau, H.Y. (2007) *In vitro* cytotoxicology model of oligo-chitosan and N, O-carboxymethyl chitosan using primary normal human epidermal keratinocytes cultures. J. Appl. Biomater. Biomech., 5, 82–87.

216. Mei, N., Chen, G., Zhou, P. (2005) Biocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffold modified by chitosan: the fibroblasts proliferation in vitro. *J. Biomater. Appl.*, 19, 323–339.
217. Hirano, S. and Noishiki, Y. (1985) The blood compatibility of chitosan and N-acetylchitosans. *J. Biomed. Mater. Res.*, 19, 413–417.
218. Ohe, T. (1996) Antigenotoxic activities of chitin and chitosan as assayed by sister chromatid exchange. *Sci. Total Environ.*, 181, 1–5.
219. Voura, E.B., Jaiswal, J.K., Mattousai, H. and Simon, S.M. (2004) Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med.*, 10, (9):993-8.
220. Hansch, A., Frey, O., Sauner, D. (2004) *In vivo* imaging of experimental arthritis with near-infrared fluorescence. *Arthritis Rheum*; 50, 961–967.
221. Schuster, D. P., Kovacs, A., Garbow, J. and Piwnica-Worms, D. (2004) Recent advances in imaging the lungs of intact small animals. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 30, 129–138.
222. Wilflingseder, P., Propst, A. and Mikuz, G. (1974) Constrictive fibrosis following silicone implants in mammary augmentation. *Eur. J. Plast. Surg.*, 2, 215–229.
223. Jia, Y., Hu, Y., Zhu, Y. (2011) Oligoamines conjugated chitosan derivatives: synthesis, characterization, in vitro and *in vivo* biocompatibility evaluations. *Carbohydr. Polym.*, 83, 1153–1161.
224. Cuero, R. G. (1999) Antimicrobial action of exogenous chitosan, p. 315-333. In: Jollès P. and Muzzarelli R. A. A. (eds.), *Chitin and Chitinases*. Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland.
225. Rhoades, J. and S. Roller. (2000) Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:80-86.
226. Toratani, T., Shoji, T., Ikehara, T., Suzuki, K. and Watanabe, T. (2008) The importance of chitobiase and N-acetylglucosamine (GlcNAc)

- uptake in N,N'-diacetylchitobiose [(GlcNAC)<sub>2</sub>] utilization by *Serratia marcescens* 2170. *Microbiology-Sgm* 154: 1326- 1332.
227. Cote, N., Fleury, A., Dumont-Blanchette, E., Fukamizo, T., Mitsutomi, M. and Brzezinski, R. (2006) Two exo-beta-D-glucosaminidases/exochitosanases from actinomycetes define a new subfamily within family 2 of glycoside hydrolases. *Biochemical Journal* 394 (Pt 3): 675-686.
228. Varum, K. M., Myhr, R. J. N. Hjerde, and O. Smidsrød. (1997) *In vitro* degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydr. Res.* 299:99-101.
229. Kumar, A. B. V., Varadaraj, M. C., Gowda, L. R., and Tharanathan R. N. (2005) Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 391:167-175.
230. Terbojevich, M., Cosani, A. and Muzzarelli, R. A. A. (1996) Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain. *Carbohydrate Polymers* 29(1): 63-68.
231. Kittur, F. S., Kumar, A. B. V. and Tharanathan, R. N. (2003) Low molecular weight chitosans preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization; *Carbohydrate Research* 338(12): 1283-1290.
232. Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., Sukwattanasinitt, M., Pichyangkura, R. and Aiba, S. (2003) Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study of N-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes; *Carbohydrate Polymers* 51(4): 391-395.
233. Kafetzopoulos, D., Martinou, A. and Bouriotis, V. (1993) Bioconversion of Chitin to Chitosan - Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(7): 2564-2568.

234. Alfonso, C., Nuero, O. M., Santamaria, F. and Reyes, F. (1995) Purification of a Heat-Stable Chitin Deacetylase from *Aspergillus nidulans* and Its Role in Cell-Wall Degradation; *Current Microbiology* 30(1): 49-54.
235. Tsigos, I. and Bouriotis, V. (1995) Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*; *Journal of Biological Chemistry* 270(44): 26286-26291.
236. Mitsutomi, M., Ueda, M., Arai, M., Ando, A. and Watanabe, T. (1996) Action Patterns of Microbial Chitinases and Chitosanases on Partially N-Acetylated Chitosan. *Chitin Enzymology*. R. A. A. Muzzarelli. 2: 273-284.
237. Blanchard, J., Park, J. K., Boucher, I. and Brzezinski, R. (2003) Industrial Application of Chitosanases. *Recent Advances in Marine Biotechnology*. M. Fingerman and R. Nagabhushanam. New Orleans, Science Publishers, Inc. 9: 257-277.
238. Ghinet, M. G., Roy, S., Poulin-Laprade, D., Lacombe-Harvey, M. E., Morosoli, R. and Brzezinski, R. (2010) Chitosanase from *Streptomyces coelicolor* A3 (2): biochemical properties and role in protection against antibacterial effect of chitosan; *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* 88(6): 907-916.
239. Tanabe, T., K. Morinaga, T. Fukamizo, and M. Mitsutomi. (2003) Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:354-364.
240. Xia, W. S., Liu, P. and Liu, J. (2008) Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases; *Bioresource Technology* 99(15): 6751-6762.
241. Ike, M., Ko, Y., Yokoyama, K., Sumitani, J. I., Kawaguchi, T., Ogasawara, W., Okada, H. and Morikawa, Y. (2007) Cellobiohydrolase I (Ce17a) from *Trichoderma reesei* has chitosanase activity; *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 47(3-4): 159-163.
242. Sakihama, Y., Adachi, W., Shimizu, S., Sunami, T., Fukazawa, T., Suzuki, M., Yatsunami, R., Nakamura, S. and Takenaka, A. (2004) Crystallization and preliminary X-ray analyses of the active and the inactive forms of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus sp*

