

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

EFFECTO ANTITUMORAL DE LA IL-12 EN UN MODELO MURINO
DE CÁNCER CERVICOUTERINO VPH 16 POSITIVO
MEDIANTE MICROPARTÍCULAS DE CHITOSÁN
EN SPRAY CON APLICACIÓN TÓPICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

P R E S E N T A

IBT. FLOR DE MARÍA GARCÍA PAZ

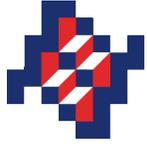
COMITÉ DE TESIS:

DIRECTOR DE TESIS:
M.C. VÍCTOR HUGO BERMÚDEZ MORALES

ASESORES:
DR. OSCAR PERALTA ZARAGOZA
DR. ÁNGEL ROMO URIBE

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2013



Instituto Nacional
de Salud Pública

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Virus y Cáncer, Departamento de Infecciones Crónicas y Cáncer en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, bajo la dirección del Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales.

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que me ayudaron directa e indirectamente en la realización de este trabajo.

Al Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales, gracias Víctor por tu ayuda, tu confianza, tu apoyo y por compartir tus conocimientos conmigo.

Al Dr. Vicente Madrid Marina por abrirme una vez más las puertas de su laboratorio y por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Maribel, Gus, César, Esme, Abrahan y Alex. A Mago, Karla, Alfred y los que faltaron. Gracias por su ayuda, apoyo y por brindarme su amistad.

A mis amigos y compañeros de generación Eli, Oswaldo, Yvette, Sepo, Abraham, Violeta, John, Gloria, Yvonne, Andreu y Grace. Gracias por su amistad y por hacer más ligero el camino. A mi amiga Vianey, gracias por estar siempre en todo momento.

Al Dr. Oscar Peralta y al Dr. Ángel Romo por sus comentarios y sugerencias en este trabajo.

DEDICATORIA

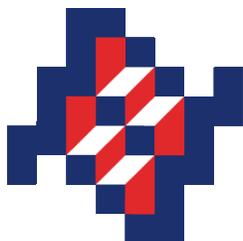
A ese ser tan grande que me da fuerzas día con día y me permite demostrarme de lo que soy capaz, Dios.

A mis padres Víctor y Margarita, y a mis hermanos, Álex y Meche. Gracias por estar siempre a mi lado, por creer en mí y por apoyarme en todos mis sueños. Los amo y quiero compartir mi alegría con ustedes.

A esa personita que ha sido mi motor e inspiración día a día, mi pequeño Emi. Te amo.

A mi gran amigo, consejero, compañero y esposo Daniel. Te amo.

CRÉDITOS



Al Instituto Nacional de Salud Pública por permitirme realizar este trabajo y proporcionar las áreas adecuadas para su realización. Esta tesis fue realizada en el departamento de Infecciones Crónicas y Cáncer del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI), bajo la dirección del Dr. Víctor Bermúdez Morales.



Además, agradezco el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el sistema de becas de posgrado con número de becario 244064. De igual manera, al fondo sectorial de investigación en salud y seguridad social del SSA-IMSS-ISSSTE-CONACYT convocatoria 2008; por el financiamiento otorgado al proyecto del cual se realizó el presente trabajo: “Uso de un polímero biodegradable para la liberación del gen de la IL-12 en un modelo experimental murino VPH positivo como terapia local no invasiva contra el cáncer cervical”, con clave Conacyt-fosis-Salud-2008-C01-87916, el cual está dado de alta en el SIID del INSP.

Así mismo, aprecio mucho la asesoría otorgada por los miembros del comité asesor los cuales me ayudaron a mi formación como profesionista, cuyos nombres son:

Dr. Oscar Peralta Zaragoza
Dr. Ángel Romo Uribe

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA	IV
CRÉDITOS	V
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	5
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO.....	5
FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CÁNCER CERVICOUTERINO.....	6
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CÁNCER CERVICOUTERINO	7
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	8
PATOGENESIS DEL CACU - CICLO VIRAL	9
RESPUESTA INMUNE CONTRA LA INFECCIÓN POR VPH Y CACU.....	11
CITOCINAS Y MICROAMBIENTE TUMORAL	13
INTERLEUCINA 12 (IL-12) Y SUS PROPIEDADES ANTITUMORALES.....	14
VACUNAS CONTRA CACU	16
<i>Vacunas Profilácticas</i>	17
<i>Vacunas Terapéuticas</i>	18
TERAPIA GÉNICA CONTRA CACU	22
POLÍMEROS CATIÓNICOS.....	24
CHITOSÁN.....	24
<i>Fuente</i>	25
<i>Propiedades Físicoquímicas del Chitosán</i>	26
<i>Actividad Biológica</i>	27
APLICACIONES BIOMÉDICAS DEL CHITOSÁN	28
CHITOSÁN COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE DNA.....	28
MODELOS MURINOS DE CACU.....	30
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
PLÁSMIDOS.....	33

CHITOSÁN.....	33
RATONES.....	33
LÍNEA CELULAR Y CULTIVO.....	33
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS.....	34
FORMACIÓN DE COMPLEJOS CHITOSÁN/pDNA.....	34
ENVASADO DE LAS MICROPARTÍCULAS CHITOSÁN/pDNA EN UN SISTEMA DE SPRAY.....	35
DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE MICROPARTÍCULAS EN LA MUCOSA CERVICAL.....	35
DETERMINACIÓN DE LA PERMANENCIA DEL CHITOSÁN.....	35
MODELO MURINO DE CACU.....	36
DETERMINACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE IL-12.....	36
EXTRACCIÓN DE RNA DE RASPADO CERVICOVAGINAL.....	37
SÍNTESIS DE LA CADENA COMPLEMENTARIA DE DNA (CDNA).....	37
RT-PCR TIEMPO REAL PARA LOS ONCOGENES E6/E7.....	37
RESULTADOS.....	39
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS.....	39
FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS CHITOSÁN/pDNA.....	39
ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS CHITOSÁN/pDNA POSTERIOR A SU APLICACIÓN MEDIANTE UNA BOMBA DE SPRAY.....	42
LOCALIZACIÓN CELULAR DEL PDNA Y EL CHITOSÁN.....	42
PERMANENCIA DE CHITOSÁN EN LA REGIÓN CERVICOVAGINAL DE RATONAS.....	48
MODELO MURINO DE CACU.....	52
EFECTO ANTITUMORAL DE IL-12.....	56
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	64
PERSPECTIVAS.....	65
REFERENCIAS.....	66
ANEXOS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino en el mundo.....	5
Figura 2. Factores determinantes del desarrollo del cáncer cervicouterino.....	7
Figura 3. Organización del genoma viral de VPH 16.....	9
Figura 4. Desarrollo del cáncer cervicouterino y expresión de proteínas virales.....	11
Figura 5. Receptor de IL-12 y transducción de señal.....	16
Figura 6. Estructura química del quitosán.....	25
Figura 7. Proceso de desacetilación de la quitina.....	25
Figura 8. Barreras y estrategias de la liberación de ácidos nucleicos.....	29
Figura 9. Purificación de los plásmidos pNGVL3-mIL12 y pcDNA3.....	39
Figura 10. Eficiencia de encapsulamiento de los plásmidos pNGVL3-mIL12, pcDNA3, pcDNA/Cy5 y pcDNA3/Rodamina por quitosán de bajo peso molecular al 0.25%.....	40
Figura 11. Ensayo de retardamiento en gel de los complejos quitosán-rod/pDNA.....	41
Figura 12. Integridad de los complejos quitosán/pDNA posterior al disparo.....	42
Figura 13. Presencia y localización de pDNA y quitosán de micropartículas quitosán/pDNA aplicadas en spray en la región cervicovaginal de ratones.....	44
Figura 14. Presencia y localización celular de pDNA de micropartículas de quitosán/pDNA aplicadas en la región cervicovaginal de ratones.....	45
Figura 15. Localización celular de pDNA de micropartículas de quitosán/pDNA.....	46
Figura 16. Presencia y localización de quitosán de micropartículas quitosán/pDNA aplicadas en la región cervicovaginal de ratones.....	49
Figura 17. Localización celular de quitosán de micropartículas de quitosán/pDNA.....	50
Figura 18. Permanencia de quitosán en la región cervicovaginal de ratones hembra.....	51
Figura 19. Lesión cervicovaginal de ratonas Balb/c cinco días después de la aplicación de células BMK16/myc.....	53
Figura 20. Citología cervicovaginal del modelo murino de CaCU.....	53
Figura 21. Expresión de los oncogenes E6 y E7 en el modelo murino de CaCU.....	54
Figura 22. Biopsias del aparato reproductor de ratonas Balb/c posterior a la generación de modelo de CaCU.....	55
Figura 23. Expresión de los oncogenes E6 y E7 posterior a la aplicación de los complejos quitosán/pDNA(IL-12).....	57

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Tipos de VPH en lesiones genitales.....</i>	<i>8</i>
<i>Tabla 2. Células productoras de IL-12.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabla 3. Comparación de las vacunas profilácticas contra la infección por VPH.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 4. Características de las plataformas utilizadas en el desarrollo de vacunas terapéuticas contra VPH .</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del chitosán.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 6. Aplicaciones biomédicas potenciales del Chitosán.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 7. Características fisicoquímicas de Chitosán de Bajo Peso Molecular (Sigma-Aldrich).....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 8. Oligonucleótidos y sondas Taqman utilizadas para el RT-PCR tiempo real</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 9. Condiciones de amplificación PCR-tiempo real</i>	<i>38</i>

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
BrEt	Bromuro de etidio
CaCU	Cáncer cervicouterino
CICUAE	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales
CMV	Citomegalovirus
Cy5	Cyanina 5
Da	Daltons
DA	Grado de desacetilación
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid - Ácido desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor - Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GMP	Good manufacturing practice - Buenas Prácticas de Manufactura
HLA	Human leukocyte antigen - Antígeno Leucocitario Humano
IBT	Instituto de Biotecnología
IFN	Interferón
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IR	Infrarrojo
kDa	Kilo Daltons
LCR (inglés)	Long Control Region - Región Larga de Control
LEIBG	Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado
LEIAG	Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado
LPS	Lipopolisacárido
LTC	Linfocitos T citotóxicos
MHC (Inglés)	Major histocompatibility complex - Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK	Natural Killer – Células Asesinas Naturales
ORF	Open Reading Frame – Marco Abierto de Lectura

PA	Poliadenilación
PAE	Poliadenilación temprana
PAL	Poliadenilación tardía
pb	Pares de bases
pDNA	Plasmidic Deoxyribonucleic acid – Ácido desoxirribonucleico plasmídico
PEI	Poli(etil)enimina
pGuaM	Poli-3-guanidopropilmetacrilato
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PLL	Poli-L-lisina
PNT	Programa Nacional de Tamizaje
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ribonucleic acid – Ácido ribonucleico
Rod	Rodamina
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SFV	Senliki Forest Virus
TGF	Transforming growth factor – Factor de crecimiento transformante
TNF	Tumor necrosis factors – Factor de necrosis tumoral
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VLP	Virus Like Particles – Partículas parecidas a virus
VPH	Virus del Papiloma Humano
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU) representa en la actualidad un gran problema de salud pública global. Uno de los mayores retos en la investigación científica aplicada en referencia a esta neoplasia es incidir de manera importante sobre el control y tratamiento de las lesiones precancerosas y neoplasias del cérvix e impedir su progresión a cáncer. Las lesiones cervicales y hasta ciertos estadios neoplásicos se desarrollan de manera localizada y externa, lo cual puede ser favorable para su tratamiento *in situ*. Recientemente, los polímeros biodegradables han llamado la atención como vehículos para encapsular, transportar y liberar moléculas con potencial terapéutico. El quitosán, un polímero catiónico, debido a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradación y baja toxicidad es un buen candidato como vehículo para encapsular y liberar genes terapéuticos. Estas moléculas pueden ser empleadas para el tratamiento de lesiones premalignas y del CaCU asociado a la infección por virus del papiloma humano (VPH) por vía tópica. El objetivo del presente trabajo fue generar micropartículas de quitosán acopladas con DNA plasmídico que expresara el gen de la interleucina 12 (IL-12), para favorecer la respuesta inmune y obtener un efecto antitumoral. Una vez formadas las micropartículas quitosán/pDNA se caracterizaron y se aplicaron en la región cervicovaginal de ratones hembra. Se demostró que el quitosán es un excelente vehículo para encapsular el DNA plasmídico y que tiene la habilidad de ingresar a la célula epitelial, favoreciendo la transgénesis *in vivo* del DNA plasmídico, el cual fue detectado en el citoplasma de las células del epitelio cervical. Adicionalmente, se desarrolló un modelo experimental de cáncer cervicouterino en ratones singénicos mediante la administración de células BMK16/myc. Se evaluó la administración local de 5 µg de pDNA con el gen de IL-12 encapsulado en micropartículas de quitosán en el modelo de cáncer generado. Se realizaron raspados cervicovaginales a diferentes tiempos para determinar la expresión de los oncogenes E6 y E7 mediante RT-PCR en tiempo real y se determinó que la expresión de los oncogenes E6 y E7 disminuye después de la aplicación de los complejos quitosán-pDNA (IL-12). En conjunto, estos resultados demuestran el efecto antitumoral del gen de IL-12 administrado mediante micropartículas de quitosán. Por lo que esta estrategia tiene un gran potencial como tratamiento tópico para el control de lesiones premalignas y CaCU asociadas a la infección de VPH.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es considerado un grave problema de salud pública global debido a sus altas tasas de incidencia y mortalidad. Representa el 9% del total de nuevos casos de cáncer en el mundo y el 85% de estos casos se reportan en países en vías de desarrollo.¹ En México, 12.9% de las defunciones por tumores malignos en mujeres son debidas al CaCU, por lo que es considerado como un problema prioritario de salud pública.² Sin embargo, el CaCU es prevenible y curable cuando se detecta en etapas tempranas; por lo tanto es de gran relevancia el desarrollo de nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas para su prevención, control y tratamiento.³

Evidencias epidemiológicas y experimentales demuestran que la infección persistente por el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, es el principal factor etiológico asociado al desarrollo del CaCU.⁴ La infección del VPH de alto riesgo al epitelio cervical, genera una serie de lesiones que conllevan a la transformación e inmortalización del epitelio cervical y eventualmente su evolución a cáncer.⁵ En los últimos años se ha determinado la existencia de más de 100 tipos de VPH, de los cuales los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 y 59 se han asociado con mayor frecuencia en lesiones precancerosas y cancerosas del cérvix. Los tipos 16 y 18 son los más frecuentemente asociados al desarrollo de lesiones pre-cancerosas y carcinomas ano-genitales, los cuales son el foco de atención para el desarrollo de vacunas enfocadas al control del CaCU.⁶

Actualmente, existen en el mercado dos vacunas profilácticas aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) enfocadas a la prevención de la infección por el VPH. Estas vacunas profilácticas son una mezcla de partículas parecidas a virus que se derivan de las proteínas de la cápside L1 del VPH de los tipos 16 y 18 para la marca Cervarix (Glaxo Smith Kline) y 6, 11, 16 y 18 para la marca Gardasil® (Merck & Co. Inc.).^{7, 8} Las 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.⁹ Con lo que se pretende generar una protección del 70% de los casos de cáncer asociados a los VPH contemplados en las vacunas.¹⁰ Sin embargo, estas vacunas no comprenden los casos de cáncer asociados a otros genotipos de VPH y debido a la historia natural del cáncer cervical, los casos actuales de CaCU no están considerados para su tratamiento con estas vacunas; por lo que es necesario seguir desarrollando y apoyando la investigación de vacunas o estrategias terapéuticas contra el CaCU.^{10, 11}

En este sentido, se están realizando esfuerzos por desarrollar y concretar algunas estrategias terapéuticas que sean aplicables en etapas tempranas de la malignidad y en tumores establecidos mediante la activación de la respuesta inmune celular. Esto contribuiría a resolver en parte el estado de inmunosupresión en el sitio del tumor mediado por la represión de genes como MHC clase I, moléculas coestimuladoras, Fas, CD3 ζ , importantes en la presentación antigénica,^{12, 13} y la expresión de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β , las cuales favorecen la progresión del proceso neoplásico.¹³

Una de estas estrategias terapéuticas es el uso de terapia génica, la cual es una herramienta útil para llevar genes terapéuticos a sitios donde se desarrollan las neoplasias. De esta manera, los genes de citocinas son excelentes candidatos para inhibir la progresión del cáncer, ya que son consideradas como moléculas inmunoregulatoras que promueven la maduración, activación y migración de las células efectoras de la respuesta inmune al sitio de la neoplasia.¹³ Particularmente, se propone el uso del gen de interleucina 12 (IL-12) como activador de la respuesta inmune celular. Debido a sus propiedades inmunoestimuladoras y su efecto antitumoral, antimetastásico y anti-angiogénico; esta citocina ha sido ampliamente utilizada en terapia génica contra diversos modelos experimentales de cáncer.

En referencia a las estrategias de terapia génica, se han empleado una gran variedad de vehículos para la liberación de genes tales como vectores virales, vectores bacterianos, liposomas y recientemente el uso de polímeros sintéticos y biodegradables.^{14, 15} Estos últimos han mostrado un gran potencial debido a su baja inmunogenicidad y toxicidad, la posibilidad de administraciones repetidas y la facilidad de establecer prácticas adecuadas de manufactura.¹⁵ Particularmente el quitosán, es un polímero natural derivado de la quitina, uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza. El quitosán es biocompatible, biodegradable, mocoadhesivo, antimicrobiano, antifúngico y tiene muy baja toxicidad. Por estas características se considera un buen candidato como vehículo de liberación de genes terapéuticos para el tratamiento del CaCU.¹⁶ Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el quitosán tiene alta capacidad de encapsular DNA plasmídico (pDNA) y lo protege de su degradación.¹⁷ Los complejos formados de quitosán/pDNA no son tóxicos en células epiteliales *in vitro* y a pH ácido los complejos se desacoplan, por lo que el pDNA queda biodisponible para ejercer su función biológica.

En este trabajo se propuso el uso del gen de IL-12 expresado en plásmidos y encapsulado en micropartículas de quitosán para su aplicación tópica en un modelo murino de cáncer cervicouterino VPH 16 positivo. Una vez generados los complejos quitosán/pDNA (IL-12) fueron caracterizados mediante electroforesis en gel, donde se verificó su acoplamiento y

se descartó la pérdida del pDNA durante el proceso de formación de los complejos. Los complejos chitosán/pDNA fueron envasados en spray y se evaluó su integridad posterior a la aplicación mediante el sistema de spray donde se verificó que no hubo desacoplamiento de los complejos debido a la presión ejercida por la bomba de liberación. Además, se evaluó la presencia y localización de los complejos chitosán/pDNA en las células epiteliales de la mucosa cervicovaginal mediante complejos donde el DNA plasmídico fue marcado con Cy5 y complejos donde el chitosán fue marcado con rodamina. Se determinó que el DNA plasmídico se localizó extracelular e intracelular posterior a la aplicación y que la presencia del chitosán y el DNA plasmídico disminuye conforme transcurre el tiempo. Estos resultados coinciden con la permanencia de chitosán en la región cervicovaginal, determinados a partir de raspados cervicales, verificados en geles de electroforesis en agarosa y visualizados con un equipo Typhoon para detectar solo la Rodamina. Se observó que la señal de Rodamina disminuye a través del tiempo, y que a las 72 horas la señal se pierde completamente. Estos resultados indican que el chitosán encapsula la pDNA y favorece la transgénesis en las células epiteliales de la mucosa cervicovaginal.

Por otro lado, usando un modelo experimental de cáncer cervicouterino en ratones hembra Balb/c singénicos mediante la inoculación de células BMK16/myc, se evaluó la administración local de 5 µg de pDNA que expresa el gen de IL-12 encapsulado en micropartículas de chitosán en el modelo de cáncer generado. Se realizaron raspados cervicovaginales a diferentes tiempos para determinar la expresión de los oncogenes E6 y E7 mediante RT-PCR en tiempo real. Se determinó que la expresión de los oncogenes E6 y E7 disminuye después de la aplicación de los complejos chitosán-pDNA (IL-12). Lo que nos indica que la administración del gen de IL-12 ejerce un efecto antitumoral. Por lo que esta estrategia tiene un gran potencial como tratamiento tópico para el control de lesiones premalignas y del CaCU asociadas a la infección de VPH.

ANTECEDENTES

Epidemiología del Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCU) es el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado y la tercer causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial, lo que representa el 9% (529,800) de nuevos casos de cáncer y un 8% (275,100) del total de muertes por cáncer entre mujeres en 2008.¹ Aproximadamente el 86% de los casos ocurren en países en desarrollo y regiones altamente marginadas (53,000 en África, 31,700 en América Latina y el Caribe y 800,159 en Asia), lo que representa el 13% de los cánceres femeninos. Las regiones de alto riesgo son el África Oriental y Occidental (Tasa estandarizada por edad mayor a 30 por 100,000), África del Sur (26.8 por 100,000), Asia central y meridional (24.6 por 100,000), América del Sur y África central (23.9 y 23.0 por 100,000). Mientras que las tasas más bajas se encuentran en Asia Occidental, América del Norte y Australia/Nueva Zelanda (menos de 6 por 100,000) (Figura 1).¹⁸

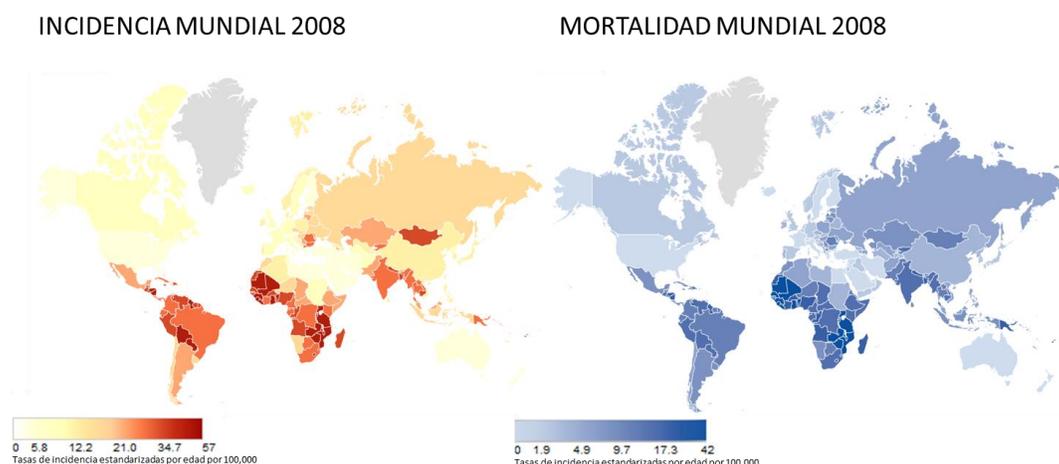


Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino en el mundo.
GLOBOCAN 2008 (IARC), Sección de Información sobre el Cáncer.

Particularmente, México tiene una población de 37.45 millones de mujeres mayores de 15 años de edad que están en riesgo de desarrollar CaCU. Las estimaciones actuales indican que cada año 10,186 mujeres son diagnosticadas con cáncer de cuello uterino y mueren 5,061 a causa de esta enfermedad.¹⁹ El CaCU es el segundo tipo de cáncer más frecuente dentro de la población femenina mexicana, con una tasa de incidencia cruda anual del 15.5% y una mortalidad del 12.9% en mujeres de todas las edades.¹⁸ Durante el periodo 1990-2000 se reportaron un total de 48,761 defunciones por CaCU, lo que representó un promedio de 12 mujeres fallecidas cada 24 horas, con un aumento de mortalidad anual de 0.76%. En 2007, las muertes de mujeres entre 25 y 44 años se debieron principalmente a

tumores malignos; siendo el cáncer de mama y cervicouterino los principales causantes de los decesos de mujeres mexicanas de este grupo de edad, donde el CaCU alcanzó un índice de mortalidad estimado de 10.2 defunciones por cada cien mil mujeres.²⁰

Este tipo de cáncer es prevenible y tratable cuando el diagnóstico se realiza en forma oportuna. Con la finalidad de reducir la mortalidad y morbilidad causadas por el CaCU, en 1994 se emitió la norma oficial mexicana “*NOM-014-SSA2-1994: Para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello del útero*”, la cual tiene como objetivo principal uniformar los principios, políticas, estrategias y criterios de operación tanto en el programa nacional de tamizaje (PNT-CaCU) como en el tratamiento de los casos identificados.²¹ Adicionalmente, se ha desarrollado el programa de acción específico 2007-2012 en CaCU, el cual tiene como objetivo disminuir las tasas de morbilidad y mortalidad por CaCU, a través de la provisión de servicios óptimos en la promoción, prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control del padecimiento así como de la participación responsable de la población en el cuidado de su salud.²² Debido a esto, en México la mortalidad por CaCU ha mantenido una tendencia descendente los últimos 15 años, con una tasa de 25.3 defunciones por 100,000 mujeres de 25 y más años de edad en 1990 y de 14.6 en 2006, lo que representa un descenso del 45%. Sin embargo, esta disminución no ha sido homogénea en todo el país, ya que la mayor mortalidad se encuentra en estados con un menor índice de desarrollo humano y en zonas rurales.²²⁻²⁴ Por lo tanto, esta neoplasia merece atención especial en la salud pública para el desarrollo de nuevas estrategias para su detección, control y tratamiento.

Factores de riesgo asociados al Cáncer Cervicouterino

A pesar de su potencial oncogénico, la infección por VPH es un fenómeno transitorio que puede revertirse espontáneamente o permanecer en estado latente en el 80% de los casos detectados, por lo que es considerado como una causa necesaria ms no suficiente para el desarrollo de CaCU.⁴ Se han establecido diversos factores y cofactores de riesgos involucrados en el desarrollo de esta neoplasia, los cuales pueden ser considerados como:

- a) *Factores ambientales*: Infección por VPH en la mujer y el hombre,^{25, 26}
- b) *Factores sociales*: Respuesta del sistema de salud, barreras culturales, nivel de pobreza, educación, infraestructura y saneamiento,^{24, 27}
- c) *Factores epidemiológicos*: Múltiples parejas sexuales, multiparidad, tabaquismo, desnutrición, niveles hormonales, uso de anticonceptivos hormonales por más de cinco años, coinfección con otros patógenos,^{28, 29}
- d) *Factores genéticos*: Susceptibilidad genética a la infección (polimorfismos) y persistencia viral,²⁷
- e) *Factores del hospedero*: Inmunogenética, inmunosupresión, expresión de citocinas inmunosupresoras y proinflamatorias, mecanismos de evasión de la respuesta inmune, alteraciones en oncogenes (*myc, ras*) y antioncogenes (*p53, pRb*),³⁰⁻³³

f) Factores por la infección por VPH: Tipo de VPH (bajo, intermedio o alto riesgo) y variante de VPH.^{34, 35} (Figura 2).

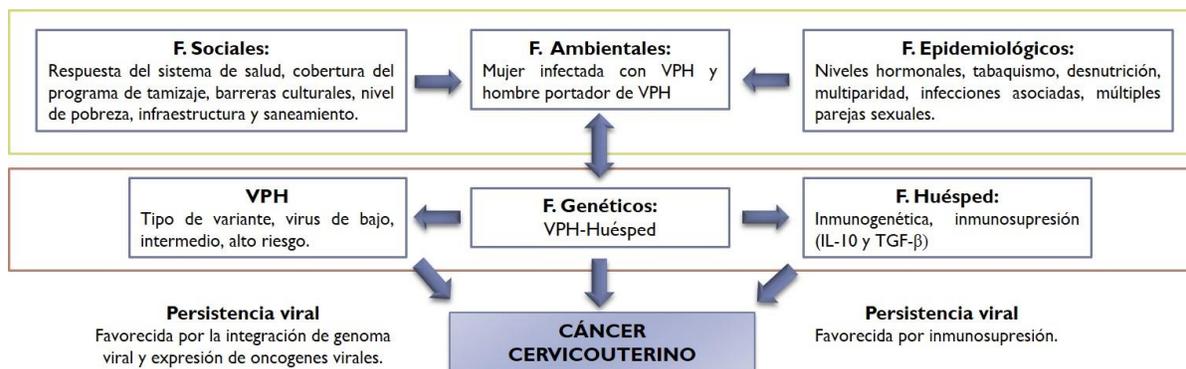


Figura 2. Factores determinantes del desarrollo del cáncer cervicouterino.

Fuente: Torres-Poveda KJ, et al. 2008²⁷

Particularmente, la marginación y la pobreza son dos variables socioeconómicas que incrementan el riesgo de morir por CaCU debido a que son formas de exclusión de las mujeres a los servicios de atención ginecológica, aseverando la inequidad de género.²⁴ Por lo cual, es necesario mejorar el acceso a los servicios de salud en comunidades vulnerables, optimizar los programas de detección temprana del CaCU actuales e implementar nuevas herramientas para la detección de la infección por VPH y el tratamiento de lesiones precancerosas y neoplasias del cérvix en la población femenina.

Virus del Papiloma Humano y Cáncer Cervicouterino

La infección persistente por VPH de alto riesgo en el epitelio cervical es una causa necesaria para el desarrollo de CaCU.⁴ En la actualidad se conocen más de 100 genotipos de VPH que han sido subdivididos en tipos de bajo riesgo, los cuales se encuentran en verrugas o papilomas genitales; y los tipos de alto riesgo, los cuales se han encontrado asociados al desarrollo de CaCU en más de 95% de los casos (Tabla 1).³⁶ Los genotipos de VPH 16 y 18 han sido los más frecuentemente asociados al desarrollo de lesiones precancerosas y carcinomas ano-genitales, con un 50-70% de los casos para VPH 16 y 7-20% de los casos para VPH 18.³⁷ La infección es comúnmente transmitida por contacto sexual y genera una lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) en las mujeres.³⁸ La mayoría de las lesiones leves o moderadas revierten espontáneamente en 6-12 meses después de su aparición en individuos inmunocompetentes. Solo un pequeño porcentaje persiste y progresa al establecimiento de lesiones intraepiteliales de alto grado (LIAG), de las cuales solamente una fracción progresa a CaCU.³ Este hecho señala la coexistencia de otros factores que están asociados al desarrollo del CaCU, lo que significa que la infección viral es causa central pero no suficiente en el desarrollo de CaCU.

Tabla 1. Tipos de VPH en lesiones genitales

LESIÓN GENITAL	TIPO DE VPH
Condiloma acuminado	6,11,42,44,51,53,83
Neoplasia intraepitelial	6,11,16,18,26,30,31,33,34,35,39,40,42,43,45,51,52,53,54,55,56,57,58,59,61,62,64,66,67,68,69,70,71,73,74,79,81,82,83,84
Cáncer cervical y otros cánceres anogenitales	16,18,31,33,35,39,45,51,52,54,56,58,59,66,68,69

Modificado de: zur Hausen, 2002

Virus del Papiloma Humano

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, un grupo de virus relativamente pequeños. Los papilomavirus son virus con cápsides icosaédricas que pueden infectar las capas basales de la epidermis y el epitelio de la mucosa y replican su genoma en el núcleo de las células hospederas infectadas.^{39, 40} Su genoma viral está constituido por DNA circular de doble cadena con una longitud de aproximadamente 8,000 pb, el cual contiene ocho marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frames, ORF's*).⁵ El genoma del VPH puede ser dividido en tres regiones: la región temprana (E), la región tardía (L) y una región larga de control (LCR).⁴¹ (Figura 3)

Las tres regiones en los papilomavirus están separadas por dos sitios de poliadenilación (PA): los sitios PA temprano (PAE) y PA tardío (PAL).⁴¹ Dentro de la región tardía se encuentran las proteínas L1 y L2. La proteína L1 es el elemento estructural primario, los viriones infecciosos contienen 360 copias de la proteína organizados en 72 capsómeros. La proteína L2 es un componente menor del virión y se encuentra en el centro de los capsómeros pentavalentes de los vértices del virión. Ambas proteínas desempeñan una función importante mediando la infectividad eficiente del virus.⁵

La región temprana contiene a los oncogenes E5, E6 y E7 que modulan los procesos de transformación e inmortalización celular, y a los genes que codifican para las proteínas reguladoras E1, E2 y E4 que modulan la transcripción y replicación.⁶ Las proteínas E1, E2, L1 y L2 son altamente conservadas entre los papilomavirus. Existe evidencia de que su genoma es muy estable y los cambios por mutación o recombinación en su secuencia son eventos muy raros.⁶

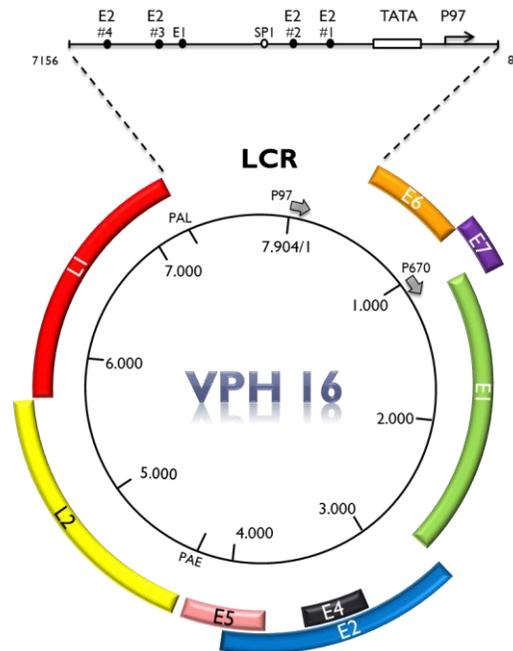


Figura 3. Organización del genoma viral de VPH 16.
Modificado de Doorbar, 2006

La región LCR es un segmento de aproximadamente 850 pb que no codifica para proteínas. Sin embargo, este segmento contiene el origen de replicación, una región promotora (P97 en VPH16), cuatro sitios de unión para la proteína viral E2, un único sitio de unión para la proteína viral E1 y múltiples sitios de unión para por lo menos doce diferentes factores de transcripción como AP-1, cEBP, receptor de glucocorticoides, receptor de progesterona, NF1, NF-IL6, Oct-1, PEF-1, TEF-1, TEF-2, Sp1 y YY1.⁴¹⁻⁴³

Patogénesis del CaCU - Ciclo viral

El ciclo vital del VPH inicia con el ingreso del virus a las células epiteliales de la capa basal (células proliferativas), donde las partículas infectan a las células basales a través de una microlesión en el epitelio estratificado.⁴⁴ No se ha identificado un receptor de membrana definido para la entrada del virus, sin embargo, se piensa que los proteoglicanos de heparan-sulfato tienen una función importante en la unión inicial y que existe un segundo receptor que interactúa con la proteína L2 de la cápside viral.^{45, 46} La internalización del virus ocurre mediante endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina.⁴⁴

Inicialmente, el genoma viral se encuentra como un episoma estable (sin integración al genoma de la célula hospedera) manteniendo un bajo número de copias e inicia la expresión de las proteínas E1 y E2. Estas proteínas forman un complejo que se une a secuencias del origen de replicación viral y reclutan polimerasas celulares y proteínas accesorias para mediar la replicación. La proteína E1 tiene también actividad de helicasa, permitiendo la separación de las hebras de DNA viral delante del complejo de replicación.

La proteína E2 es un factor de transcripción que se une al DNA sitios-específicos, que no solo ayuda a reclutar E1 al origen, sino que también desempeña una función importante en la regulación de la transcripción viral.^{5, 39} En las capas superiores del epitelio, el genoma viral se replica más y los genes tardíos L1 y L2 son expresados. Estos genes encapsidan los genomas virales para formar una nueva progenie de viriones en el núcleo, los cuales son liberados y pueden generar una nueva reinfección.⁴⁷

En estadios más avanzados, el DNA viral se integra al genoma de la célula hospedera. Este proceso causa el rompimiento de la doble cadena de DNA viral afectando el marco de lectura abierto (ORF) del gen E2 permitiendo la expresión de los oncogenes E6 y E7 de forma constitutiva.⁴³ Así, la pérdida de la función represora de E2 representa un factor crítico en la progresión de la lesión en el cuello uterino, propiciando su desarrollo a carcinoma *in situ*. La oncoproteína E6 se une a la proteína supresora de tumores p53, como parte de un complejo trimérico con la ligasa de ubiquitina celular E6AP, que conduce a la rápida degradación de p53. E6 también puede retener a p53 en el citoplasma, bloqueando su translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación.^{5, 39} La oncoproteína E7 se une a los supresores de tumor de la familia de retinoblastoma (Rb). La familia pRb controla la replicación celular, la unión de E7 a la forma activa hipofosforilada de pRb conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que favorece el progreso de la fase S del ciclo celular y por lo tanto la replicación celular. Adicionalmente, E7 también se asocia con otras proteínas como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK como p21 y p27.^{3, 5, 39, 47} Por lo tanto, la expresión constitutiva de los oncogenes E6 y E7 que están relacionados con la transformación e inmortalización de la célula hospedera, merece especial atención ya que permite entender los mecanismos moleculares de oncogénesis viral en humanos y representan un blanco apropiado para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el CaCU (Figura 4).

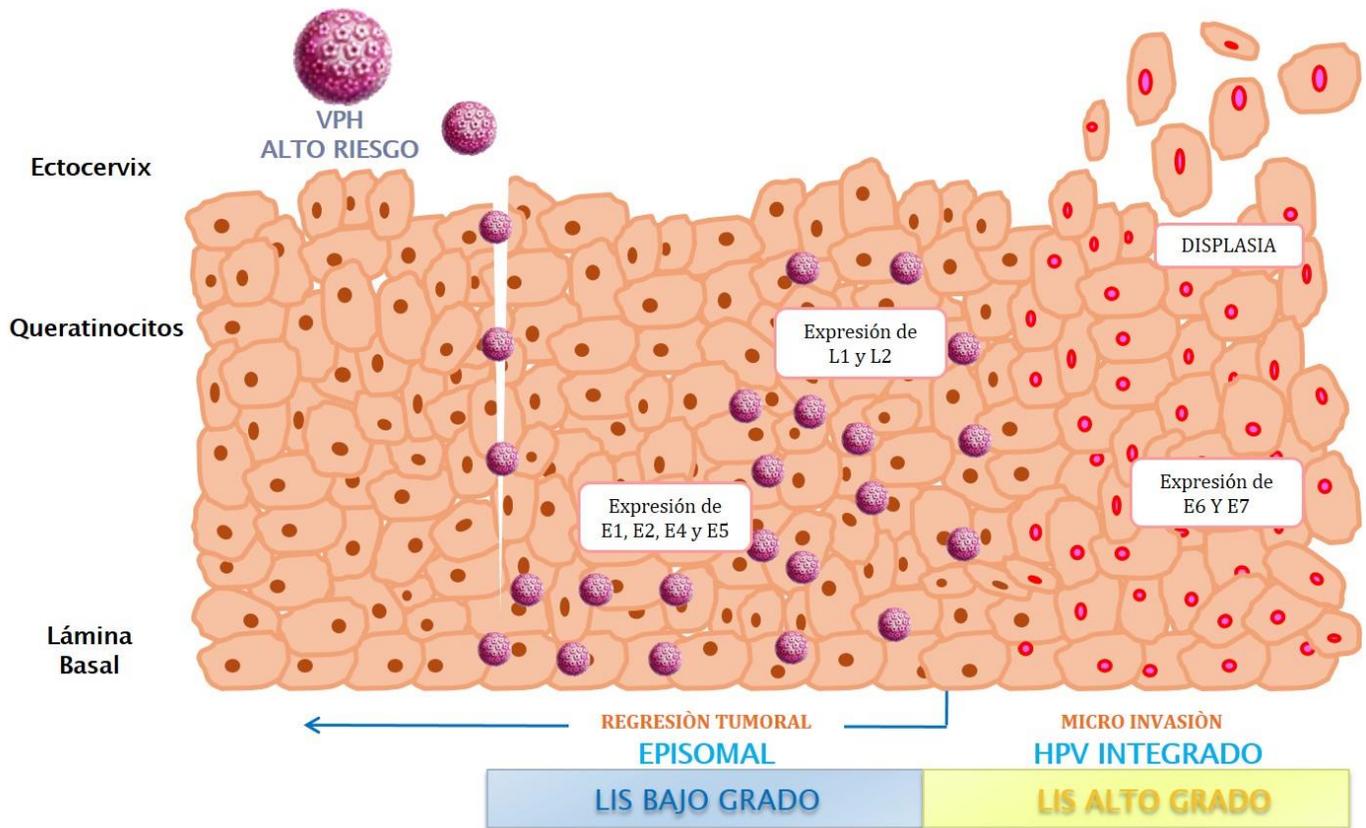


Figura 4. Desarrollo del cáncer cervicouterino y expresión de proteínas virales.
Modificado de Woodman *et al*, 2007.