- strain K17; Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 60: 2081-2083.
243. Choi, Y. J., Kim, E. J., Piao, Z., Yun, Y. C., and Shin, Y. C. (2004) Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4522-4531.
244. Zume, M., S. Nagae, H. Kawagishi, M. Mitsutomi, and A. Ohtakara. (1992) Action pattern of *Bacillus* sp. No. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56:448-453.
245. Mitsutomi, M., M. Isono, A. Uchiyama, N. Nikaidou, T. Ikegami, and T. Watanabe. (1998) Chitosanase activity of the enzyme previously reported as beta-1,3-1,4-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:2107-2114.
246. Marcotte, E. M., Monzingo, A. F., Ernst, S. R., Brzezinski, R. and Robertus, J. D. (1996) X-ray structure of an anti-fungal chitosanase from *Streptomyces* N174; *Nature Structural Biology* 3(2): 155-162.
247. Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T., Redenbach, M., Ohno, T., Watanabe, T. and Miyashita, K. (1999) High-multiplicity of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3 (2); *Biosci Biotechnol Biochem* 63(4): 710-718.
248. Okajima, S., A. Ando, H. Shinoyama, and T. Fujii. (1994) Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by *Amycolatopsis* sp. CsO-2. *J. Ferment. Bioeng.* 77:617-620.
249. Masson, J.Y., I. Boucher, W. A. Neugebauer, D. Ramotar, and R. Brzezinski. (1995) A new chitosanase gene from a *Nocardioides* sp. is a third member of glycosyl hydrolase family 46. *Microbiology* 141:2629-2635.
250. Cheng, C. Y. and Y. K. Li. (2000) An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32:197-203.
251. Shimosaka, M., M. Kumehara, X.-Y. Zhang, M. Nogawa, and M. Okazaki. (1996) Cloning and characterization of a chitosanase gene from

- the plant pathogenic fungus *Fusarium solani*. J. Ferment. Bioeng. 82:426-431.
252. Shimosaka, M., M. Nogawa, Y. Ohno, and M. Okazaki. (1993) Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. phaseoli: Purification and some properties. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57:231-235.
253. Park, J. K., Shimono, K., Ochiai, N., Shigeru, K., Kurita, M., Ohta, Y., Tanaka, K., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (1999) Purification, characterization, and gene analysis of a chitosanase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001. J. Bacteriol. 181:6642- 6649.
254. Matsuda, Y., Y. Iida, T. Shinogi, K. Kakutani, T. Nonomura, H. Toyoda. 2001. *In vitro* suppression of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* by extracellular chitosanase of *Sphingobacterium multivorum* and cloning of the chitosanase gene *csnSM1*. J. Gen. Plant Pathol. 67:318-324.
255. Onishi, H. and Machida, Y. (1999) Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. Biomaterials; 20, 175–182.
256. Zainol, I., Ghani, S.M., Mastor, A. (2009) Enzymatic degradation study of porous chitosan membrane. Mater. Res. Innov., 13, 316–319.
257. Aiba, S. (1992) Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. Int. J. Biol. Macromol., 14, 225–228.
258. Lee, K. Y., Ha, W. S. and Park, W. H. (1995) Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. Biomaterials, 16, 1211–1216.
259. Mattioli-Belmonte, M., Nicoli-Aldini, N., DeBenedittis, A. (1999) Morphological study of bone regenerating in the presence of 6-oxychitin. Carbohydr. Polym, 40, 23–27.
260. Harish Prashanth, K. V., Lakshman, K., Shamala, T. R. and Tharanathan, R. N. (2005) Biodegradation of chitosan-graft-polymethyl methacrylate film. Int. Biodeter. Biodegr, 56, 115–120.