Respuesta inmune contra la infección por VPH y CaCU

El VPH como otros virus, utiliza la maquinaria celular para replicarse y expresar sus proteínas virales. Una vez que el VPH infecta el epitelio cervical, define una población viral no productiva donde mantiene la replicación del DNA viral en un bajo número de copias, de forma episomal. Durante esta etapa el DNA viral se distribuye difusamente por las células basales proliferantes y al mantener un número reducido de copias impide la activación de la respuesta inmune.⁴⁸

La respuesta inmune del huésped posee diversos mecanismos que le permiten reconocer y eliminar las células transformadas, por lo que es un factor clave en la regresión o progresión de las lesiones asociadas a la infección por VPH. Las células tumorales son reconocidas, a través de la respuesta inmune innata, mediante un proceso independiente de antígeno mediado por un patrón de receptores y de moléculas de superficie celular expresados en la célula tumoral. Las células asesinas naturales (células NK) reconocen a las células tumorales debido a que estas mantienen una baja o nula expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, así como de los

ligandos MICA y MICB de los receptores NKG2D de las células NK.⁴⁹ La presencia de macrófagos infiltrantes y células NK en la regresión de verrugas genitales sugiere que la respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra la infección por VPH.^{50, 51}

Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa requiere del reconocimiento de antígenos tumorales para reconocer y eliminar las células tumorales a través de las células efectoras de la respuesta inmune. La respuesta inmune celular, especialmente los linfocitos T antígeno específicos, es probablemente el mecanismo de defensa más importante contra las células infectadas por el VPH.⁵² La inmunidad viral es iniciada por el acoplamiento del receptor de linfocitos T a péptidos específicos derivados del virus o del tumor, presentados por el MHC clase I.^{52, 53} Para esto, los linfocitos T requieren que las células dendríticas (DC) previamente capturen y procesen el detritus celular tumoral y migren a los nódulos linfáticos regionales.¹³ En este proceso se activan tanto los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos contra péptidos tumorales, los cuales son reconocidos a través de las moléculas del MHC. Una eficiente respuesta de linfocitos T CD8⁺ se caracteriza por la generación y expansión clonal de linfocitos T citotóxicos (LTC), que son capaces de reconocer y eliminar a las células tumorales.⁵² Adicionalmente, los linfocitos T CD4⁺ dirigen la respuesta inmune antitumoral, mediante la inducción y activación de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos a través de la producción de citocinas.⁵⁴ La diferenciación de linfocitos T CD8 vírgenes a LTC ocurre en respuesta a dos señales: la presentación del péptido antigénico al MHC clase I y una señal coestimuladora.⁵²

Sin embargo, existen mecanismos de evasión de la respuesta inmune generados por los propios tumores como consecuencia de la expresión y represión de varios genes importantes en la respuesta inmune.⁵⁰ Dentro de estos mecanismos se encuentran: la falta de expresión de antígenos tumorales, la expresión de la proteína de superficie Fas y su ligando, la baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, la disminución de la expresión de genes que codifican para la expresión de las proteínas TAP1/TAP2 (proteínas transportadoras de antígeno), baja expresión de moléculas coestimuladoras como B7 y de la cadena zeta (ξ) del complejo TCR/CD3.^{40, 55-58} Adicionalmente, se ha reportado la producción de citocinas inmunosupresoras como IL-4, IL-10 y TGF- β 1 en tumores cervicales que favorecen la progresión del proceso neoplásico y disminuyen la síntesis de citocinas mediadoras de la respuesta inmune celular que incrementan la actividad de macrófagos, células T citotóxicas y células naturales asesinas (NK).^{32, 59} Además, se ha determinado que la expresión de la IL-10 es directamente proporcional al grado de avance del CaCU, y que existe una correlación entre la expresión de esta citocina y la presencia de la infección de VPH 16.³³ Estos eventos favorecen la idea de que la respuesta inmune local tiene un papel importante en la historia natural de la infección por VPH del cuello uterino. Por lo que ahora el reto es revertir el estado de

inmunosupresión local y activar la respuesta inmune antitumoral para lograr la eliminación de los tumores.

Citocinas y Microambiente Tumoral

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que pueden permanecer unidas a la membrana celular o secretarse en respuesta a estímulos como: estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos, infecciones o inflamación.⁶⁰ Muchos de los eventos de la respuesta inmune están regulados por estas moléculas, las cuales son secretadas principalmente por linfocitos T CD4⁺. Las citocinas pueden ejercer su función de manera autócrina modulando la actividad celular, o de manera parácrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras estirpes celulares. Asimismo, las citocinas son importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, en la quimiotaxis celular y en la activación de células de la respuesta inmune.¹³ En este contexto, las citocinas estimulan la respuesta del hospedero al controlar el estrés y la homeostasis celular.

Las citocinas son mensajeros moleculares que permiten a las células del sistema inmune comunicarse entre sí para generar una respuesta coordinada y robusta, pero autolimitada a un antígeno blanco. Aunque muchas formas de comunicación del sistema inmune se producen a través de interacción directa célula-célula, la secreción de citocinas permite la rápida propagación de la señalización inmune de una manera polifacética y eficiente.⁶¹ Por otro lado, algunas citocinas estimulan directamente a las células inmunoefectoras y a las células del estroma en el sitio del tumor, y aumentan el reconocimiento de las células tumorales por las células efectoras citotóxicas.⁶¹ Igualmente, las citocinas pueden actuar sobre la célula tumoral (citólisis, daño vascular y diferenciación celular), aumentando la expresión de moléculas del MHC clase I y II, moléculas de adhesión y otros antígenos específicos de tumor. Asimismo, las citocinas pueden reclutar, expandir, estimular células efectoras contra el tumor (linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, NK's etc.), inhibir la angiogénesis e inducir la expresión de otras citocinas con propiedades similares.¹²

En general, pueden distinguirse dos grupos de citocinas en base en su participación en los procesos de infección y/o inflamación: a) Las citocinas proinflamatorias, que están directa o indirectamente involucradas en los procesos inflamatorios y promueven la respuesta inmune mediada por células, como la interleucina (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-12 el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), y b) las citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-13) las cuales suprimen la actividad de las citocinas proinflamatorias y son potentes mediadores de los linfocitos B.^{13, 60} Por lo tanto, el perfil de expresión de citocinas presentes en una enfermedad determinará el tipo de respuesta inmune que se genere.

Recientemente, se ha reportado que en diferentes neoplasias se genera un microambiente tumoral debido a la expresión o represión de genes importantes en la respuesta inmune y en la célula tumoral. Lo cual promueve el aumento en la expresión de citocinas antiinflamatorias y una disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias lo que favorece la progresión del proceso neoplásico.⁶²⁻⁶⁴ Particularmente, en CaCU se ha observado un aumento en la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 y TGF- β , generando un estado de inmunosupresión local.^{25, 33, 65, 66} A favor de esta hipótesis, se han reportado varias alteraciones de la respuesta inmune en pacientes con lesiones cervicales pre-malignas y malignas como baja expresión de moléculas del MHC clase I, disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras, baja expresión de CD25⁺ y de la cadena ζ del complejo TcR/CD3 en linfocitos infiltrantes de tumor y células NKTs.¹³

Interleucina 12 (IL-12) y sus propiedades antitumorales

La interleucina 12 (IL-12), es una citocina heterodimérica que es secretada principalmente por células presentadoras de antígenos en respuesta a la presencia de antígenos como lipopolisacárido (LPS), DNA bacteriano, RNA de doble cadena e infecciones virales.⁶⁷ El heterodímero de IL-12 está compuesto por una cadena ligera de 35-kDa (conocida como p35 o IL-12 α) y una cadena pesada de 40k-Da (conocida como p40 o IL-12 β) unidas por dos puentes disulfuro, que son codificadas por dos genes diferentes.⁶⁸ La subunidad p35 tiene homología con otras citocinas de cadena sencilla, mientras que la subunidad p40 es homóloga al dominio extracelular de miembros la familia de receptores de citocinas hematopoyéticos.⁶⁹ Ambas subunidades deben ser producidas dentro de la misma célula para tener el dímero biológicamente activo p70.⁷⁰

Aunque la IL-12 fue identificada y purificada originariamente de sobrenadantes de una línea celular linfoblastoide B humana transformada por el virus de Epstein-Barr, se sabe que los principales productores de IL-12 son las células del sistema inmune innato y células presentadoras de antígeno (Tabla 2). La producción de IL-12 está estrechamente regulada por otras citocinas, principalmente IFN- γ , TNF- α y el factor estimulante de colonias granulocitos y monocitos (GM-CSF). Sus principales células blanco son los linfocitos T y células NK. IL-12 también afecta la función de linfocitos B y células progenitoras hematopoyéticas, por lo que IL-12 es considerada como un vínculo importante entre la respuesta inmune innata y adaptativa.^{69, 70} IL -12 dirige la diferenciación de células Th1 contra células Th2 caracterizado por un incremento en la producción de IFN- γ e IL-12 y una disminución en la producción de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10.

Tabla 2. Células productoras de IL-12

Grupo Celular	Tipo Celular
Monocitos/macrófagos	Monocitos
	Macrófagos
	Células de Kupffer
	Células mesangiales
	Microglia
	Astrocitos
Células Presentadoras de Antígeno	Células dendríticas
	Células de Langerhans
Otros tipos celulares	Células polimorfonucleares
	Mastocitos
	Keratinocitos

Modificado de Hasko & Szabó 1999

Adicionalmente, la IL-12 induce efectos antiangiogénicos inhibiendo así la metástasis y la formación de tumores.⁷¹ IL-12 ejerce su efecto biológico uniéndose a receptores específicos de superficie celular en sus células blanco. El receptor de alta afinidad de IL-12 está formado por la coexpresión de dos subunidades (IL-12R β 1 e IL-12R β 2) que activan a la cascada de transducción de señales JAK-STAT. Ambas subunidades son necesarias para proporcionar la energía de enlace, sin embargo, la subunidad IL-12R β 2 es necesaria para la trasducción de señal. La estimulación del receptor de IL-12 en células blanco se da mediante el receptor asociado a tirosin-cinasas JAK2 y TYK2, y a los factores de transcripción STAT1, STAT3, STAT4 y STAT5; siendo STAT4 el mediador predominante de la respuesta celular activada por IL-12^{70, 71} (Figura 5).

Debido a sus propiedades como inmunoestimulador, su actividad antitumoral, la prevención del desarrollo de metástasis y su efecto antiangiogénico; ésta citocina ha sido ampliamente utilizada en terapia génica en diversos modelos experimentales como cáncer alveolar,⁷² cáncer de mama,⁷³ sarcoma de Ewing,⁷⁴ neuroblastoma,⁷⁵ entre otros. Donde se han demostrado sus efectos en la regresión o inhibición del crecimiento del tumor y la prevención de metástasis. Se ha reportado que según el modelo de tumor, la IL-12 puede ejercer sus actividades antitumorales a través de las células T, células NK o células NKT, así como mediante la inducción de citocinas como IFN- γ .⁷⁶ La supresión de angiogénesis por IL-12 es dependiente de su habilidad para inducir la expresión de INF- γ y reducir la expresión de metaloproteasas que tienen una función importante en la remodelación de la matriz celular, un proceso requerido durante la neoangiogénesis.^{71, 77}

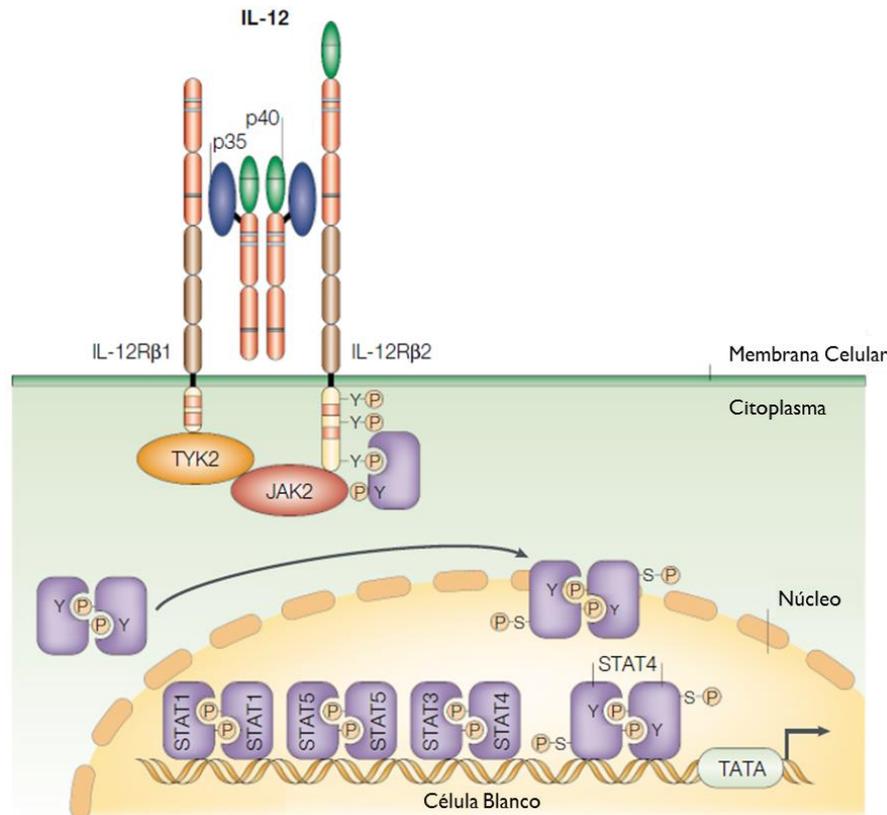


Figura 5. Receptor de IL-12 y transducción de señal.

La actividad de IL-12 ha sido probada en pacientes con tumores sólidos avanzados y malignidades hematopoyéticas con resultados prometedores.⁷⁸ Sin embargo, la administración sistémica de IL-12 en pacientes, es limitada debido a su toxicidad dependiente de la dosis.^{69, 71} Por lo que la expresión local y eficiente del gen que codifica para IL-12 en el tumor manteniendo bajas concentraciones de IL-12 en el suero, representa un enfoque alternativo a la inmunoterapia a fin de evitar la toxicidad sistémica causada por la administración de la proteína recombinante.

Vacunas contra CaCU

El CaCU se aborda desde diferentes perspectivas para su prevención, diagnóstico, control y tratamiento. Tradicionalmente, los programas de salud tienen un enfoque basado en la detección temprana mediante el tamizaje para identificar de manera precoz los signos y síntomas de cáncer que lleven al diagnóstico y tratamiento tempranos.²² Sin embargo, este enfoque está cambiando debido a las investigaciones científicas y tecnológicas en el campo del CaCU, que han aportado un conocimiento profundo en la biología del VPH para el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas como una nueva opción para la prevención de las infecciones por VPH y el tratamiento de las infecciones establecidas.

Vacunas Profilácticas

Actualmente, existen en el mercado dos vacunas profilácticas aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) enfocadas a la prevención de la infección por el VPH. Gardasil® (Merck & Co. Inc.) es una vacuna tetravalente recombinante preparada por ingeniería genética en un sistema de levadura que expresa la proteína L1 de los VPH tipos 6, 11, 16 y 18.⁸ Por otro lado, Cervarix (Glaxo Smith Kline) es una vacuna recombinante compuesta por partículas parecidas al virus que se derivan de las proteínas de la cápside L1 del VPH de los tipos 16 y 18. Esta vacuna ha sido formulada con un nuevo sistema adyuvante, el AS04, con el objetivo de inducir una respuesta inmune más eficiente y prolongada. Al igual que la anterior vacuna, al no contener material genético, no puede causar infección en el hospedero.⁷ Estas vacunas son aplicadas en mujeres adolescentes en edades de 9 a 15 años y en mujeres con edades de 15 a 25 años, sin infección por el VPH y sin lesión (Tabla 3). Los modelos matemáticos predicen que los programas de vacunación para mujeres jóvenes reducirán sustancialmente la incidencia de CaCU si la cobertura de la vacuna es alta (>70%) y la protección inducida por la vacuna tiene una duración ≥ 10 años.⁷⁹

Adicionalmente, se pretende que se tenga protección de por lo menos 70% de los casos de cáncer cervical asociados a los VPH 6, 11, 16 y 18.⁸⁰ En estudios realizados con más de 20,000 mujeres entre 9-26 años de edad, se ha observado que las vacunas son seguras y no causan efectos secundarios serios.⁸¹ El seguimiento de cohortes (4-5 años) ha mostrado que un mes después de la aplicación de la tercera dosis de la vacuna, aproximadamente el 100% de las mujeres de 15-26 años de edad en ensayos con ambas vacunas tuvieron niveles detectables de anticuerpos para cada genotipo de VPH, siendo los niveles 10-110 veces mayores comparado con la infección natural.⁸² Ambas vacunas han demostrado tener una eficacia superior al 90% contra la infección persistente de los genotipos 16 y 18 en mujeres que recibieron tres dosis de la vacuna contra VPH.^{83, 84}

Las vacunas profilácticas contra la infección por VPH representan un gran progreso en el control del CaCU, sin embargo existe una alta prevalencia de infección por VPH en el mundo. Más del 80% de los casos de CaCU ocurren en países en vías de desarrollo y debido a la alta prevalencia de infección por VPH y los años que se requieren para el desarrollo de CaCU; las vacunas profilácticas contra la infección del VPH necesitan tener una buena cobertura y su aplicación prolongada para reducir el número de casos de CaCU asociados a la infección por VPH. Asimismo, el alto costo de las vacunas actuales representa un gran obstáculo para su implementación en los países en vías de desarrollo.⁸⁵ Adicionalmente, estas vacunas son estrictamente profilácticas, los datos actuales no indican que la vacunación tenga un efecto terapéutico en la infección por VPH o enfermedades asociadas.⁸¹ Por lo tanto, es necesario seguir apoyando el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de lesiones precancerosas y del CaCU.

Tabla 3. Comparación de las vacunas profilácticas contra la infección por VPH

Característica	Vacuna Cuadrivalente Merck [Gardasil]	Vacuna Bivalente GSK [Cervarix]
Genotipos de VLPs	6, 11, 16, 18	16, 18
Sistema de expresión	Levadura [Saccharomyces cerevisiae]	Sistema de expresión en células de insecto - Baculovirus
Adyuvante	225 µg Sulfato de Hidroxifosfato de Aluminio (Adyuvante de Aluminio Merck)	AS04 compuesto de: Hidróxido de Aluminio (500 µg) 50 µg MPL (3-O-desacyl-4'-monofosforil lipido A)
Esquema Recomendado	Dosis intramuscular de 0,5 mL 0, 2, 6 meses	Dosis intramuscular de 0,5 mL 0, 1, 6 meses
Precio aproximado (Dólares)	\$ 120 por dosis	\$ 100 por dosis
Aprobada para edades	9-26 años	10-25 años
Títulos de anticuerpos un mes después de completado el esquema de vacunación comparados con la infección natural	VPH 6: 11 veces VPH 11: 7 veces VPH 16: 105 veces VPH 18: 19 veces	VPH 16: 107 veces VPH 18: 82 veces

Tomado de: Cutts *et al*, 2007.

Vacunas Terapéuticas

Varias vacunas terapéuticas han sido desarrolladas, principalmente contra VPH 16, e incluso algunas han sido probadas en ensayos clínicos.⁸⁶ Estas pueden ser usadas para el tratamiento de lesiones establecidas y tumores malignos generando inmunidad mediada por células contra las células infectadas por VPH.⁸⁷ El desarrollo de una estrategia terapéutica involucra la selección de blancos antigénicos de VPH que sean expresados continuamente en las células infectadas y células con cáncer, debido a esto, la selección del antígeno es de suma importancia para el diseño de una vacuna terapéutica contra VPH.^{85, 87} Particularmente, las proteínas E6 y E7 codificadas por el VPH representan blancos ideales para el desarrollo de vacunas terapéuticas, ya que son expresadas constitutivamente en tumores asociados a VPH y son críticas en la inducción y mantenimiento de la transformación celular en células infectadas por VPH. Es por esto que muchas vacunas terapéuticas están enfocadas principalmente en la estimulación y activación de células T dirigidas hacia las proteínas E6 y/o E7.^{11, 85, 87-89} Existen diferentes plataformas que se han utilizado en el desarrollo de vacunas terapéuticas contra la infección por VPH. Estos métodos incluyen el uso de vacunas basadas en péptidos o proteínas, vectores vivos, replicones de DNA o RNA y células completas; la tabla 4 resume las ventajas y desventajas de cada estrategia.^{85, 87}

Vacunas basadas en vectores vivos

Las vacunas basadas en vectores vivos pueden ser divididas en dos grandes grupos: a) *Vectores bacterianos* y b) *Vectores virales*. Los vectores virales y bacterianos,

especialmente aquellos que son capaces de replicarse en el hospedero, son altamente inmunogénicos y facilitan la propagación intracelular del antígeno.⁸⁸ Sin embargo, existen algunos aspectos en seguridad que deben ser considerados.

Vacunas basadas en vectores bacterianos.

Las bacterias atenuadas pueden ser utilizadas para liberar genes o proteínas de interés en células presentadoras de antígeno. Existen diferentes vectores bacterianos que han sido probados para su uso en vacunas terapéuticas contra VPH, como *Listeria monocytogenes*⁹⁰, *Lactobacillus lactis*⁹¹ y *Lactobacillus plantarum*.⁹² Estas vacunas han demostrado ser capaces de provocar una fuerte respuesta inmune mediada por células T específicas contra E7. En particular, *L. monocytogenes* ha emergido como un prospecto de vacuna debido a su habilidad para infectar monocitos/macrófagos y secretar listeriolisina O, y así permitir la evasión de fagosomas. La listeriolisina O permite a *Listeria* estar presente tanto en el citoplasma como en compartimentos endosomales, lo que resulta en una presentación de antígeno a través del MHC clase I y II, generando una respuesta inmune tipo CD8⁺ y CD4⁺, así como inducir regresión de tumores establecidos.^{87, 93} Recientemente se ha demostrado que las vacunas contra E7 basadas en *Listeria* pueden inducir la regresión de tumores sólidos implantados en ratones transgénicos con la expresión específica de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH 16 en tejido.⁹⁴

Vacunas basadas en vectores virales.

Las altas tasas de eficiencia de infección y expresión de antígenos codificados hacen a los vectores virales una opción factible en vacunas terapéuticas contra VPH. Las vacunas basadas en vectores virales incluyen a virus como el virus vaccinia, adenovirus, virus adeno-asociados, entre otros.⁹⁵ Dentro de los cuales, el virus vaccinia es considerado particularmente prometedor para inmunoterapia antígeno-específica debido a su alta eficiencia de infección.⁸⁷ Las construcciones de virus vaccinia que codifican para E7 ligada a proteínas que aumentan la presentación de antígeno en células dendríticas han mostrado generar una respuesta inmune específica para E7 que puede causar regresión de tumores que expresan E7 en ratones.⁹⁶ Por otro lado, los adenovirus también han mostrado resultados prometedores. Un estudio reciente demostró que la vacunación con adenovirus deficientes de replicación que codifican para la proteína de fusión CRT/E7 confieren inmunidad contra tumores que expresan E7, y erradican tumores establecidos en ratones.⁹⁷ Los virus de RNA, como Senliki Forest Virus (SFV) pueden ser utilizados como vectores vivos. SFV que expresan E7 de VPH16 pueden inducir células T citotóxicas específicas contra E7 en ratones transgénicos.⁹⁸ Esta respuesta puede ser aumentada mediante la co-administración de IL-12, inhibiendo la angiogénesis del tumor.⁹⁹

Tabla 4. Características de las plataformas utilizadas en el desarrollo de vacunas terapéuticas contra VPH

Vacunas terapéuticas basadas en:	Ventajas	Desventajas
Vectores vivos	Variedad de vectores disponibles	Inmunidad pre-existente
	Alta inmunogenicidad	Posible dominancia de respuesta inmune contra el vectores viral que contra el antígeno de VPH
	Pueden ser modificados para que expresen citocinas y moléculas co-estimuladoras	Los anticuerpos neutralizantes restringen la administración repetida
		Riesgo de enfermar
Péptidos	Seguras	Los epítomos deben ser determinados
	Estables	Restricción por HLA
	Fáciles de producir	Baja inmunogenicidad
	Pueden ser combinadas con múltiples epítomos en péptidos de cadena larga	
Proteínas	Seguridad	Baja inmunogenicidad
	Estabilidad	Respuesta de LTC limitada
	No restricción por MHC	
Células dendríticas	Alta inmunogenicidad	Alto costo
	Múltiples métodos disponibles para cargar antígenos	Mano de obra individualizada
		Falta de normatividad para su preparación
		Células dendríticas no necesariamente migran a nódulos linfoides
Células tumorales	Expresan antígenos tumorales	Seguridad
		Mano de obra individualizada
		Falta de presentación antigénica por células tumorales
DNA	Seguridad	Baja inmunogenicidad
	Estabilidad	No propagación intercelular
	Fáciles de producir	Riesgo de integración genómica
	Posibilidad de múltiples administraciones	
	Variedad de métodos de liberación disponibles	
	Mayor expresión de antígenos	
RNA	Seguridad	Difícil producción y almacenamiento - inestable
	Transitorio, no infeccioso	No propagación intercelular
	Posibilidad de múltiples administraciones	
	No riesgo de integración genómica	

Tomado de: Moscicki, 2008

Vacunas basadas en péptidos/proteínas

Las vacunas basadas en péptidos son estables, fáciles de producir y seguras.¹⁰⁰ La administración de péptidos derivados de antígenos de VPH provee un medio de vacunación contra VPH. Estos péptidos antigénicos de VPH son tomados por células dendríticas y presentados en asociación con el MHC clase I y/o clase II en moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA), para montar una respuesta inmune contra el patógeno.⁸⁷ Sin embargo, una limitante es que estas vacunas son MHC específicas. Las moléculas de HLA son altamente polimórficas por naturaleza, por lo que es necesario identificar epítopes inmunogénicos específicos de antígenos de VPH. Esto dificulta la producción de una vacuna basada en péptidos que sea efectiva en varios pacientes con diferentes haplotipos de HLA, resultando poco práctico para su producción a gran escala. Adicionalmente, las vacunas basadas en péptidos tienen baja inmunogenicidad por lo que requieren de adyuvantes como citocinas, quimiocinas o moléculas estimuladoras.⁸⁵

Por otro lado, las vacunas basadas en proteínas contienen todos los epítopes antigénicos, evitando así la restricción por MHC. Sin embargo, a pesar de que estas vacunas son seguras, tienen baja inmunogenicidad y debido a su naturaleza exógena, las vacunas basadas en proteínas son presentadas a través del MHC clase II, por lo que inducen principalmente una respuesta mediada por anticuerpos.⁸⁵ Diferentes vacunas basadas en proteínas han sido probadas en ensayos clínicos, dentro de los cuales, los que utilizan proteínas fusionadas han mostrado activar una eficiente respuesta inmune. Frazer y cols., probaron en 2004 una vacuna que contenía una fusión de las proteínas de VPH-16 E6/E7 con el adyuvante ISCOMATRIX en un estudio fase I. La administración de esta vacuna aumentó significativamente la respuesta de células T CD8+ contra las proteínas E6 y E7 en pacientes vacunados comparados con pacientes que recibieron placebo.¹⁰¹

Vacunas basadas en células

El uso de vacunas basadas en células dendríticas representa una estrategia potencialmente plausible para el tratamiento de neoplasias asociadas a la infección por VPH. La generación de estas vacunas requiere de cargar a las células dendríticas con antígenos virales mediante pulsaciones con péptidos antigénicos o la transducción de células dendríticas con DNA, RNA o vectores virales que codifiquen para alguna proteína viral.^{102, 103} Sin embargo, la preparación de células dendríticas es costosa, consume tiempo, requiere del procesamiento individual de células y no existe un criterio estándar para la evaluación de la calidad de estas.^{87, 88}

Se han reportado varios ensayos clínicos de vacunas basadas en células dendríticas en pacientes con cáncer. La mayoría de estos estudios son ensayos fase I/II enfocados en la evaluación de la viabilidad y seguridad de estas vacunas, donde se ha observado inducción

de respuesta inmune antígeno específica. Santin y cols., reportaron en 2002 que la inyección subcutánea de células dendríticas pulsadas con la proteína E7 de VPH-18 en una paciente con CaCU metastásico permitió la inhibición de la progresión del tumor. Aunque la vacuna no causó la remisión en el paciente, el estado de salud de la paciente mejoró y no se observaron efectos adversos.¹⁰⁴

Vacunas basadas en ácidos nucleicos

Las vacunas de DNA han surgido como una atractiva forma de vacuna terapéutica, ya que tiene varias ventajas sobre otras formas de vacunas terapéuticas. El DNA desnudo es seguro, estable, relativamente fácil de producir y puede ser utilizado para mantener la expresión de antígenos en células por periodos prolongados de tiempo.⁸⁷ Comparadas con vacunas basadas en vectores y células tumorales, las vacunas de DNA son relativamente seguras y pueden ser administradas repetidamente en el mismo individuo sin perder su eficacia.⁸⁵

Las vacunas de DNA se generan mediante la clonación de un gen de interés en plásmidos bacterianos que contienen promotores fuertes para inducir la expresión del gen de interés en las células. Estos plásmidos generalmente son crecidos en bacterias, se purifican mediante métodos convencionales y se utilizan mediante inyección directa.¹¹ Aunque los plásmidos contienen un origen de replicación que no es funcional en células humanas, existe cierta preocupación sobre las posibles consecuencias de inyectar DNA bacteriano en células humanas, ya que este podría potencialmente integrarse en el genoma del hospedero causando inestabilidad genómica, sin embargo no existe evidencia que demuestre esto.^{11, 87} No obstante, la evidente seguridad de las vacunas de DNA ha permitido la relajación en los requerimientos para su aprobación tanto por la FDA en Estados Unidos como las autoridades regulatorias competentes en Europa.¹⁰⁵ En este sentido, se han realizado diferentes ensayos clínicos para evaluar su seguridad y potencial terapéutico. En 2009, Weiner y cols., publicaron los datos sobre seguridad e inmunogenicidad de la vacuna VGX-3100, la cual está dirigida contra las proteínas E6 y E7 de VPH 16 y 18, y es liberada *in vivo* mediante electroporación. Esta vacuna es segura, bien tolerada y genera una respuesta inmune de linfocitos T citotóxicos antígeno-específica y anticuerpos contra los diferentes antígenos.¹⁰⁶

Terapia génica contra CaCU

La terapia génica consiste en la introducción de genes en células blanco para prevenir, curar o evitar la progresión de alguna enfermedad.¹⁰⁷ La terapia génica involucra el uso de genes para reemplazar algún gen que esté alterado, que codifiquen para un antígeno de origen infeccioso, tumoral, o para moléculas inmunorreguladoras de la respuesta inmune como citocinas y quimiocinas.¹³ En este sentido, esta estrategia ha llamado la atención

como una herramienta útil para llevar genes terapéuticos a sitios donde se desarrollan las neoplasias con diferentes objetivos, dentro de los que se incluyen: a) aumentar el rechazo inmune del tumor por el hospedero, b) disminuir la proliferación celular e incrementar el control del ciclo celular mediante la restauración de funciones de proteínas como p53 y RB, c) envenenar específicamente a las células tumorales mediante un diseño de dos pasos; incorporando una enzima seguido de la administración de un profármaco que se activa específicamente en las células tumorales que albergan la enzima, y d) lisar específicamente células tumorales defectuosas de las vías p53 o RB mediante virus oncolíticos, los cuales son capaces de invadir células tumorales.¹⁰⁸ Existen dos tipos principales de terapia génica, la terapia génica de células germinales y la terapia génica de células somáticas. La terapia génica de células germinales involucra la introducción de genes correctivos en células reproductoras o cigotos, con el objetivo de crear un cambio genético benéfico en su descendencia; mientras que la terapia génica de células somáticas consiste en la introducción de genes en células que no están relacionadas directamente con la reproducción, por lo que los cambios genéticos no son heredados a la descendencia.¹⁰⁹ En este sentido, es posible proponer diferentes formas para abordar la corrección de genes alterados para reestablecer el fenotipo normal en células transformadas, tales como la inserción del gen normal dentro de una célula o tejido de interés para reemplazar el gen, generar un intercambio del gen anormal mediante un proceso de recombinación homóloga, o bien, por medio de la regulación de un gen alterado, es decir, regular la expresión de los genes.¹³ En cáncer, la terapia génica propone el reemplazo o la modificación de la expresión de genes que promueven el proceso tumoral. Varios genes han sido propuestos para su uso en el tratamiento contra el cáncer mediante terapia génica, dentro de los que se incluyen genes que codifican para citocinas y moléculas coestimuladoras de superficie celular, quimiocinas para la activación de la respuesta inmune sistémica contra antígenos específicos de tumor y genes que codifican para antígenos específicos de tumor.

Sin embargo, la actual terapia génica requiere de dos componentes esenciales: (i) un gen terapéuticamente efectivo que pueda ser expresado en un sitio en particular y (ii) un sistema de liberación eficiente, seguro y con baja toxicidad que libere los genes terapéuticos con alta eficiencia en células diana o tejidos de forma controlable.^{15, 107, 110} En este sentido, los vectores no virales como el DNA desnudo, los complejos DNA-liposomas y complejos DNA-polímeros han mostrado un gran potencial como sistemas de liberación por su baja inmunogenicidad, ausencia de recombinación de virus endógenos, bajo costo de producción y reproducibilidad.¹⁵

Polímeros catiónicos

Recientemente, la biomedicina se ha enfocado en la búsqueda de nuevos compuestos como vehículos para transportar y liberar material terapéutico de forma localizada y con baja toxicidad. Dentro de estos compuestos, el uso de polímeros catiónicos ha llamado la atención como sistemas de liberación de drogas, proteínas y vacunas, debido a que poseen diversas ventajas sobre otros vectores como baja inmunogenicidad, baja o nula toxicidad, la posibilidad de administraciones repetidas y la facilidad para establecer prácticas adecuadas de manufactura (GMP).^{15, 111}

En la actualidad las micropartículas poliméricas biodegradables han sido investigadas como acarreadoras de DNA y como sistemas de liberación de genes debido a su habilidad para condensar eficientemente el DNA plasmídico e interactuar con la membrana celular.¹¹² Además, el encapsulamiento del DNA plasmídico en estas micropartículas puede proporcionar protección al DNA del medio antes de la liberación y ayudar en la selección de un tipo celular específico para una liberación eficiente.¹¹³

Existe una amplia gama de polímeros catiónicos que han sido estudiados por su potencial como vehículos de liberación de genes, como: polietilenimina (PEI),¹¹⁴⁻¹¹⁷ poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA),¹¹⁸⁻¹²⁰ poli-L-lisina (PLL),^{121, 122} poli-3-guanidopropilmetacrilato (pGuaM),¹²³ ciclodextrina,^{124, 125} polipéptidos,^{126, 127} dendrímeros¹²⁸⁻¹³⁰ y quitosán. Dentro de estos polímeros, el quitosán es un excelente polímero usado en la terapia génica no viral con diversas aplicaciones biomédicas con un alto potencial para el tratamiento del CaCU.

Chitosán

El quitosán o también denominado quitosano, es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, que forma parte del exoesqueleto de artrópodos y micelas fúngicas. Es un heteropolímero constituido por subunidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidas por un enlace β (1,4) glucosídico.^{131, 132} (Figura 6). Particularmente, el quitosán posee las propiedades de ser biocompatible, biodegradable, mucoadhesivo, antimicrobiano, antifúngico y tiene muy baja toxicidad.^{16, 133} Debido a que el quitosán está cargado catiónicamente, este puede complejarse con DNA plasmídico (el cual está cargado negativamente debido a sus grupos fosfato), por lo que es un buen candidato como sistema de liberación de genes.¹³⁴ El quitosán no requiere de ultrasonidos y/o disolventes orgánicos para su preparación, lo que minimiza los posibles daños al DNA durante la formación de las micropartículas.¹³¹ Adicionalmente, el quitosán tiene la capacidad de proteger al DNA de la degradación por nucleasas, ha mostrado ser altamente efectivo en la transgénesis de diversas líneas celulares,^{16, 134} y es un excelente

polímero para la liberación a largo plazo de genes terapéuticos en células tumorales, lo que favorece su uso para el tratamiento del cáncer.

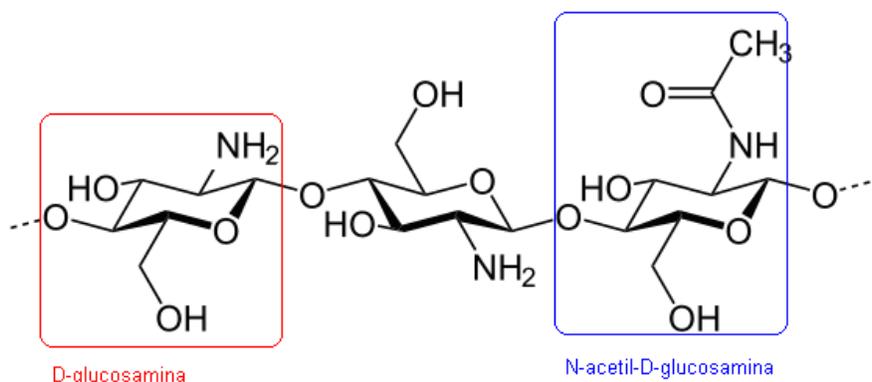


Figura 6. Estructura química del quitosán.

Tomado de: Paños *et al*, 2008.

Fuente

La quitina es el segundo polímero natural más abundante en el mundo después de la celulosa. Este biopolímero se encuentra presente en el exoesqueleto de artrópodos y crustáceos.¹³⁵ El quitosán es un biopolímero natural producto de la N-desacetilación parcial de la quitina mediante un proceso enzimático por medio de la enzima quitina-desacetilasa o sintetizado químicamente mediante soluciones alcalinas (Figura 7). El quitosán tiene un grupo amino primario y dos grupos hidroxilo libres por cada subunidad C₆. Debido a la fácil disponibilidad de grupos amino libres en el quitosán, éste tiene una carga positiva y capaz de interactuar con compuestos cargados negativamente.

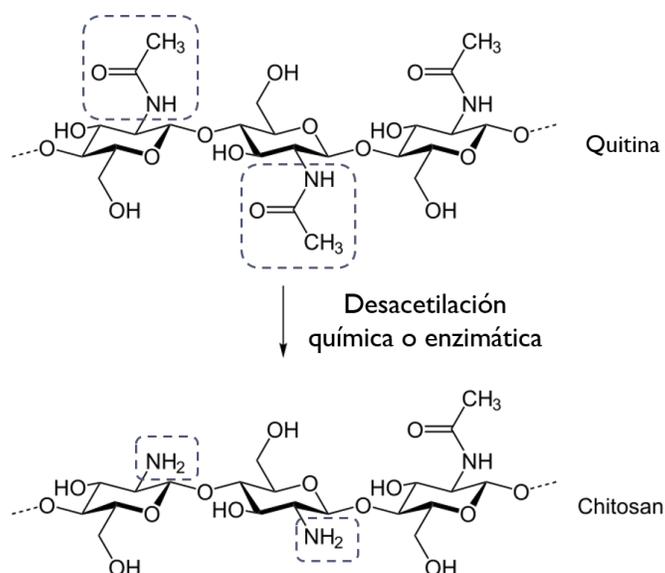


Figura 7. Proceso de desacetilación de la quitina.

Tomado de: Sashiwa & Aiba, 2004.