261. Saito, K., Fujieda, T. and Yoshioka, H. (2006) Feasibility of simple chitosan sheet as drug delivery carrier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 64, 161–166.
262. Pangburn, S.H., Trescony, P.V. and Heller, J. (1982) Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials*, 3, 105–108.
263. Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y. and Nonaka, I. (1988) Bio-compatibility of chitosan by oral and intravenous administrations. *Proceedings of the ACS Division of Polymeric Materials: Science and Engineering*, American Chemical Society, Los Angeles, California.
264. Hirano, S., Iwata, M., Yamanaka, K. (1991) Enhancement of serum lysozyme activity by injecting a mixture of chitosan oligosaccharides intravenously in rabbits. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2623–2625.
265. Vitrexakis, T., Boadi, D.K., Quong, D., Groboillot, A., O'Neill, I., Poncelet, D., Neufeld, R.J., (1995) Microencapsulation of DNA within alginate microspheres and cross-linked chitosan membranes for *in vivo* applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 50, 93–106.
266. Ferrari, F., Bonferoni, C., Rossi, S., Sandri, G. and Caramella, C.M. (2012) Manufacture techniques of chitosan-based microparticles and nanoparticles for biopharmaceuticals, in: *Chitosan-based systems for biopharmaceuticals*. Wiley. Pp. 137-158.
267. Jansson, D. (2010). Development and characterisation of Chitosan-plasmid DNA nanoparticles. Master's Degree Programme in Materials Engineering. Tampere University of Technology. 90.
268. Berthold, A., Cremer, K., Kreuter, J., (1996) Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *J. Control Rel.* 39, 17–25.
269. Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N. and Aminabhavi, T.M. (2004) Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Release*, 100, 5–28.

270. Orienti, I., Aiedeh, K., Gianasi, E., Bertasi, V., Zecchi, V., (1996). Indomethacin loaded chitosan microspheres. Correlation between the erosion process and release kinetics. *J. Microencapsul.* 13, 463–472.
271. Genta, I., Perugini, P., Pavanetto, F., (1998) Different molecular weight chitosan microspheres: influence on drug loading and drug release. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24, 779–784.
272. Pavanetto, F., Perugini, P., Conti, B., Modena, T., Genta, I., (1996) Evaluation of process parameters involved in chitosan microsphere preparation by the o/w/o multiple emulsion method. *J. Microencapsul.* 13, 679–688.
273. Jameela, S.R., Kumary, T.V., Lal, A.V., Jayakrishnan, A. (1998) Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. *J. Control Rel.* 52, 17–24.
274. Kumar, V., Lewis, S.A., Mutalik, S., Shenoy, D.B., Udupa, N., (2002) Biodegradable microspheres of curcumin for treatment of inflammation. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 46, 209–217.
275. Dini, E., Alexandridou, S., Kiparissides, C., (2003) Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications. *J. Microencapsul.* 20, 375–385.
276. Shiraishi, S., Arahira, M., Imai, T., Otagiri, M., (1990) Enhancement of dissolution rates of several drugs by low-molecular weight chitosan and alginate. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 185–187.
277. Al-Helw, A.A., Al-Angary, A.A., Mahrous, G.M., Al-Dardari, M.M., (1998) Preparation and evaluation of sustained release cross-linked chitosan microspheres containing phenobarbitone. *J. Microencapsul.* 15, 373–382.
278. Mumper, R.J., Wang, J., Claspell, J.M. & Rolland, A.P. (1995) Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 22, 178-179.

279. Lee, M., Nah, J.W., Kwon, Y., Koh, J.J., Ko, K.S., Kim, S.W. (2001) Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharm Res*; (4):427-31.
280. Dickerson, R. E., Drew, H. R., Conner, B. N., Wing, R. M., Fratini, A. V. and Kopka, M. L.. (1982) The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* 216: 475- 485.
281. Danielsen, S., Vårum, K.M., Stokke, B.T. (2004) Structural analysis of chitosan mediated DNA condensation by AFM: influence of chitosan molecular parameters. *Biomacromolecules*; May-Jun; 5 (3):928-36.
282. Strand, S.P., Danielsen, S., Christensen, B. E., Vårum, K.M. (2005) Influence of chitosan structure on the formation and stability of DNA-chitosan polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules*, Nov-Dec; 6(6):3357-66.
283. Matulis, D., Rouzina, I., and Bloomfield, V.A. (2000) Thermodynamics of DNA binding and condensation: Isothermal titration calorimetry and electrostatic mechanism; *J Mol Biol*: 296, 1053-1063.
284. Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötz, J., Philipp, B., Seidel, C. and Stscherbina, D. (1994) *Polyelectrolytes formation, characterization and application.* (Hanser/Gardner Publications, Inc., Cincinnati).
285. Bloomfield, V.A. (1997) DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* 44, 269-282.
286. Manning, G.S. (1980) Thermodynamic stability theory for DNA doughnut shapes induced by charge neutralisation. *Biopolymers* 19, 37-59.
287. Hud, N.V., Downing, K.H. & Balhorn, R. A. (1995) Constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3581-3585.
288. Marx, K.A. & Reynolds, T.C. (1982) Spermidine-condensed  $\phi$ X174 DNA cleavage by micrococcal nuclease: torus cleavage model and evidence for unidirectional circumferential DNA wrapping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6484-6488.