El tamaño de partícula, densidad, viscosidad, el grado de desacetilación y peso molecular son características importantes del quitosán las cuales influyen en las propiedades de formulaciones farmacéuticas basadas en quitosán. La tabla 5 resume algunas de las características fisicoquímicas del quitosán.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del quitosán

Parámetro	Descripción
Apariencia (polvo)	Blanco o amarillo
Tamaño de partícula	Menor a 30 μm
Viscosidad (1% solución/ 1% ácido)	Menor a 5 cps
Densidad	Entre 1.35 a 1.40 g/cm ³
Peso molecular	50 000 a 2 000 000 Da
pH	6.5 a 7.5
Contenido de humedad	Mayor a 10%
Grado de desacetilación	66% a 99.8%

Modificado de Bansal et al, 2011.

Propiedades Fisicoquímicas del Quitosán

Peso molecular

El peso molecular del quitosán es dependiente de la fuente de materia prima y el método de preparación. El peso molecular de la quitina natural es aproximadamente de un millón de Daltons (Da), mientras que del quitosán depende de la cantidad promedio de subunidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina con un rango de peso que va de los 100 000 Da a 1 200 000 Da.¹³⁶ El peso molecular del quitosán puede ser determinado por varios métodos como cromatografía,¹³⁷ dispersión de luz¹³⁸ y viscosimetría.¹³⁹

Grado de desacetilación

El proceso de desacetilación de la quitina para la producción del quitosán, disminuye la cantidad de grupos amido y aumenta la cantidad de grupos amino en el polímero, por lo que la caracterización del quitosán requiere la determinación de su grado de desacetilación (DA). El DA del quitosán está relacionado con la proporción de D-glucosamina respecto a N-acetil-D-glucosamina presente en el polímero y está directamente relacionado con la capacidad del polímero para absorber humedad, la viscosidad y la solubilidad.¹⁴⁰ Esta propiedad puede ser evaluada por diversas técnicas, tales como difracción de luz infrarroja (IR), análisis elemental, reacción enzimática, espectrofotometría de luz ultravioleta, resonancia magnética nuclear (RMN) 1H en estado líquido y RMN 13C en estado sólido.¹⁴¹ Según el grado DA de la quitina pueden obtenerse tres tipos diferentes de compuestos:¹⁴²

- Quitina: Más del 50% del polímero está formado por subunidades de N-acetil-D-glucosamina.
- Chitosán: Más del 50% del polímero está formado por D-glucosamina.
- Quitano: Formado únicamente por D-glucosamina

Solubilidad

El chitosán es una base débil y es insoluble en agua y disolventes orgánicos, pero es soluble en soluciones ácidas orgánicas con un pH menor a 6.5.¹⁴³ La solubilización ocurre por la protonación de los grupos amino (NH₂) de la posición C-2 de las unidades repetidas de D-glucosamina, donde el polisacárido es convertido a un polielectrolito en medio ácido.¹⁴⁴ Debido a esto, la solubilidad del chitosán está relacionada con la cantidad de grupos amino en el polímero, a pH ácido estos grupo se protonan formando grupos amina incrementando la solubilidad del chitosán. Mientras que a pH básico los grupos amino se desprotonan y provocan que el chitosán se precipite y sea insoluble.¹³⁵

Viscosidad

La viscosidad es un factor importante en la determinación convencional de peso molecular del chitosán y en la determinación de sus aplicaciones comerciales en entornos biológicos complejos. La viscosidad del chitosán se ve afectada por factores como el grado de desacetilación, el peso molecular, la concentración de la solución, la fuerza iónica, el pH y la temperatura.¹⁴⁵ Adicionalmente, la viscosidad del chitosán también puede ser afectada por tratamientos físicos como el calentamiento, esterilización por autoclave y ultrasonido; y por tratamientos químicos (ozono).¹⁴⁶ La viscosidad del chitosán comercial al 1% (m/v) disuelto en ácido acético al 1% varía de 10 a 1000 cP.¹⁴⁵

Actividad Biológica

El chitosán presenta diversas actividades biológicas interesantes, que lo ha convertido en uno de los polisacáridos cada vez más importante. Dentro de sus actividades biológicas notables se incluyen la actividad antitumoral, actividad inmunoadyuvante, la actividad hipolipemiente, mucoadhesión, aceleración de la cicatrización de heridas, la actividad hemostática y actividad antimicrobiana.^{147, 148} Adicionalmente, el chitosán tiene la característica de baja o nula toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, por lo que ha llamado gran atención en el área farmacéutica y biomédica. El chitosán también es un polímero prometedor como vehículo de liberación de genes, soporte en cultivo celular y la ingeniería de tejidos.^{135, 148}

Mucoadhesividad

Se ha demostrado que el chitosán posee propiedades mucoadhesivas debido a las fuerzas moleculares de atracción formadas por interacciones electrostáticas entre el chitosán

cargado positivamente y la superficie mucosa cargada negativamente.^{142, 149} Estas propiedades pueden ser atribuidas a:

- Fuertes grupos de enlaces de Hidrógeno como –OH, –COOH.¹⁵⁰
- Cargas fuertes.¹⁵¹
- Alto peso molecular.^{152, 153}
- Suficiente flexibilidad de cadena.¹⁵⁴
- Propiedades de energía superficial que favorecen la difusión en él.¹⁵⁵

Aplicaciones biomédicas del chitosán

Debido a sus propiedades fisicoquímicas y a su actividad biológica, el chitosán ha llamado la atención en el área farmacéutica y biomédica. Dentro de las aplicaciones en el área biomédica que se han estudiado, se encuentra la ingeniería de tejidos, el tratamiento de quemaduras, el desarrollo de piel artificial, la cicatrización de heridas, el vendaje para heridas y el desarrollo de lentes oculares de vendaje.¹⁵⁶

La tabla 6, resume algunas de las propiedades farmacológicas del chitosán que se han reportado, tales como la acción hipocolesterolémica, la actividad antiácida y la actividad anti-ulcerosa.¹³⁵

Tabla 6. Aplicaciones biomédicas potenciales del Chitosán

Aplicaciones Biomédicas Potenciales	Característica Principal
Suturas quirúrgicas	Biocompatible
Implantes Dentales	Biodegradable
Piel Artificial	Renovable
Reconstrucción de huesos	Formación de películas
Lentes de contacto	Agente hidratante
Liberación de drogas para animales y humanos	No toxicidad, tolerancia biológica
Material encapsulante	Hidrolizado por lisozima
	Cicatrización de heridas
	Actividad antibacterial, antifúngica y antivírica

Modificado de Rinaudo 2006

Chitosán como sistema de liberación de DNA

El desarrollo de nuevos sistemas de soporte para la administración de genes representa una tecnología que permite el tratamiento de muchos trastornos genéticos. Sin embargo, una barrera crítica para la terapia génica con éxito sigue siendo la formulación de un vehículo de liberación eficiente y seguro. Los sistemas de liberación no virales han sido

propuestos cada vez más como alternativa a los vectores virales debido a su seguridad, estabilidad y capacidad de producción a gran escala.¹⁵⁷ Dentro de estos sistemas de liberación no virales, se han empleado complejos de DNA con portadores que contienen lípidos, proteínas, péptidos o polímeros, así como ligandos capaces de dirigir complejos de DNA a receptores de la superficie celular en células diana y ligandos para dirigir el tráfico intracelular del DNA al núcleo.^{158, 159}

Existen cinco barreras biológicas que deben considerarse para una buena liberación de genes: 1) estabilidad *in vivo*, 2) entrada a la célula, 3) escape endosomal, 4) tráfico intracelular y 5) entrada al núcleo (Figura 8). Los polímeros catiónicos son buenos sistemas de liberación debido a su naturaleza policatiónica, reduciendo así estas barreras biológicas mediante el encapsulamiento del DNA en partículas con carga positiva que se unen a la superficie celular y promoviendo un aumento en la endocitosis. En muchos casos, los polímeros catiónicos producen complejos estables ofreciendo mayor protección durante el tráfico intracelular comparado con lípidos catiónicos.¹³²

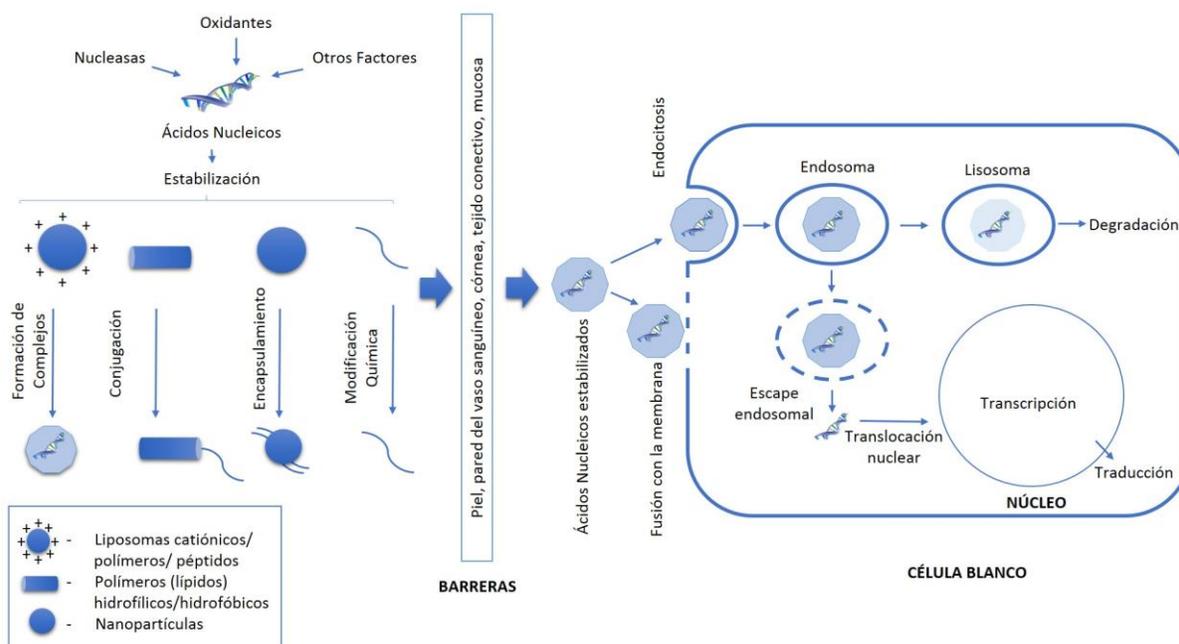


Figura 8. Barreras y estrategias de la liberación de ácidos nucleicos.

Tomado de: Zhu & Mahato, 2010.

Particularmente, se ha propuesto el uso de quitosán como sistema de liberación de genes debido a sus propiedades biológicas y su bajo costo.¹⁵⁶ La formación de complejos quitosán-DNA aumenta la eficiencia de transfección, la cual depende del tipo celular, la concentración de suero, el pH y el peso molecular del quitosán.¹³² Se ha reportado que la eficiencia de transfección es mayor en pH menor a 7, debido a que a este pH los grupos

amino se encuentran protonados facilitando la unión de los complejos con la superficie celular. Adicionalmente, la eficiencia de transfección mediada por chitosán de alto peso molecular (>100 kDa) es menor que la del chitosán de bajo peso molecular (15 – 52 kDa).¹³² El bajo costo del chitosán, su capacidad de formar complejos con el DNA plasmídico, la estabilidad de los complejos, la capacidad del chitosán para proteger al DNA por nucleasas, la baja toxicidad de los complejos y su disociación a pH ácido (pH 5.0) compatible con el pH del cérvix; son propiedades de mucha relevancia que soportan su posible aplicación como tratamiento tópico de las lesiones cervicales y neoplasias. Adicionalmente, su envasado en un sistema de spray permitirá su fácil aplicación de forma directa sobre la lesión obteniendo un efecto local.

Modelos experimentales de CaCU

El establecimiento de modelos experimentales para el estudio del CaCU para el desarrollo y evaluación de nuevas estrategias enfocadas en su control y tratamiento ha sido muy complicado. Los primeros reportes de modelos experimentales de CaCU están basados en tumores inducidos mediante la administración de agentes químicos como poliuretano,¹⁶⁰ colantreno¹⁶¹ o benzopireno,¹⁶² incluso mediante la aplicación de smegma humano;¹⁶³ sin embargo, en estos reportes no interviene el VPH como agente etiológico del CaCU. Posteriormente se desarrollaron modelos de CaCU basados en papilomas en conejos asociados a virus del papiloma de conejos, sin embargo la limitante de este modelo es la especificidad del virus y su extrapolación en humanos.¹⁶⁴ Se han generado otros modelos basados en la administración de líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino VPH 16 y 18 positivos en ratones desnudos. Sin embargo estos modelos no pueden ser utilizados para evaluar estrategias terapéuticas basadas en la activación de la respuesta inmune, ya que son modelos inmunodeficientes.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Estudios más recientes reportan el uso de líneas celulares singénicas transformadas con los oncogenes E5, E6 y E7 del VPH para generar tumores localizados en el dorso de ratones^{95, 168} y el desarrollo de lesiones proliferativas en sitios múltiples de la mucosa epidermal y escamosa, incluyendo la mucosa cérvicovaginal.^{165, 166, 169, 170} Sin embargo, a pesar de que estos modelos incluyen al VPH como agente causal, los fenotipos resultantes neoplásicos o malignos son diferentes al desarrollo de la enfermedad clínica causada por la infección del VPH, ya que algunos de estos modelos han sido expuestos a suplementos de crecimiento *ex vivo*, crecen en lugares fuera de la región cérvicovaginal o el desarrollo de CaCU es un evento secundario.^{160, 171, 172} Debido a esto, es necesario el desarrollo de un nuevo modelo experimental que se aproxime al desarrollo de CaCU por la infección con VPH y se desarrolle en el sitio natural de la infección. El desarrollo de este modelo experimental facilitará el estudio tanto de los factores involucrados en el desarrollo del CaCU, así como en el desarrollo de nuevas estrategias de control y tratamiento del CaCU.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino como un problema de salud pública global, merece especial atención en su diagnóstico, control y tratamiento. Las lesiones cervicales y hasta ciertos estadios neoplásicos se desarrollan de manera localizada y externa, lo cual puede ser favorable para su tratamiento *in situ*. Recientemente, los polímeros biodegradables han llamado la atención como vehículos para encapsular, transportar y liberar moléculas con potencial terapéutico. Particularmente el quitosán, debido a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradación y baja toxicidad es un buen candidato como vehículo para la liberación de genes terapéuticos en el tratamiento de lesiones pre-malignas y del CaCU. La combinación de micropartículas de quitosán acopladas a DNA plasmídico con el gen de IL-12 en un sistema de spray evaluado en un modelo murino de cáncer cervicouterino positivo al VPH 16, tendrá un efecto sobre la activación de la respuesta inmune favoreciendo la inhibición de la progresión del crecimiento tumoral. Esta estrategia nos permitirá establecer un acercamiento más real a lo que ocurre con los pacientes y con una perspectiva con mayor impacto para el tratamiento local o tópico de lesiones pre-malignas del cérvix y del CaCU.

HIPÓTESIS

El gen de IL-12 encapsulado en micropartículas de quitosán en un sistema de spray tendrá un efecto antitumoral en un modelo murino de cáncer cervicouterino VPH 16 positivo.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto antitumoral de la IL-12 encapsulada en micropartículas de quitosán-DNA plasmídico en spray en un modelo murino de cáncer cervicouterino VPH 16 positivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar complejos de quitosán con DNA plasmídico que contengan el gen de la interleucina 12 (chitosán/pDNA-IL12) de ratón y envasarlos en un sistema de spray.
2. Determinar la presencia y localización de los complejos quitosán/DNA plasmídico en células epiteliales de la mucosa cervical de ratones.
3. Evaluar la permanencia de las micropartículas de quitosán y la liberación del DNA plasmídico posterior a la aplicación de los complejos quitosán/pDNA en spray en la región cervicovaginal de ratones hembra Balb/c.
4. Generar un modelo murino de cáncer cervicouterino VPH 16 positivo en ratones hembra Balb/c.
5. Determinar el efecto de inhibición tumoral por la aplicación de micropartículas quitosán/pDNA-IL-12 en un modelo murino de cáncer cervicouterino VPH 16 positivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos

El plásmido pNGVL3-mIL12 que contiene el gen que codifica para IL-12, fue obtenido del Centro de Vectores de la Universidad de Michigan, el cual se ha utilizado para estudios de terapia génica. Tiene un peso molecular de 6,247 pb, contiene el promotor de citomegalovirus (CMV), genes que le confieren resistencia a Kanamicina y genes que codifican para las dos subunidades de IL-12 (p35 y p40) de ratón. El plásmido pcDNA3 tiene un peso molecular de 5,446 pb, contiene el promotor de CMV y genes que le confieren resistencia a neomicina y ampicilina. Es un plásmido vacío que no contiene genes terapéuticos insertados (Anexo 1).

Chitosán

En este trabajo se utilizó chitosán de bajo peso molecular ($C_{12}H_{24}N_2O_9$) con una viscosidad de 20 cP (Sigma Aldrich). La tabla 7 resume las características fisicoquímicas del chitosán utilizado para este trabajo.

Tabla 7. Características fisicoquímicas de Chitosán de Bajo Peso Molecular (Sigma-Aldrich)

PARÁMETRO	VALOR
Humedad (%)	10.46
Cenizas (%)	0.07
Nitrógeno (%)	7.17
Desacetilación (%)	75-85
Viscosidad (cP)	20 -300
Peso molecular (kDa)	50-190

Ratones

Se utilizaron ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad. Los ratones para este estudio no tienen ninguna deficiencia inmune 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).

Línea celular y cultivo

La línea celular BMK-16/myc es una línea celular murina co-transformada por la fusión del genoma del VPH 16 con el proto-oncogen c-Myc y expresa constitutivamente los oncogenes E6 y E7.¹⁶⁸ La línea celular se cultivó en medio mínimo esencial DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (Invitrogen Life Technologies, San Diego

California), 50 µg/ml de estreptomicina, 250 ng/ml de fungisona, a 37°C en presencia de 5% de CO₂ y una humedad relativa del 95%.

Purificación de plásmidos

Bacterias DH5-α fueron transformadas con los plásmidos pNGVL3-mIL12 y pcDNA3 y se inocularon en medio selectivo LB. El cultivo se mantuvo en agitación constante a 150 rpm y a 37°C durante toda la noche. Los plásmidos fueron purificados mediante columnas de intercambio iónico que tienen la capacidad de eliminar endotoxinas (Qiagen, Hilden Germany). La concentración de DNA fue determinada por espectrofotómetro midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260/280nm mediante un equipo NanoDrop ND-1000 (PEQLAB, Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany). Los plásmidos fueron caracterizados mediante digestión enzimática. Una vez purificados y cuantificados los plásmidos, se analizó la integridad de los mismos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los plásmidos fueron resuspendidos en agua estéril desionizada (Golden Bell) y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Formación de complejos chitosán/pDNA

Los complejos chitosán/pDNA fueron preparados por el método de coacervación, en el que un polímero en solución acuosa es separado en dos fases inmiscibles: una fase coacervada (complejos) y otra fase en equilibrio.¹⁷³ El chitosán es insoluble en medios alcalinos, por lo que precipita cuando se pone en contacto con una solución alcalina (Na₂SO₄), que funge como agente coacervante.¹⁷⁴ Se prepararon soluciones de chitosán de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich) con una concentración final de 0.50% en ácido acético al 2%. Las muestras de DNA plasmídico se disolvieron en solución de Na₂SO₄ al 20% hasta obtener una concentración final de 33µg/ml. Para la formación de las micropartículas de chitosán/pDNA se mezclaron el chitosán en solución (0.50%) y el pDNA en solución (33µg/ml) en relación 1:1 (v/v) en agitación durante una hora. Las micropartículas chitosán/pDNA fueron recuperadas por centrifugación y resuspendidas en agua desionizada. La cantidad de DNA plasmídico en el sobrenadante fue cuantificada por espectrofotómetro con el fin de determinar la cantidad de pDNA sin encapsular. El porcentaje de retención (%R) de DNA plasmídico por el chitosán se determinó para cada una de las formulaciones aplicando la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{(\text{pDNA}_{\text{Total}} - \text{pDNA}_{\text{Libre}})}{\text{pDNA}_{\text{Total}} \times 100}$$

Donde:

%R = Porcentaje de retención

pDNA_{Total} = Cantidad total de pDNA

pDNA_{Libre} = Cantidad de pDNA sin encapsular

Los complejos chitosán/pDNA se analizaron por ensayo de electroforesis en geles de retardamiento. Se realizó la separación de los complejos en gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio (BrEt) para su observación. Adicionalmente, con la finalidad de determinar la localización tanto del chitosán como del DNA plasmídico en las células del epitelio cervicovaginal, se formaron complejos chitosán/pDNA donde el DNA plasmídico estuviera marcado con Cy5 (chitosán/pDNA-Cy5) y complejos chitosán/pDNA donde el chitosán estuviera marcado con rodamina (chitosán-rod/pDNA).

Envasado de las micropartículas chitosán/pDNA en un sistema de spray

Los complejos de chitosán/pDNA generados de acuerdo al procedimiento previamente descrito, fueron envasados en recipientes acoplados a un sistema de aplicación Counting Pump manual (Pfieffer), líderes mundiales en envasado de drogas, vacunas y fármacos para aplicación biomédica. Las bombas de liberación están adaptadas a boquillas finas, un sistema de filtración de aire (0.02 μm), sistema de presión balanceada y un volumen de 50 μl por disparo (Anexo 2). El volumen final de complejos formados fue de 600 μL para 12 disparos o aplicaciones. La integridad de los complejos posterior a la aplicación mediante el sistema de spray se determinó con la evaluación de la liberación del DNA plasmídico posterior al disparo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Determinación de la presencia y localización celular de micropartículas en la mucosa cervical

El plásmido pcDNA3 fue marcado covalentemente con el colorante Cy5 utilizando el kit Label IT® Tracker™ Cy5 (Mirus) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la formación de los complejos chitosán/pcDNA3-Cy5 con el chitosán de bajo peso molecular como se describe anteriormente. Por otro lado, chitosán de bajo peso molecular fue marcado mediante enlace covalente con rodamina B (Sigma-Aldrich) como lo describe Odette Ma y col., (2008).¹⁷⁵ Posteriormente se realizó la formación de complejos chitosán-rod/pcDNA3 como se describe anteriormente. Se formaron dos grupos de ratones (n=4) y se les aplicó vía tópica en la región cervicovaginal 1 μg de DNA plasmídico acoplado a los complejos previamente formados en un volumen final de 10 μl . Se realizaron exudados cervicovaginales a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 horas). Los exudados cervicovaginales se montaron en portaobjetos y se aplicaron 20 μl de PBS 1X estéril como medio de montaje. La detección de la fluorescencia (rodamina B y Cy5) en los exudados cervicovaginales se realizó mediante microscopía confocal.

Determinación de la permanencia del chitosán

Para el ensayo de permanencia de chitosán en la región cervicovaginal de las ratonas, se utilizaron complejos chitosán-rod/pcDNA3. Se aplicaron 5 μg de DNA plasmídico acoplado a los complejos previamente formados en un volumen final de 10 μl en la región

cervicovaginal de ratones hembra Balb/c de seis semanas de edad y se realizaron exudados cervicovaginales a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 horas). Los raspados cervicovaginales se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (gel de retardamiento). La detección de la fluorescencia (rodamina B) en el gel de agarosa se realizó con el equipo Typhoon 9400 (GE Healthcare) con apoyo del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Modelo murino de CaCU

El procedimiento para el desarrollo del modelo tumoral murino se realizó de acuerdo con los lineamientos contenidos en el Manual para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Bioterio realizado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales [CICUAE UNAM, 2012]. De igual manera se siguieron las medidas recomendadas en el Reglamento del Bioterio del INSP.

El modelo murino de lesión en la región cervicovaginal se generó basados en el modelo descrito por Brito B y cols., (2007) solo que usando la línea celular BMK-16/myc transformada por el VPH 16.¹⁷⁶ El día previo a la administración de las células, los ratones fueron anestesiados con éter anhidro y posteriormente se les administraron 30 µl de ácido acético inmerso en un microbrush con la intención de generar una lesión cervical. Se administraron 2.5×10^5 células BMK-16/myc en el cérvix utilizando una micropipeta en un volumen máximo de 20 µl. La inoculación de las células tumorales en la vagina se realizó anestesiando a las ratonas con éter anhidro. El monitoreo de la implantación de las células tumorales se realizó 5 días después de la administración de las células usando un microscopio estereoscópico, las ratonas fueron anestesiadas previamente. Para caracterizar la implantación del modelo tumoral, se removió el cuello del útero para su posterior análisis. Se realizaron citologías cervicovaginales y se tomaron fotografías graduales de inducción de implantación del tumor. Se utilizaron raspados cervicovaginales para determinar la expresión de los oncogenes E6 y E7 por RT-PCR punto final como producto de las células tumorales (BMK-16/myc).

Determinación del efecto terapéutico de IL-12

Una vez generado el modelo murino de CaCU, se aplicaron 5 µg de DNA plasmídico acoplado a complejos previamente formados. La aplicación se realizó utilizando una micropipeta de 2-20 µl (Eppendorf PhysioCare) con un volumen final de 5 µl de complejo, 5 días después de haber sido implantadas las células BMK16/myc. La dosis terapéutica a evaluar fue de 5 µg de DNA plasmídico. La aplicación tópica (dosis única) de las micropartículas de quitosán-DNA plasmídico en el modelo murino de CaCU se realizó anestesiado a los ratones con lesión considerando así como día 0 el día de la aplicación. Posteriormente, se tomó el ratón por la cola para favorecer que los complejos se

difundieran por la región cervicovaginal. Se tomaron raspados cervicovaginales a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la aplicación (Anexo 3). Se realizó extracción de RNA total de los raspados cervicovaginales y se determinó por RT-PCR la expresión de los oncogenes E6 y E7.

Extracción de RNA de raspado cervicovaginal

Los raspados cervicovaginales de los procesos descritos anteriormente, fueron resuspendidos en 100 µl de PBS 1X estéril. La extracción de RNA total se realizó aplicando 1 ml del reactivo de TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science). La muestra se centrifugó a 12,000 rpm en presencia de 200 µl de cloroformo. Del centrifugado, se colectó la fase transparente y se precipitó con isopropanol. El RNA fue resuspendido en H₂O libre de RNasas y DNasas, se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un equipo NanoDrop ND-1000 (PEQLAB, Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany), y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA)

La síntesis de la cadena complementaria del DNA (cDNA) se realizó utilizando 1 µg de RNA total, en presencia de 2.5 U/µl de Transcriptasa Reversa MMLV (Invitrogen Life Technologies, San Diego California), 1 U/µl de inhibidor de RNasa, 4 µl de la mezcla de 2.5 mM dNTPs, en 1X de buffer de reacción (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 MgCl₂ and 50 mM DTT) en un volumen final de 20 µl. La mezcla de reacción fue incubada a 37°C por 1 hora y posteriormente almacenada a -20°C.

RT-PCR tiempo real para los oncogenes E6/E7

La reacción de RT-PCR en tiempo real para medir la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH 16 se realizó en un equipo ABI-PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) mediante el protocolo de FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche Applied Science) y sondas TaqMan diseñadas para E6 y E7 de VPH 16 (Applied Biosystems). Brevemente, las reacciones se llevaron a cabo usando 1 µl de cDNA, 5 µl 1X FastStart Universal Probe Master, 0.5 µl de mezcla de sonda TaqMan y primers (para cada gen) en un volumen final de 10 µl. Se realizó un análisis para el diseño de los oligonucleótidos y las sondas TaqMan utilizando el programa FileBuilder (Applied Biosystems) para los oncogenes E6 y E7 de VPH 16, correspondiendo un juego de oligonucleotidos y una sonda TaqMan para cada gen como se describe en la tabla 8. Adicionalmente, se amplificó el gen GAPDH, el cual se utilizó como control endógeno.

Tabla 8. Oligonucleótidos y sondas Taqman utilizadas para el RT-PCR tiempo real

GEN	SECUENCIA	SONDA*	TAMAÑO
GAPDH	Mm00484668_m1		
E6 (VPH16)	S: GAGCGACCCAGAAAGTTACCA A: TGTTGCTTGCGAGTACACACATTCTAATAT	FAM: CAGCTCTGTGCATAACT	89 pb
E7 (VPH16)	S: CCGGACAGAGCCCATTACAATAT A: GAATGTCTACGTGTGTGCTTTGT	FAM: CTACGCTTCGGTTGTGCG	91 pb

*Sonda TaqMan

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 384 pozos con las siguientes condiciones de reacción: Los parámetros de la amplificación fueron: 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 10 s y 60°C durante 1 min para cada determinación utilizando el método de cuantificación relativa (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones de amplificación PCR-tiempo real

	ACTIVACIÓN POLIMERASA	PCR	
	Mantener	CICLO (40 Ciclos)	
		Desnaturalizar	Amplificar
TIEMPO	10 min	15 seg	1 min
TEMPERATURA	95 °C	95 °C	60 °C

El análisis de la expresión cuantitativa de cada gen se realizó mediante el método comparativo C_T (Método $2^{-\Delta\Delta C_T}$).

RESULTADOS

Purificación de plásmidos

Los plásmidos pNGVL3-mIL-12 y pCDNA3 fueron purificados a gran escala libre de pirógenos y endotoxinas, mediante columnas de intercambio iónico, para no alterar la respuesta inmune debido a antígenos externos. La figura 9 muestra la integridad de los plásmidos purificados en un gel de agarosa al 1%. El plásmido pNGVL3-mIL-12 tiene un peso molecular de 6,247 pb y el plásmido pCDNA3 tiene un peso molecular de 5,446 pb.

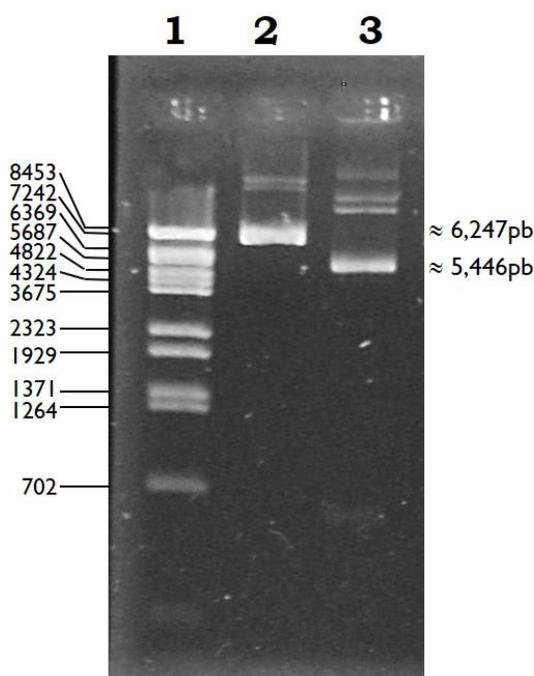


Figura 9. Purificación de los plásmidos pNGVL3-mIL12 y pCDNA3.

1) Marcador de Peso Molecular (Lambda DNA/Eco91I, 2) Plásmido pNGVL3-mIL12, 3) Plásmido pCDNA3. Se observa la integridad de las conformaciones moleculares superenrollada, intermedia y relajada de los plásmidos. Plásmidos no linealizados.

Formación y caracterización de los complejos chitosán/pDNA

Los complejos chitosán/pDNA fueron generados por el método de coacervación, usando chitosán de bajo peso molecular al 0.25% y DNA plasmídico. Para determinar la capacidad de encapsulamiento del chitosán, se midió la eficiencia de encapsulamiento (%R) de manera indirecta mediante espectrofotometría. Se cuantificó la cantidad de plásmido sin encapsular (sobrenadante), infiriendo la cantidad de plásmido encapsulado por el chitosán. La eficiencia de encapsulamiento fue determinada por triplicado para cada uno de los complejos formados. Partiendo de que la cantidad total de plásmido (30 µg) será

igual a la suma del plásmido no encapsulado y el plásmido encapsulado por el quitosán, la eficiencia de encapsulamiento (%R) fue determinada de manera indirecta utilizando la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{(pDNA_{Total} - pDNA_{Libre})}{pDNA_{Total}} * 100$$

La figura 10 muestra la eficiencia de encapsulamiento para cada uno de los complejos formados. La eficiencia de encapsulamiento del plásmido pNGVL3-mIL12 (6.2 Kb) fue desde 89.9% hasta 94.0%, y para el plásmido pcDNA3 (5.4 Kb) fue desde 80.9% hasta 89.7%. Se puede observar una tendencia entre la eficiencia de encapsulamiento del quitosán y el peso molecular del DNA plasmídico. Por otro lado, en los complejos quitosán/pDNA donde el quitosán es marcado con Rodamina, la eficiencia de encapsulamiento se mantiene en un 89.7% a 95.0%. No obstante, cuando el DNA plasmídico es marcado con Cy5, encontramos que la eficiencia de encapsulamiento disminuye hasta un 52.0% a 58.8%. Esta baja eficiencia puede ser debida a que se utilizó una menor cantidad de DNA marcado, además la unión covalente de la Cy5 con el DNA plasmídico puede generar un impedimento estérico que limita la formación de los complejos con el quitosán. Con estos resultados, se demuestra que el quitosán puede encapsular los plásmidos pNGVL3-mIL12 y pcDNA3 en altos porcentajes.

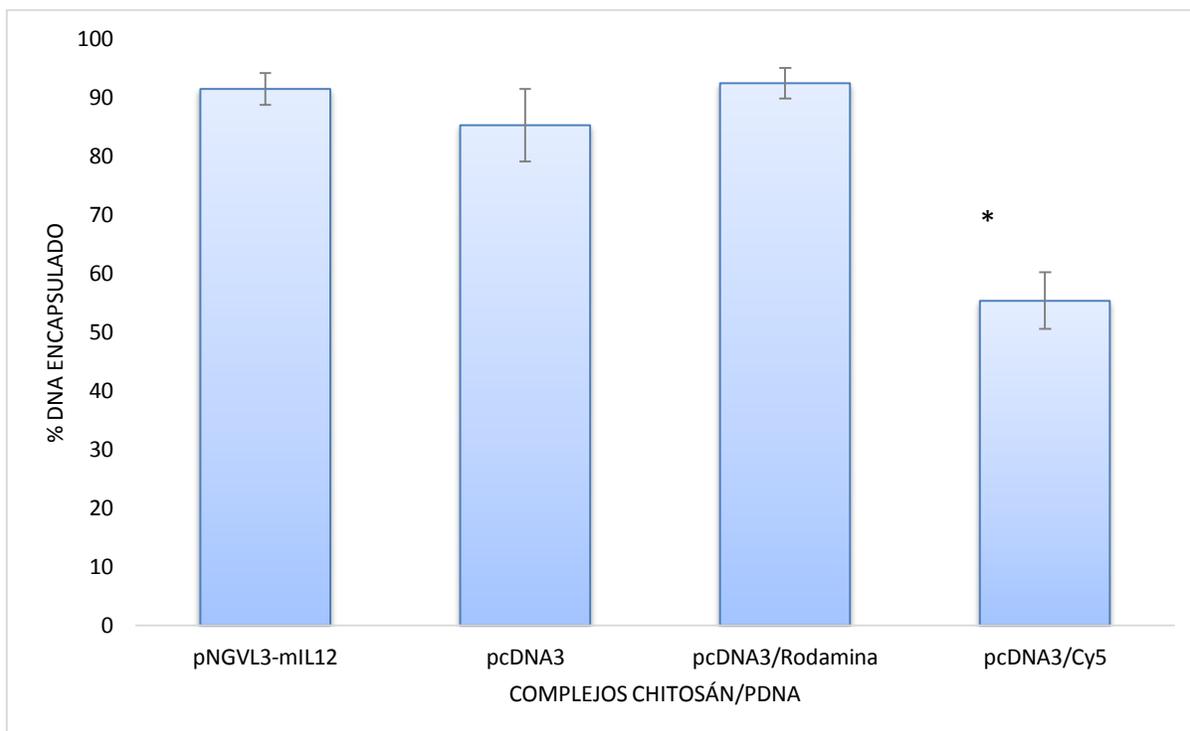
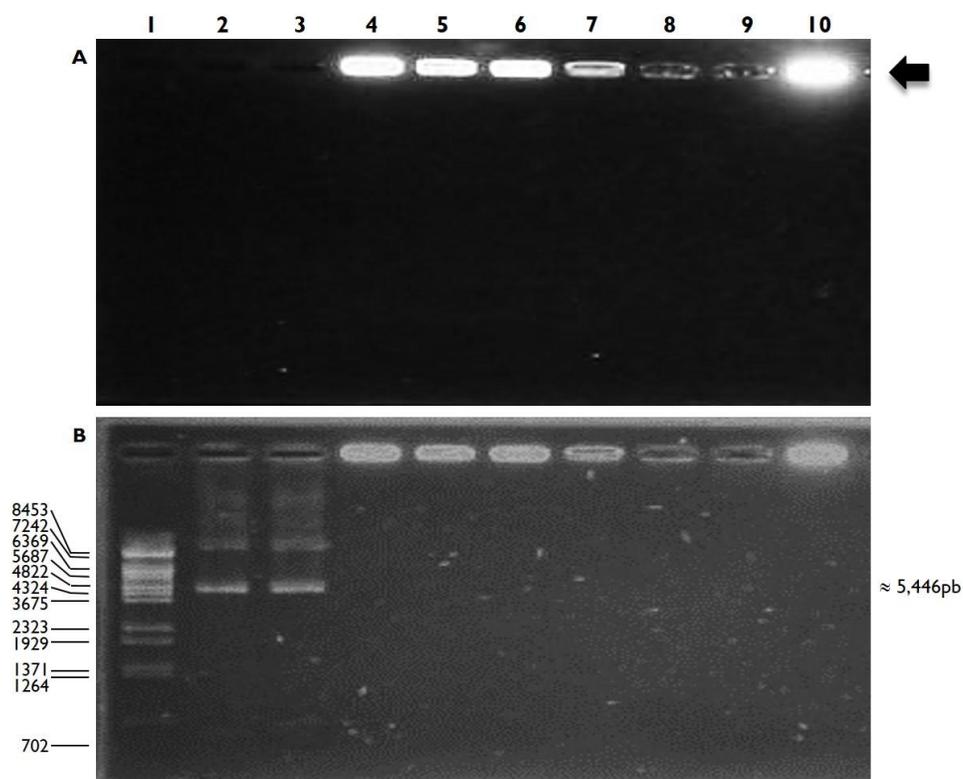


Figura 10. Eficiencia de encapsulamiento de los plásmidos pNGVL3-mIL12, pcDNA3, pcDNA3/Cy5 y pcDNA3/Rodamina por quitosán de bajo peso molecular al 0.25%.

*Los complejos quitosán/pCDNA3-Cy5 fueron preparados con 5 µg de pDNA.

Una vez determinado el porcentaje de encapsulamiento, se caracterizaron los complejos chitosán/pDNA formados mediante un ensayo de retardamiento en gel de agarosa al 1%. La figura 10 muestra la integridad de los complejos chitosán-rod/pDNA. En La figura 11A se muestra el chitosán marcado con Rodamina en complejo con el pDNA en un gel no teñido con BrEt. Se observa como la rodamina se une covalentemente al chitosán y al ser expuesta a luz UV emite fluorescencia. Los complejos chitosán-rod/pDNA no migran en el gel debido a su elevado peso molecular (carriles 4-7, 10). En la figura 11B se muestra como al ser teñido el gel con BrEt, un agente intercalante usado como marcador de ácidos nucleicos, puede observarse la integridad del pDNA migrando de acuerdo a su peso molecular (carriles 1 y 2). La integridad y movilidad electroforética del pDNA no se ven afectadas por el tratamiento con Na_2SO_4 (carril 3). Por otro lado, cuando el pDNA es encapsulado por el chitosán, los complejos chitosán-rod/pDNA son retenidos y no migran a través del gel debido a su peso molecular (carriles 6 a 10). La cantidad de pDNA sin encapsular es tan pequeña que no es posible ser visualizada en el gel (carril 7), sin embargo es cuantificable espectrofotométricamente.



1) Marcador de Peso Molecular (Lambda DNA/ECO911), 2) DNA plasmídico, 3) DNA plasmídico + Na_2SO_4 al 20%, 4) Chitosán, 5) Chitosán + Na_2SO_4 al 20%, 6) Complejo chitosán/pDNA, 7) Sobrenadante, 8) Complejo chitosán/pDNA (Lavado 1), 9) Complejo chitosán/pDNA (Lavado 2), 10) Complejo chitosán/pDNA (Puro).