289. Maniatis, T., Venable, J.H. and Lerman, J.L.S. (1974) The structure of  $\psi$  DNA. *J Mol Biol* 84, 37-64.
290. Schellman, J.A. & Parthasarathy, N. (1984) X-ray diffraction studies on cation-collapsed DNA. *J Mol Biol* 175, 313-329.
291. Anthonsen, M.W. & Smidsrød, O. (1995) Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring induced <sup>1</sup>H-NMR chemical shifts. *Carbohydr Polym* 26, 303-305.
292. Vårum, K.M. Ottøy, M. H. & Smidsrød, O. (1994) Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: Effect of effect of chemical composition and depolymerisation. *Carbohydr Polym* 25, 65-70.
293. Liu, W. (2005) An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA complexes; *Biomaterials* 2: 2705-2711.
294. Carreno-Gomez, B. & Duncan, R. (1997) Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *Int J Pharm* 148, 231-240.
295. Mao, H.Q., Roy, K., Walsh, S.M., August, J.T. & Leong, K.W. (1996) DNA-chitosan nanospheres for gene delivery. *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 23, 401-402.
296. Gao, S., Chen, J., Xu, X., Ding, Z., Yang, Y.H., Hua, Z. & Zhang, J. (2003) Galactosylated low molecular weight chitosan as DNA carrier for hepatocyte-targeting. *Int J Pharm* 255, 57-68.
297. Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D. (1996) Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12349–12354.
298. Lecocq, M.; Wattiaux-De Coninck, S.; Laurent, N.; Wattiaux, R.; Jadot, M. (2000) Uptake and intracellular fate of polyethylenimine in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 278, 414– 418.
299. Remy-Kristensen, A.; Clamme, J. P.; Vuilleumier, C.; Kuhry J. G.; Mely, Y. (2001) Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta*; 1514, 21–32.

300. Chan, V., Mao, H. Q. and Leong, K. W. (2001) Effect of chitosan molecular weight in gene delivery process. Abstract of papers-American Chemical Society 221st COLL-260.
301. Luo, D.; Saltzman, W. M. (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol*; 18, 33–37.
302. Singh, A. K.; Kasinath, B. S.; Lewis, E. J. (1992) Interaction of polycations with cell-surface negative charges of epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*; 1120, 337–342.
303. Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. (2002) On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: is that the question? *J. Membr. Biol*; 189, 167-179.
304. Eliyahu, H., Barenholz, Y. and Domb, A. J. (2005) Polymers for DNA Delivery. *Molecules*, 10, 34-64.
305. Hafez, I. M.; Maurer, N.; Cullis, P. R. (2001) On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther*; 8, 1188-1196.
306. Xu, Y.; Szoka, F. C. Jr. (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*; 35, 5616-5623.
307. El Ouahabi, A.; Thiry, M.; Pector, V.; Fuks, R.; Ruyschaert, J. M.; Vandenbranden, M. (1997) The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett*; 414, 187-192.
308. Kabanov, A. V. (1999) Taking polycation gene delivery systems from in vitro to in vivo. *Pharm. Sci. Technol. Today*; 2, 365–372.
309. Lechardeur, D.; Sohn, K. J.; Haardt, M.; Joshi, P. B.; Monck, M.; Graham, R. W.; Beatty, B.; Squire, J.; O'Brodivich H.; Lukacs, G. L. (1999) Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther*; 6, 482–497.
310. Brunner, S.; Sauer, T.; Carotta, S.; Cotten, M.; Saltik M.; Wagner, E. (2000) Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther*; 7, 401–407.

311. Talcott B.; Moore, M. S. (1999) Getting across the nuclear pore complex. *Trends Cell Biol*; 9, 312–318.
312. Paine, P. L.; Moore, L. C.; Horowitz, S. B. (1975) Nuclear envelope permeability. *Nature*; 254, 109–114.
313. Collas, P.; Husebye, H.; Alestrom, P. (1996) The nuclear localization sequence of the SV40 T antigen promotes transgene uptake and expression in zebrafish embryo nuclei. *Transgenic Res*; 5, 451–458.
314. Collas, P.; Alestrom, P. (1998) Nuclear localization signals enhance germline transmission of a transgene in zebrafish. *Transgenic Res*; 7, 303–309.
315. Liang, M. R.; Alestrom P.; Collas, P. (2000) Glowing zebrafish: integration, transmission, and expression of a single luciferase transgene promoted by non-covalent DNA-nuclear transport peptide complexes. *Mol. Reprod. Dev*; 55, 8–13.
316. Jreysaty, C., Shi, Q., Wang, H., Qiu, X., Winnik, F. M., Zhang, X., Dai, K., Benderdour, M., and Fernandes, J. C. (2012) Efficient Nonviral Gene Therapy Using Folate-Targeted Chitosan-DNA Nanoparticles In Vitro. *International Scholarly Research Network ISRN Pharmaceutics*; Article ID 369270, 9 pages.
317. De Martimprey, H., Vauthier, C., Malvy, C. and Couvreur, P. (2009) Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: oligonucleotides and siRNA. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 71, 490–504.
318. Philippi, C., Loretz, B., Schaefer, U.F. and Lehr, C.M. (2012) Application of chitosan for anticancer biopharmaceutical delivery; in: *Chitosan-based systems for biopharmaceuticals delivery, targeting and polymer therapeutics*; Wiley. Pp 381-392.
319. Bozkir, A., Saka, O.M. (2004) Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics. *Drug Dev*; 11: 107–112.