Figura 11. Ensayo de retardamiento en gel de los complejos chitosán-rod/pDNA.

A) Gel de agarosa al 1% expuesto a luz UV previo a la tinción con BrEt, se observa solo chitosán marcado con Rodamina. B) Gel teñido con BrEt y expuesto a luz UV, se observa pDNA y complejos chitosán-rod/pDNA.

Estabilidad de los complejos Chitosán/pDNA posterior a su aplicación mediante una bomba de spray

Para determinar si la estabilidad de los complejos no se ve afectada debido a su envasado en un sistema de spray, se evaluó la integridad de los complejos chitosán-pDNA después de su aplicación mediante este sistema. Una vez aplicados con el sistema de spray, los complejos fueron recuperados para evaluar su integridad mediante electroforesis en agarosa. En la figura 12 se muestra un gel teñido con BrEt, donde se puede observar en la parte superior del gel a los complejos chitosán/pDNA, que debido a su elevado peso molecular no migran a través de este (carriles 3 y 4). En el carril 3 se observa cómo después del primer disparo no hay liberación de pDNA y después de cinco disparos este resultado se mantiene (carril 4). Con estos resultados se determinó que no se ve afectada la integridad de los complejos chitosán/pDNA por su aplicación mediante un sistema de spray.

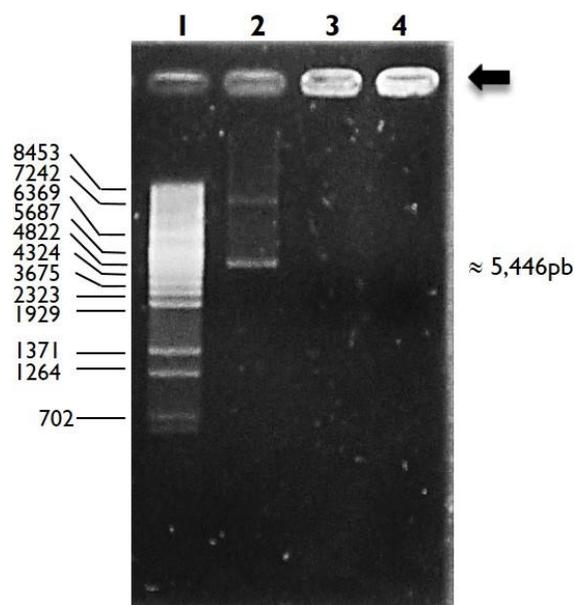


Figura 12. Integridad de los complejos chitosán/pDNA posterior al disparo.

No se observa liberación de pDNA. 1) Marcador de Peso Molecular (Lambda DNA/Eco91I, 2) Plásmido pCDNA3 (50ng), 3) Complejos recuperados al primer disparo, 4) Complejos recuperados al quinto disparo.

Localización celular del pDNA y el chitosán

Para determinar la presencia y localización celular del DNA plasmídico en las células epiteliales de la mucosa cervicovaginal de los ratones por la aplicación de los complejos chitosán-pDNA, el DNA plasmídico fue marcado covalentemente con Cy5 previo a la formación de los complejos. Una vez aplicados los complejos chitosán/pDNA-Cy5

mediante un sistema de spray en la región cervicovaginal de los ratones, se realizaron raspados cervicovaginales con microbrush posterior a la aplicación y 24 horas después. La presencia de Rodamina y Cy5 en las células epiteliales de la mucosa cervical se observó mediante microscopía confocal. En la figura 13 se muestra que posterior a la aplicación de los complejos chitosán-pDNA-Cy5 y a las 24 horas, no fue posible detectar al DNA plasmídico. Cuando se evaluó la presencia de chitosán marcado con Rodamina en la mucosa cervical, se detectó el chitosán en baja intensidad posterior a la aplicación, y a las 24 horas no se detecta señal. Estos resultados pueden deberse a que la boquilla de la bomba de spray no es adecuada al tamaño anatómico del cérvix de las ratonas lo cual no favorece la entrada de los complejos chitosán/pDNA. Debido a esto, los ensayos posteriores de aplicación local en la mucosa cervicovaginal de las ratonas, se realizaron de forma directa mediante una punta fina de micropipeta, ya que esta es más estrecha y los complejos chitosán/pDNA se pueden aplicar con mayor profundidad en la región cervicovaginal.

Una vez aplicados los complejos chitosán/pDNA-Cy5 mediante micropipeta en la región cervicovaginal de las ratonas, se realizaron raspados cervicovaginales con microbrush posterior a la aplicación, 24, 48 y 72 horas después. La presencia de Rodamina y Cy5 en las células epiteliales de la mucosa cervical se observó mediante microscopía confocal. En la figura 14 se observa en color verde la presencia del DNA plasmídico marcado con Cy5, indicando la presencia de los complejos. Se puede observar que el DNA plasmídico es detectado fuera y en el interior de las células cervicales posterior a la aplicación. A las 24 horas el DNA plasmídico se detecta claramente en el interior de las células epiteliales y se mantiene hasta las 72 horas posteriores a la aplicación de los complejos.

El interés adicional, fue identificar la presencia y localización del DNA plasmídico con mayor profundidad en el interior de la célula epitelial. Mediante microscopía confocal se realizaron cortes longitudinales a diferentes profundidades de la célula mediante planos focales, y se determinó si el DNA plasmídico de los complejos chitosán/pDNA-Cy5 se encuentra en el interior de la célula o adherido a la membrana celular de forma superficial. En la figura 15, se observa que posterior a la aplicación de los complejos, el DNA plasmídico se localiza principalmente adherido a la membrana celular y se detecta muy poco en el citoplasma celular. Veinticuatro horas posteriores a la aplicación de los complejos chitosán/pDNA-Cy5, el DNA plasmídico se localiza en su mayoría en el citoplasma de las células epiteliales de la mucosa cervicovaginal. Con estos resultados se demuestra que la aplicación complejos chitosán/pDNA-Cy5 en la mucosa cervicovaginal, el DNA plasmídico es internalizado a las células epiteliales lo que puede favorecer la expresión del transgen. Adicionalmente, se especula que el chitosán puede favorecer la transgénesis *in vivo*.

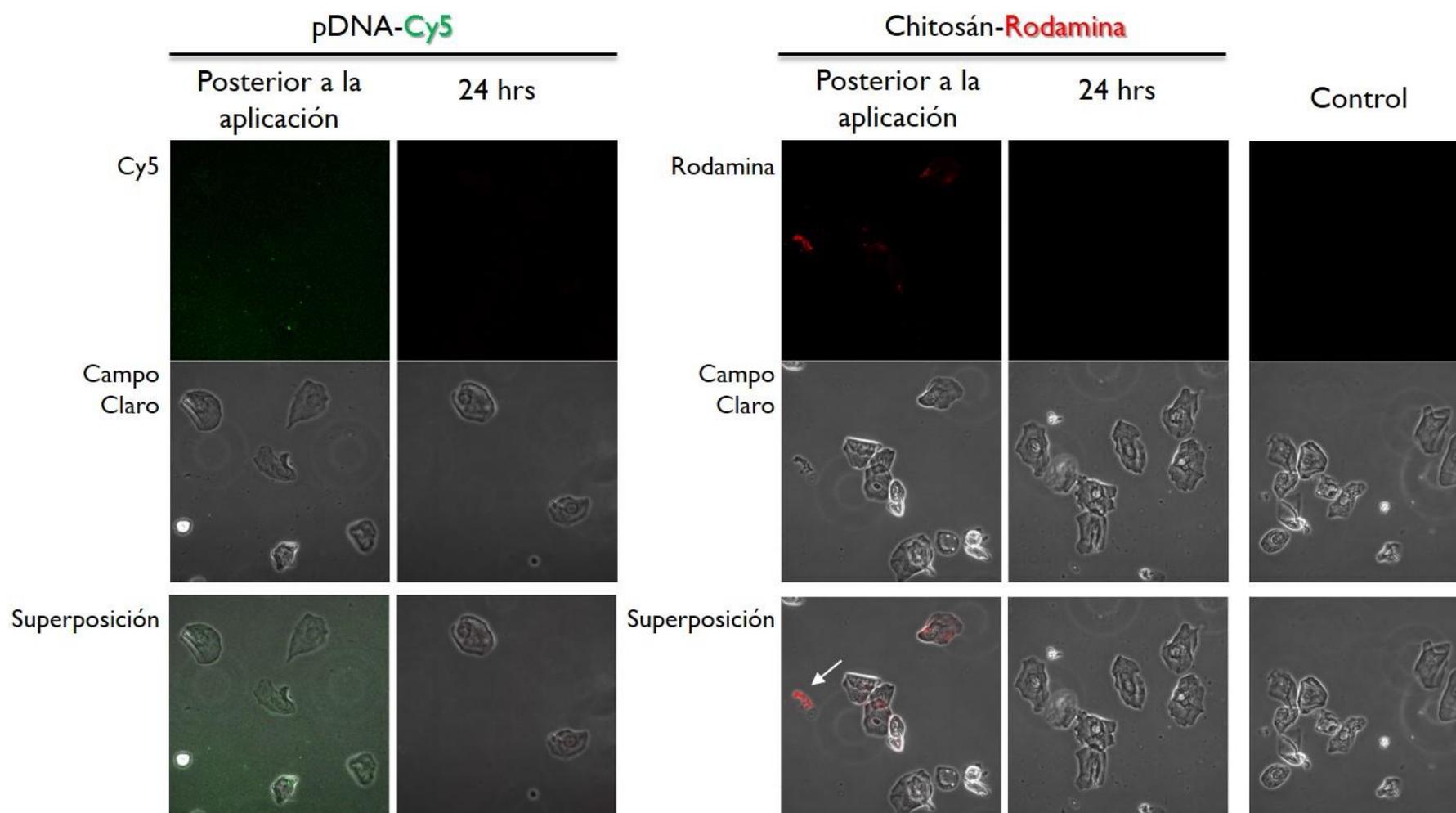
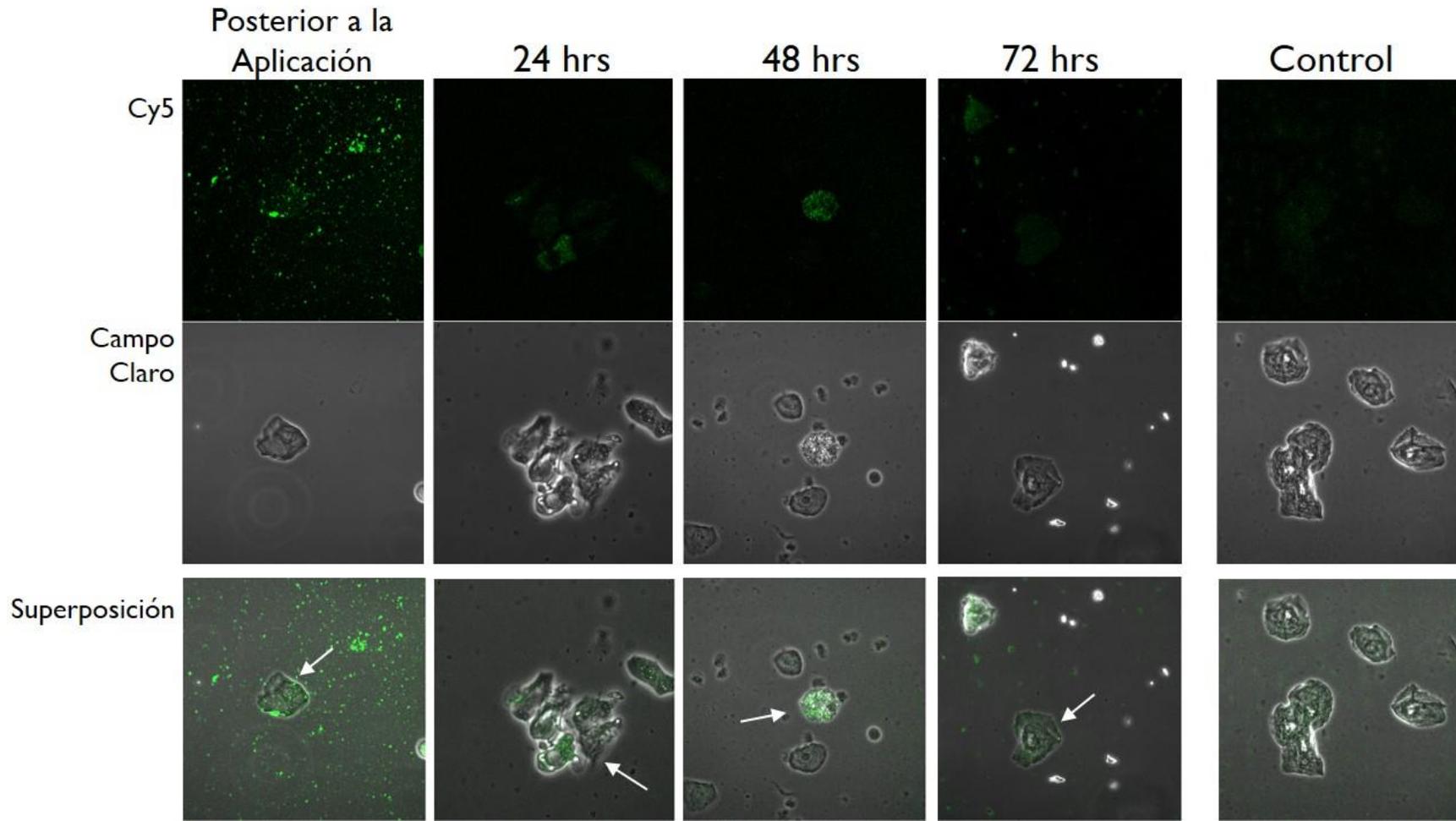


Figura 13. Presencia y localización de pDNA y chitosán de micropartículas chitosán/pDNA aplicadas en spray en la región cervicovaginal de ratones.

Imágenes de microscopia confocal de células epiteliales de la mucosa cervicovaginal de ratones hembra transfectadas con micropartículas de chitosán/pDNA, donde el pDNA fue marcado con Cy5 y el chitosán fue marcado con Rodamina. Aumento 40X.



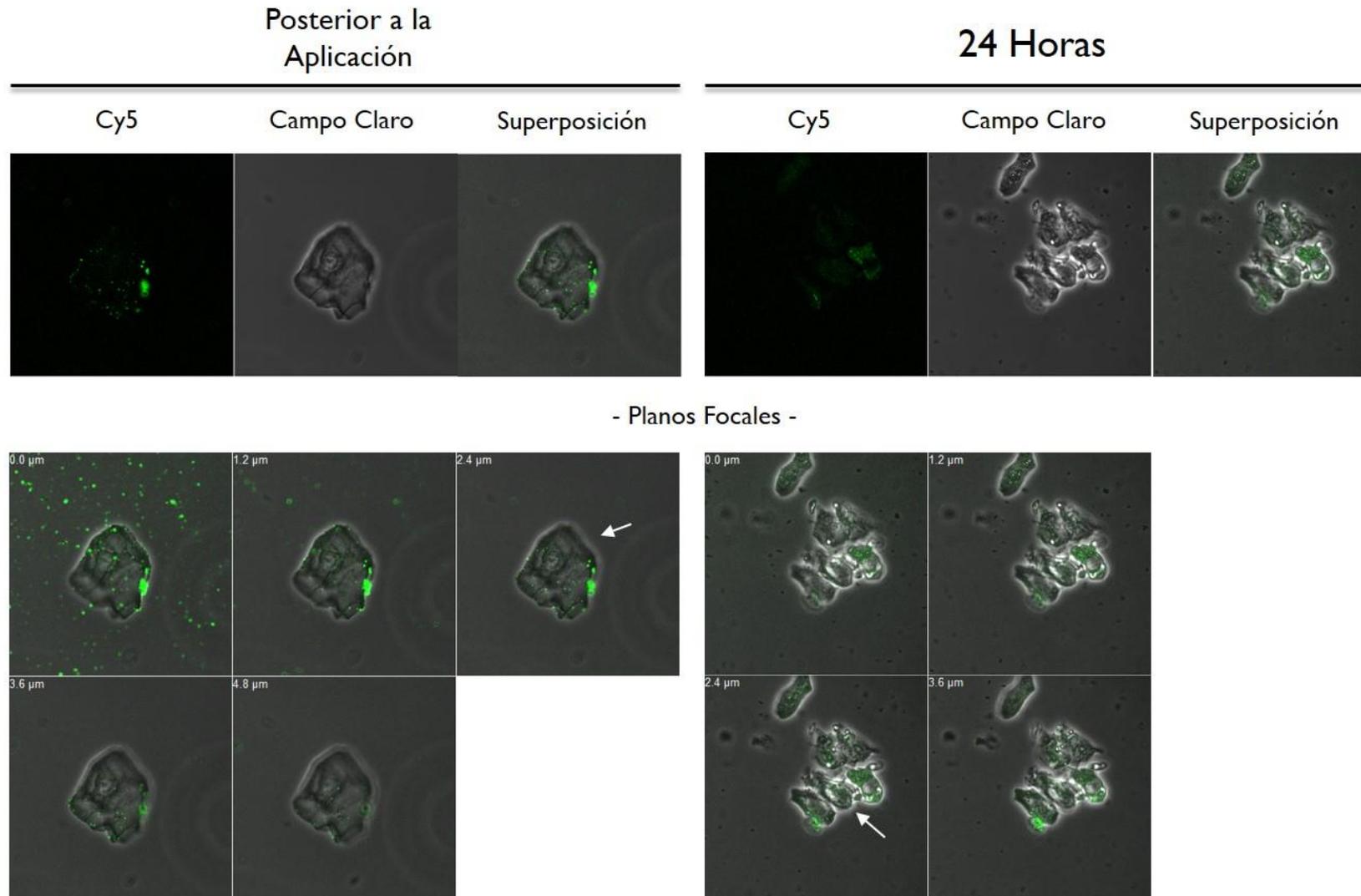


Figura 15. Localización celular de pDNA de micropartículas de quitosán/pDNA.

Planos focales a diferente profundidad de células epiteliales de la región cérvicovaginal de ratones hembra transfectadas con micropartículas de quitosán/pDNA, donde el pDNA fue marcado con Cy5. Profundidad entre planos: 1.2 μm . Aumento: 40X.

Para demostrar que el quitosán puede estar implicado en la transgénesis *in vivo* y además demostrar su localización en las células de la mucosa cervical, el quitosán fue marcado covalentemente con rodamina previo a la formación de los complejos. Los complejos quitosán-Rod/pDNA fueron aplicados con micropipeta en la región cérvicovaginal de las ratonas y posteriormente se realizaron raspados cervicovaginales con microbrush 24, 48 y 72 horas y se observaron mediante microscopía confocal. En la figura 16, se puede observar en color rojo la detección del quitosán en las células epiteliales. Cabe mencionar que para realizar una detección más fina, durante el análisis por microscopía confocal se bajaron los parámetros de intensidad de rodamina debido a que la señal era muy intensa. Se detectaron señales de la presencia quitosán-rodamina fuera y dentro de las células epiteliales posterior a la aplicación, notablemente se observa intensidad muy relevante adherida a la membrana y en el citoplasma celular. Cuarenta y ocho horas posteriores a la aplicación de los complejos quitosán-Rod/pDNA, la fluorescencia de la rodamina continúa siendo intensa y disminuye a las 72 horas. Asimismo, para determinar la localización del quitosán-rodamina, se realizaron cortes longitudinales de las células epiteliales de la mucosa cervicovaginal a diferentes profundidades mediante planos focales con microscopía confocal. La mayor intensidad de la rodamina fue detectada en la membrana de las células epiteliales posterior a la aplicación de los complejos quitosán-rod/pDNA y muy poca señal en el citoplasma de las células. Sin embargo, se observó que a las 24 horas el quitosán fue internalizado al citoplasma celular, detectando mayor intensidad de rodamina. Los planos focales claramente demuestran la presencia de la rodamina en el interior de la célula en pequeñas vesículas, en los cortes de los extremos de la célula la señal de rodamina es muy tenue; indicando que el quitosán está en el citoplasma pero no en el núcleo de las células (Figura 17). Con estos resultados se determinó que el quitosán además de atrapar al DNA plasmídico, favorece la transgénesis *in vivo* en células epiteliales de la mucosa cervical.