320. Akbuga, J. (2004) Plasmid-DNA loaded chitosan microspheres for in vitro IL-2 Expression. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58; 501-507.
321. Özgel, G. and J. Akbuga. (2006) *In vitro* characterization and transfection of IL-2 gene complexes. *International Journal of Pharmaceutics* 315: 44-51.
322. Xu, W. (2004) Intranasal delivery of chitosan-DNA vaccine generates mucosal SIgA and anti-CVB3 protection; *Vaccine* 22: 3603-3612.
323. Zhang, X. (2006) Direct chitosan-mediated gene delivery to the rabbit knee joints in vitro and in vivo; *Biochemical Biophysical Research Communications* 341: 202-208.
324. Guo, T. (2006) Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor- $\beta$ 1 for chondrocytes proliferation." *Biomaterials* 27: 1095-1103.
325. Dass, C. R., Contreras, K. G., Dunstan, D. E. and Choong, P.F.M. (2007) Chitosan microparticles encapsulating PEDF plasmid demonstrate efficacy in an orthotopic metastatic model of osteosarcoma. *Biomaterials*, 28, 3026–3033.
326. Zaharoff, D., Hoffman, B.S., Hooper, H.B., Benjamin, C.J., Khurana, K.K., Hance, K.W., Rogers, C.J., Pinto, P.A., Schlom, J. and Greiner, J.W. (2009) Intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer with chitosan/interleukin-12. *Cancer Res.* 69(15): 6192-6199.
327. Zaharoff, D. A., Hance, K. W., Rogers, C. J., Schlom, J and Greiner, J. (2010) Intratumoral Immunotherapy of Established Solid Tumors with Chitosan/IL-12. *J Immunother.* 33(7): 697–705.
328. Seo, S.H., Han, H.D., Noh, K.H. (2009) Chitosan hydrogel containing GM-CSF and a cancer drug exerts synergistic anti-tumor effects via the induction of CD8 T cell-mediated anti-tumor immunity. *Clin. Exp. Metastasis*, 26, 179–187.
329. Zhang, H., Mardiyani, S., Chan, W.C.W. and Kumacheva, E. (2006) Design of biocompatible chitosan microgels for targeted pH-mediated

- intracellular release of cancer therapeutics. *Biomacromolecules*, 7, 1568–1572.
330. Han, H. D., Mangala, L. S., Lee, J. W. (2010) Targeted gene silencing using RGD labeled chitosan nanoparticles. *Clin. Cancer Res.*, 16, 3910–3922.
331. Nastala, C.L., Edington, H.D., McKinney, T.G., (1994) Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol*; (153):1697–706.
332. Zitvogel, L., Tahara, H., Robbins, P.D., (1995) Cancer immunotherapy of established tumors with IL-12. Effective delivery by genetically engineered fibroblasts. *J Immunol*; (155):1393–403.
333. Salem, M. L., Gillanders, W. E., Kadima, A. N., (2006) Review: novel nonviral delivery approaches for interleukin-12 protein and gene systems: curbing toxicity and enhancing adjuvant activity. *J Interferon Cytokine Res*; (26):593–608.
334. Egilmez, N. K., Kilinc, M. O., Gu, T. Conway, T. F. (2007) Controlled-release particulate cytokine adjuvants for cancer therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*; (7):266–70.
335. Hallez, S., Detremmerie, O., Giannouli, C., Thielemans, K., Gajewski, T.F., Burny, A., Leo, O. (1999) Interleukin-12-secreting human papillomavirus type 16-transformed cells provide potent cancer vaccine that generates E7-directed immunity. *Int J Cancer* 81, 428-437.
336. Dastan, T., and Turan, K, (2004) *In vitro* characterization and delivery of chitosan-DNA microparticles into mammalian cells. *Journal of Pharm. And Pharmaceut Sci.* 7 (2):205-214.
337. Liu, L., Zaikov, G.E. (2006) *Chemistry as art*. Nova science publishers, New York. pp. 321.
338. Centelles, MN; Qiang, C; Campanero, MA. And Irache, JM. (2008). New methodologies to characterize the effectiveness of the gene transfer mediated by DNA-chitosan nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 3(4) 451-460.

339. Tsuchida, E. (1994). Formation of polyelectrolite complex and their structures. *J. Macromol. Sci. Pue Appl. Chem.*, A31, 1-15.
340. Ichikawa, S., Iwamoto, S. and Watanabe, J. (2005). Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hidrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 (9), 1637-1642.
341. Yi, X., Kong, X., Shi, S., Zheng, X., Guo, G., Wei, Y and Qian, Z. (2008). Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. *BMC Biotechnology*. 8:89.
342. Zaharoff, D.A., Rogers, C.J., Hance, K.W. (2007) Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*, 25, 2085-2094.

## ABREVIATURAS

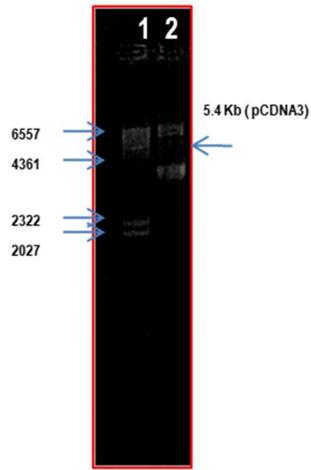
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
$C_6H_{12}O_6$	Glucosa.
$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	Ácido etilendiamino tetraacético
$CaCl_2$	Cloruro de calcio.
$(CH_3)_2CH_2OH$	Isopropanol.
$CH_3CH_2OH$	Etanol.
$CH_3COOH$	Ácido acético.
$CH_3COOK$	Acetato de potasio.
CMV	Citomegalovirus.
$CO_2$	Dióxido de carbono.
cP	CentiPoise.
DMEM	Medio de <i>Dulbecco</i> modificado por <i>Eagle</i>
DNasa	Desoxirribonucleasa.
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético.
FTIR	Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier.
g	Gramo.
h	Hora.
H-RMN	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear.
IL-12	Interlucina 12.
Kb	Kilo base.
KCl	Cloruro de potasio.
kDa	KiloDalton.
$KH_2PO_4$	Fosfato de potasio monobásico.
L	Litro.
LB	Luria Bertani.
$LD_{50}$	Dosis letal media.
M	Molar.
m/v	Masa/volumen
MDa	MegaDalton.

mg	Miligramo.
ml	Mililitro.
mm	Milímetro.
mM	Milimolar.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Sodio.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato ácido de sodio.
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio.
NaCl	Cloruro de sodio.
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
ng	Nanógramo.
nm	Nanómetro.
pADN	ADN plasmídico.
PBS	<i>Buffer</i> salino de fosfatos.
PEG	Polietilenglicol.
PEI	Polietilenimina.
pGauM	Poli-3-guanidopropilmetacrilato.
pH	Potencial de hidrógeno.
pKa	Potencial constante de acidez.
PLL	Poli-L-lisina.
P.M.	Peso molecular.
RLB	<i>Buffer</i> reportero de lisis.
rpm	Revoluciones por minuto.
SBF	Suero bovino fetal.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
UV	Ultravioleta.
v/v	Volumen/volumen.
VPH	Virus del papiloma humano.
β-gal	β-galactosidasa.
μg	Microgramo.

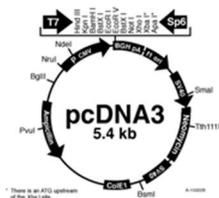
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\Delta\text{pH}$	Diferencial de pH.
$\Delta\text{T}$	Diferencial de temperatura.
$\lambda$	Longitud de onda.
$\%R$	Porcentaje de Retención.

# ANEXO

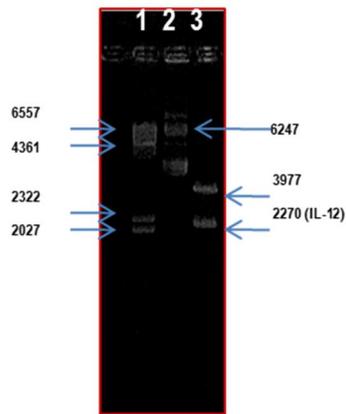
## Caracterización del plásmido pCDNA3



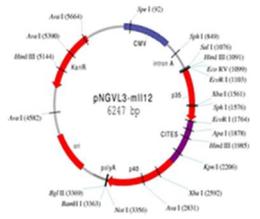
1.- MPM  $\lambda$  Hind III  
2.- Plásmido pCNA3 (5.4 Kb)



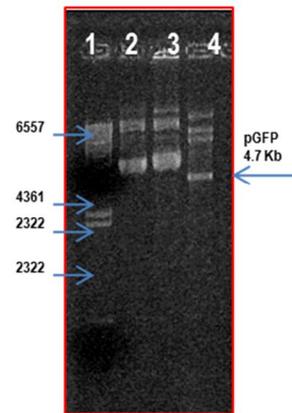
## Caracterización del gen IL-12



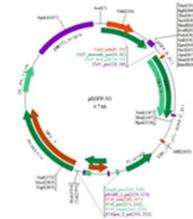
1.- MPM  $\lambda$  Hind III  
2.- Plásmido pCMVmlL-12 sin digerir.  
3.- Plásmido pCMVmlL-12 digerido con Bgl II y Eco RV



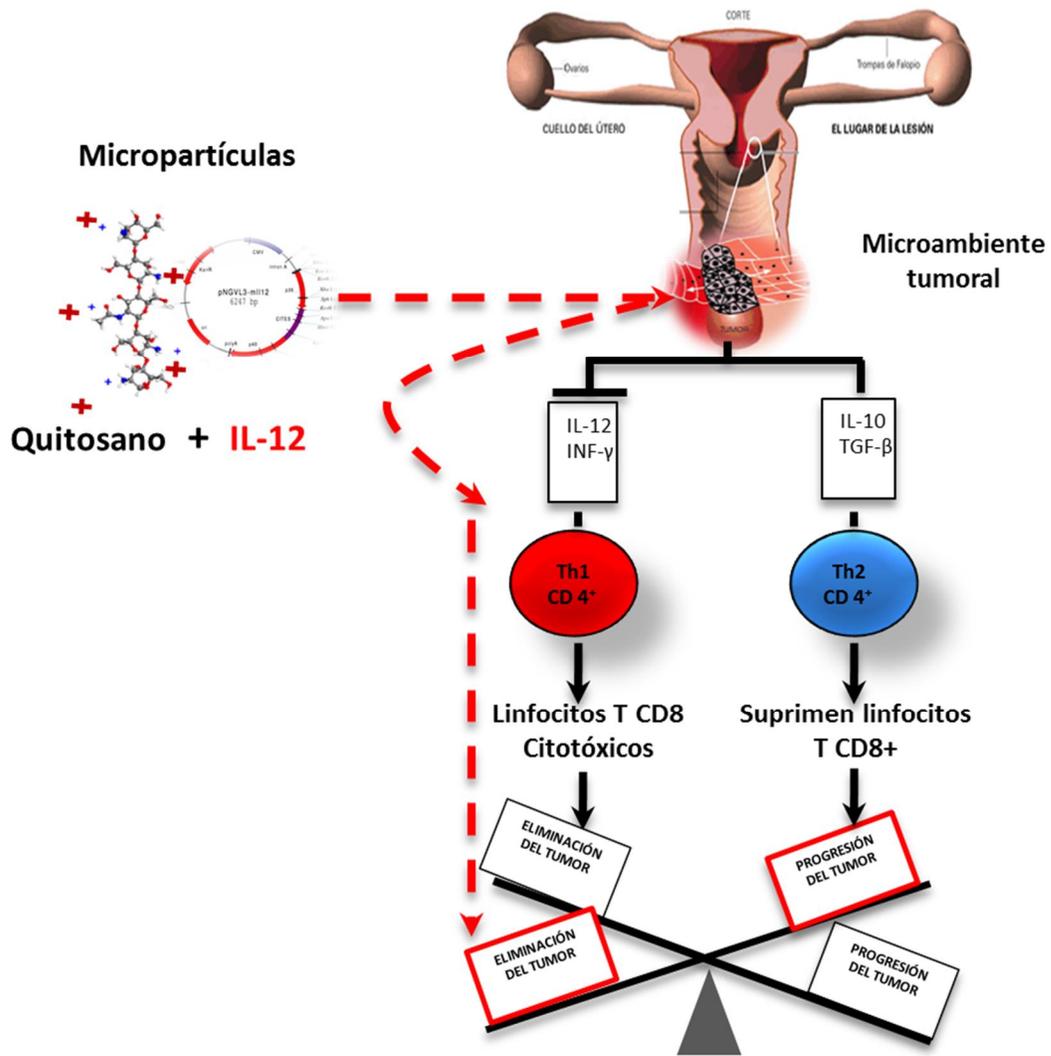
## Caracterización del plásmido pGFP



1.- MPM  $\lambda$  Hind III  
2.- Plásmido pCDNA3  
3.- Plásmido pCMVmlL-12  
4.- Plásmido pGFP

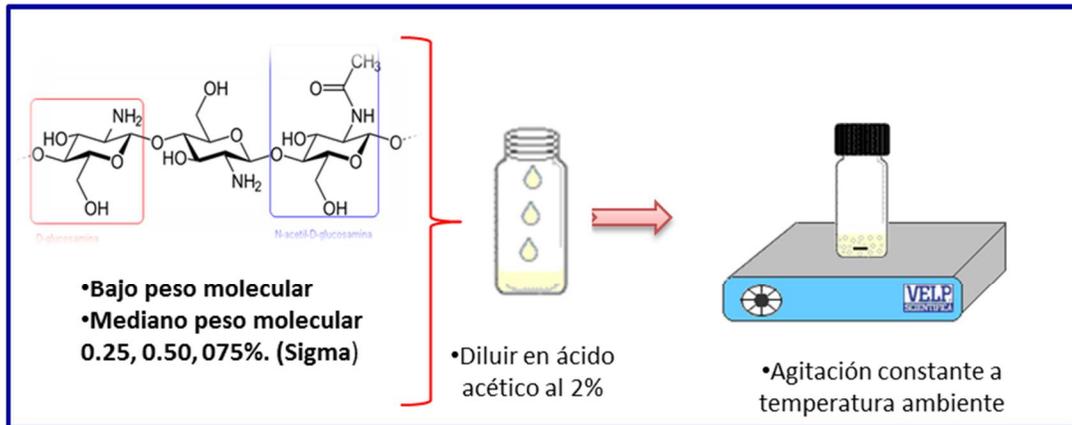


Anexo 1. Caracterización por digestión enzimática de los plásmidos pCDNA3, pNGVL3-mlL-12 y pGFP.

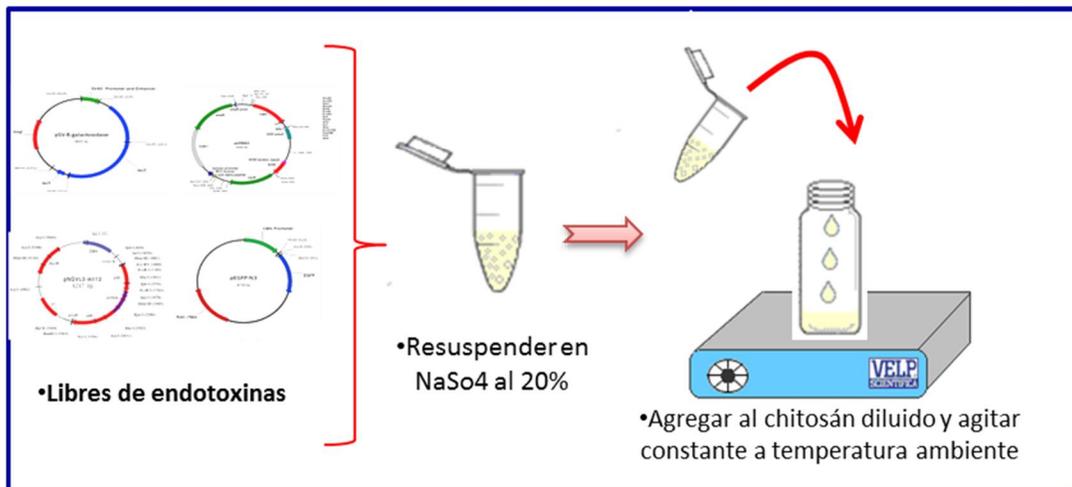


Anexo 2. Esquema general del planteamiento del problema.

### A) Preparación del quitosano

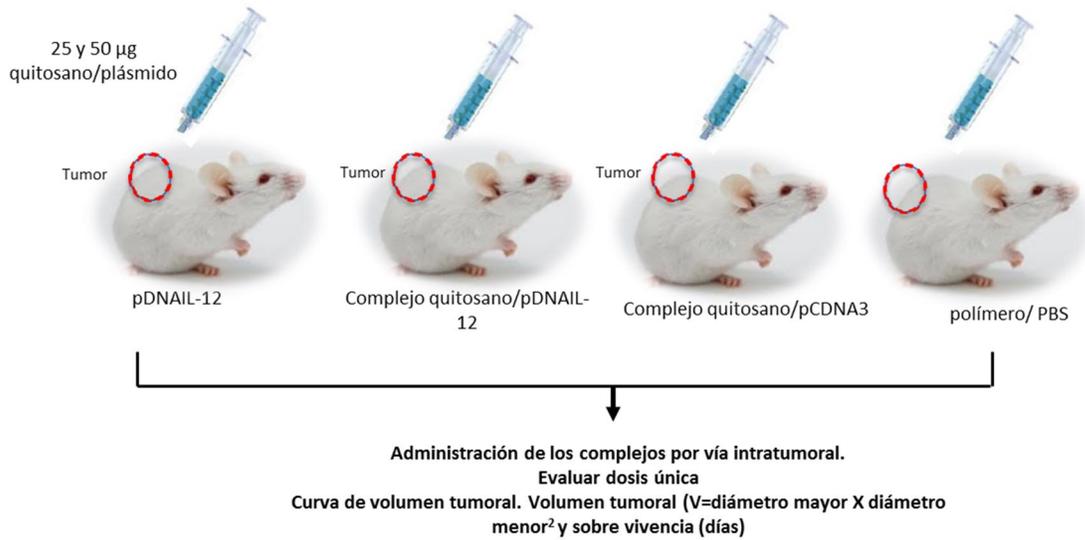


### B) Preparación del plásmido



Anexo 3. Visión general de la preparación de los complejos quitosano/pADN.

Inyección de los complejos polímero/DNA por vía subcutánea



Anexo 4. Esquema general de dosificación de los complejos polímero/pADN.

## **PUBLICACIONES**