Permanencia de chitosán en la región cervicovaginal de ratonas

Para evaluar la permanencia del chitosán en la región cervicovaginal de las ratonas, complejos donde el chitosán fue previamente marcado con rodamina fueron aplicados en la región cervicovaginal de ratonas. Posteriormente se realizaron raspados cervicovaginales a diferentes tiempos y se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% para visualizar la rodamina unida al chitosán. En la figura 18A puede observarse el gel sin teñir con BrEt y la rodamina que al ser expuesta a luz UV emite fluorescencia, por lo que es posible detectar la rodamina unida al chitosán de forma directa (carril 3). La presencia del chitosán se detectó posterior a la aplicación y hasta las 72 horas posteriores a la aplicación (carriles 5 a 8). Al ser teñido el gel de agarosa con BrEt se visualiza el DNA, detectando tanto del DNA plasmídico como DNA genómico íntegro y degradado (figura 18B). Para detectar específicamente la señal de Rodamina, el gel de agarosa se visualizó mediante un escáner para detectar fluorescencia (Typhoon™). La señal de rodamina de los complejos chitosán-rod/pDNA por si solo fue muy intensa (carril 3), y se observa que la permanencia de chitosán-rodamina de los complejos chitosán-rod/pDNA aplicados en la región cervicovaginal disminuye a través del tiempo, con la mayor intensidad detectada posterior a la aplicación de los complejos y la menor o casi nula a las 72 horas (figura 18C).

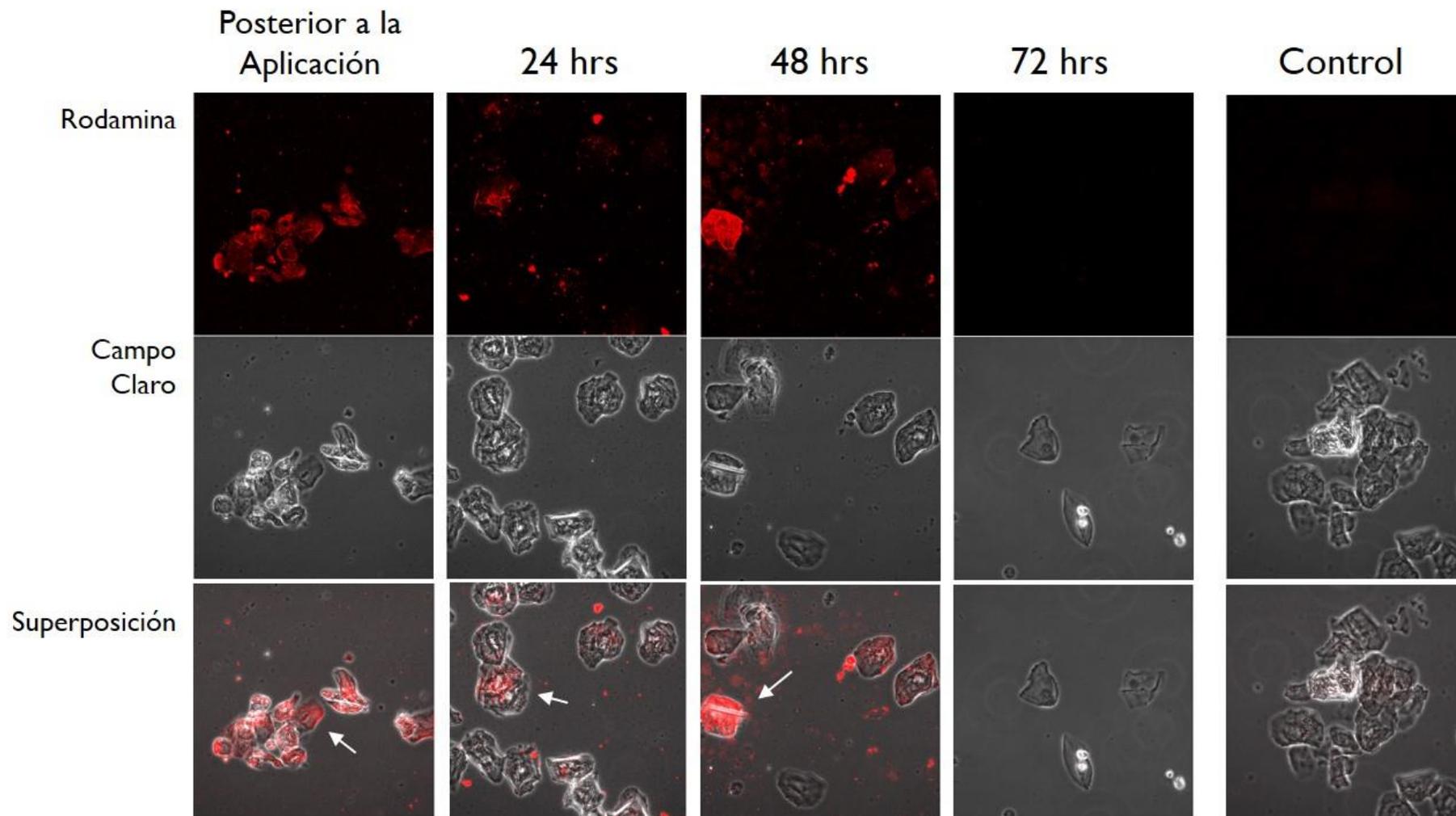


Figura 16. Presencia y localización de chitosán de micropartículas chitosán/pDNA aplicadas en la región cervicovaginal de ratones. Imágenes de microscopía confocal de células epiteliales de la región cervicovaginal de ratones hembra transfectadas a diferentes tiempos con micropartículas de chitosán/pDNA, donde el chitosán fue marcado con rodamina. Aumento: 40X.

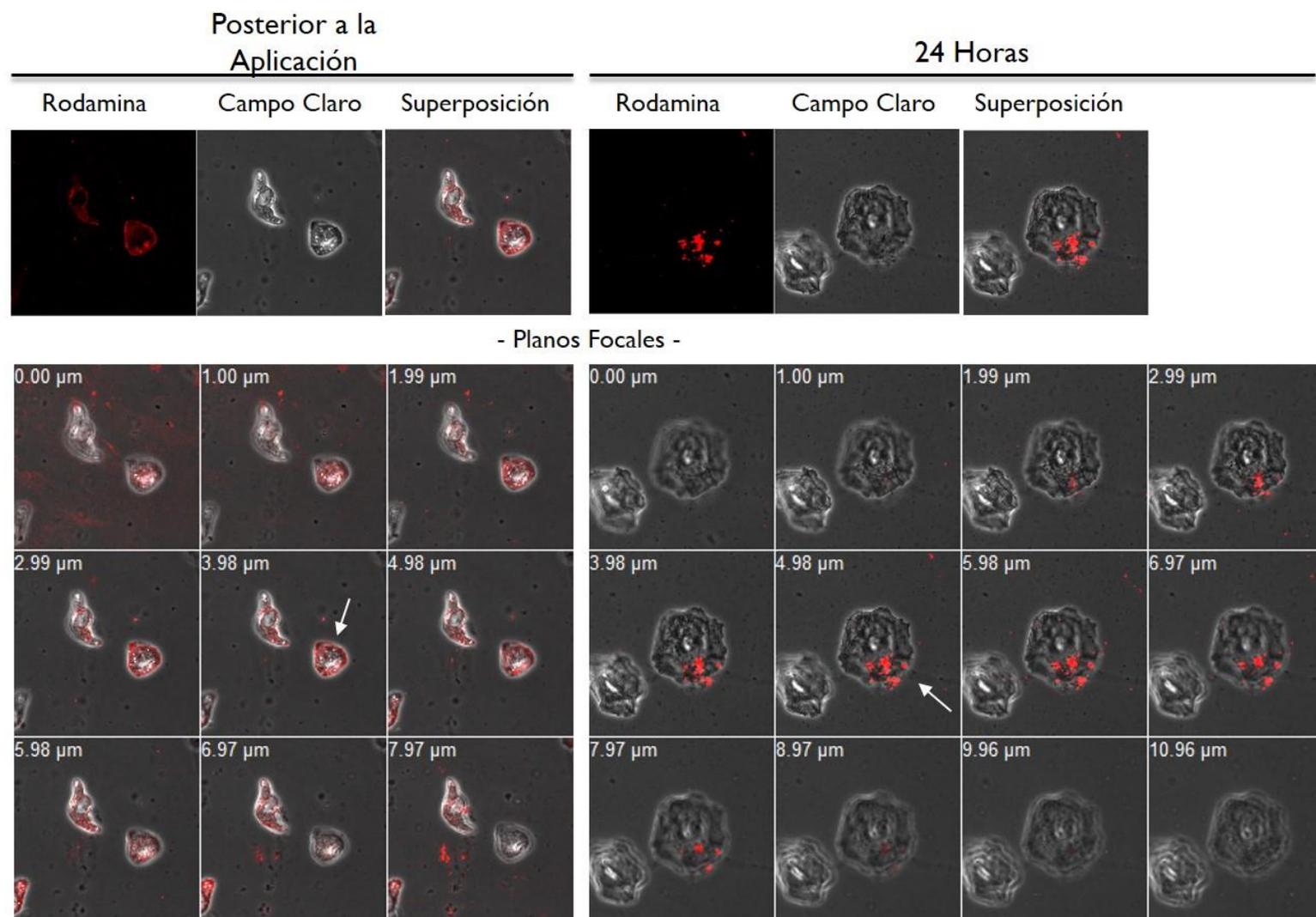


Figura 17. Localización celular de chitosán de micropartículas de chitosán/pDNA.

Planos focales de células epiteliales de la región cervicovaginal de ratones hembra transfectadas con micropartículas de chitosán/pDNA, donde el chitosán fue marcado con Rodamina. Profundidad entre planos 1.0 μm . Aumento: 40X.

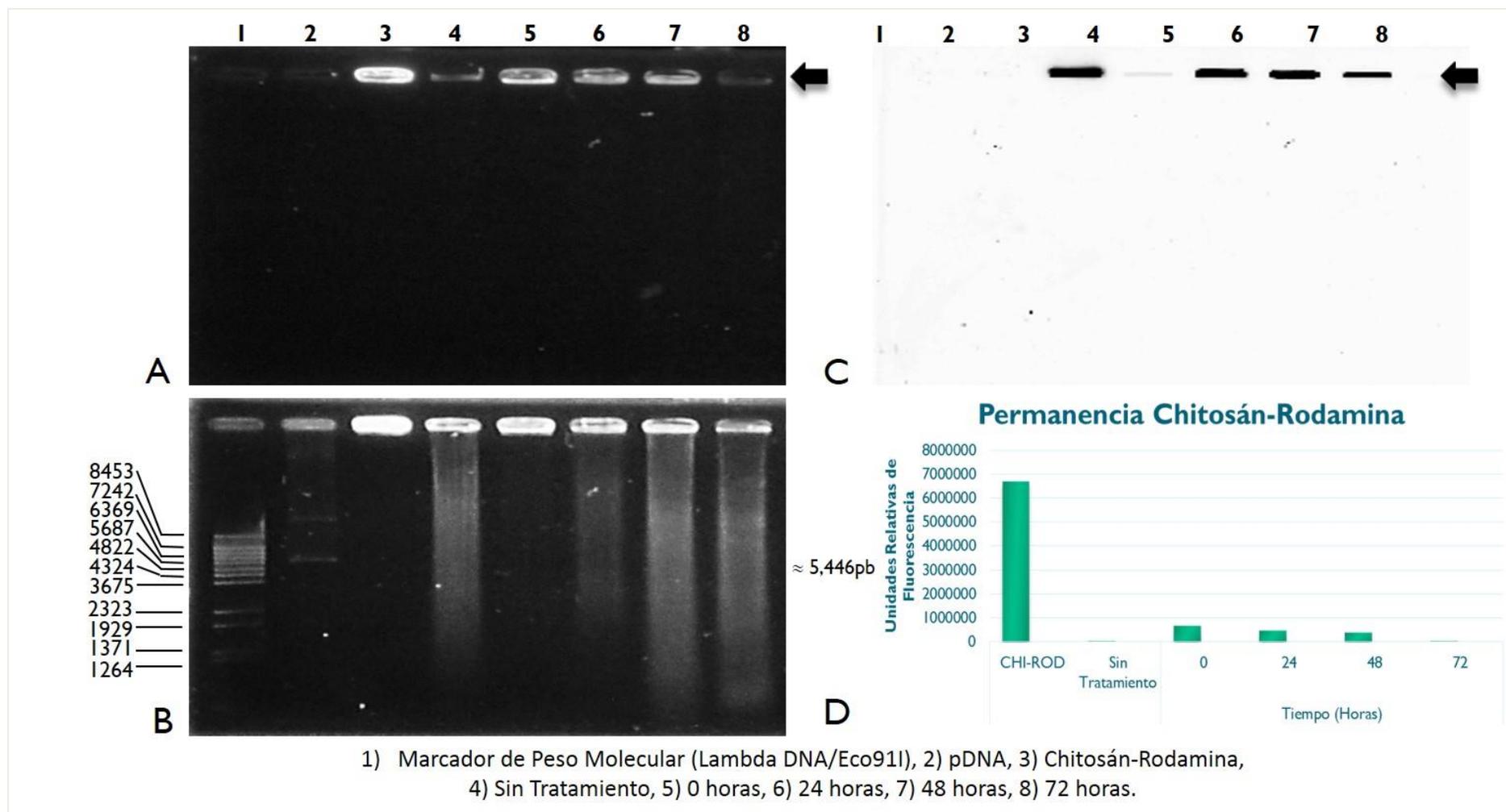


Figura 18. Permanencia de chitosán en la región cervicovaginal de ratones hembra.

A) Gel de agarosa al 1% expuesto a luz UV previo a la tinción con BrEt, se observa solo chitosán. B) Gel teñido con BrEt. Se observa pDNA y complejos chitosán/pDNA. C) Gel visualizado mediante el equipo Typhoon, se observa específicamente Rodamina. D) Cuantificación específica de rodamina.

Modelo murino de CaCU

Para generar el modelo murino de CaCU, se inocularon células BMK16/myc en una lesión previamente formada con ácido acético en la zona cervicovaginal de ratonas Balb/c. Con la finalidad de evaluar el mejor método para generar una lesión en la región cervicovaginal, se formaron grupos de ratonas y se les aplicó ácido acético mediante un citobrush o microbrush a cada grupo. Veinticuatro horas después, se inocularon 2.5×10^5 células BMK16/myc en la zona cervicovaginal de las ratonas en la lesión previamente formada, y 5 días después de la aplicación de las células se observó una lesión en la zona vulvoperineal en el 100% de los dos grupos de ratonas inoculadas (figura 19). Las lesiones generadas en el grupo de ratonas donde se utilizó el citobrush, muestran mayor inflamación en comparación con las que se utilizó microbrush; ya que el citobrush genera mayor daño debido a su tamaño. Al no presentarse diferencias en cuanto a la generación de la lesión, los ensayos posteriores para generar el modelo murino de CaCU se realizaron con microbrush. Además se detectó que el pH de la mucosa cervicovaginal cambio de un pH ácido (pH=5) sin lesión a un pH neutro (pH=7) en ratonas con lesión.

Por otro lado, con la finalidad de caracterizar las lesiones generadas en la región cervicovaginal por la aplicación de las células tumorales, se realizó un estudio citológico a partir de raspados cervicovaginales. Se detectaron cambios morfológicos en las células epiteliales, presentando anisocariosis y citoplasma naranjofilo en células escamosas, queratosis con naranjofilia, paraqueratosis, nucleación con cromatina en grumos, binucleación y citólisis; refiriendo un diagnóstico con alteraciones citológicas sugestivas de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado asociada con infección por VPH (Figura 20).

Adicionalmente, como una forma indirecta de verificar la implantación de las células BMK-16/myc en la región cervicovaginal de las ratonas, se detectó la expresión de los oncogenes E6 y E7 en las lesiones generadas por RT-PCR. Previamente se demostró que las células BMK-16/myc expresan los oncogenes de manera constitutiva, por lo que la detección de la expresión indica que las células tumorales permanecen viables en el región cervical. La figura 21, muestra la expresión de los oncogenes E6 y E7 a partir de raspados cervicales de ratonas 5 días de evolución posterior a la administración de las células tumorales. Como control positivo del ensayo de RT-PCR se utilizó RNA derivado de células BMK-16/myc (carril 1) detectando un peso molecular de 89 pb para E6 y 91 pb para E7. Las ratonas tratadas con ácido acético sin la aplicación de las células tumorales no expresaron los oncogenes (carril 4), sin embargo, si fue detectada la expresión de los oncogenes E6 y E7 en raspados de ratonas lesión y con la aplicación de células tumorales. Estos resultados indican claramente que las células BMK-16/myc al ser administradas permanecen viables y se están implantando en región cervicovaginal de las ratonas. Adicionalmente, se monitóreo el crecimiento tumoral hasta 45 días posterior a la administración de las células tumorales.

GRUPO 1 – Raspado cervicovaginal realizado con citobrush



GRUPO 2 – Raspado cervicovaginal realizado con microbrush



Figura 19. Lesión cervicovaginal de ratonas Balb/c cinco días después de la aplicación de

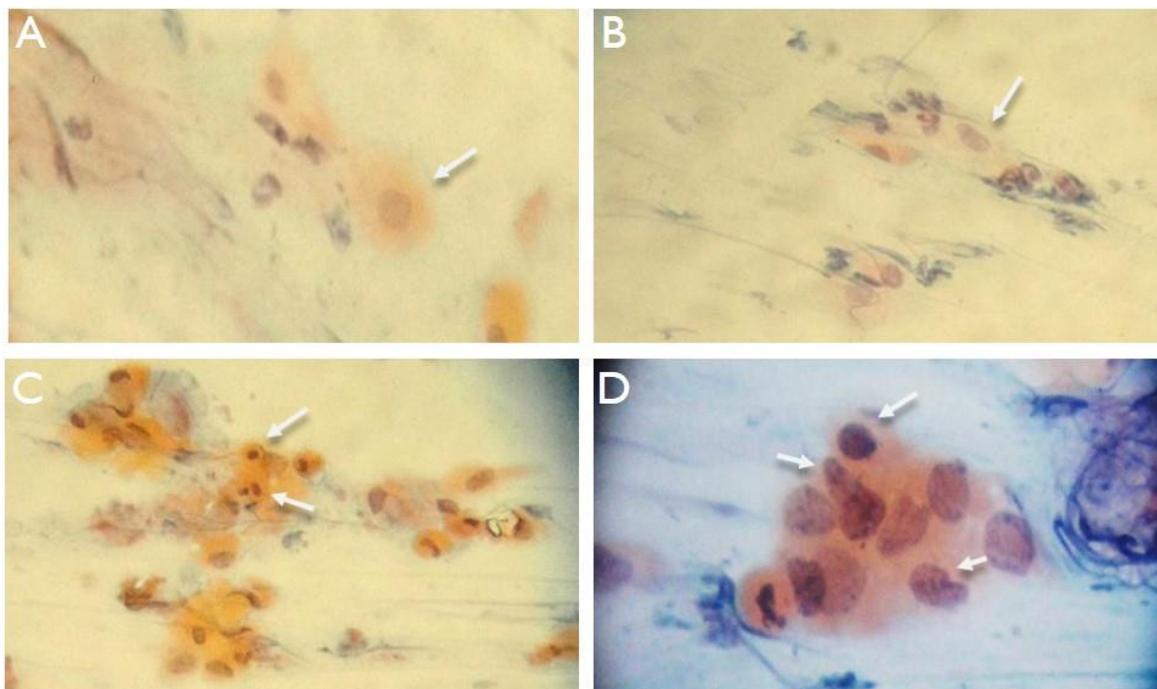


Figura 20. Citología cervicovaginal del modelo murino de CaCU.

Se muestran cambios epiteliales. A) Anisocariosis y citoplasma naranjofilo en células escamosas. B) Núcleos con cromatina en grumos C) Queratosis con naranjofilia y paraqueratosis. D) Hiperchromacia, anisocariosis y pleomorfismo.

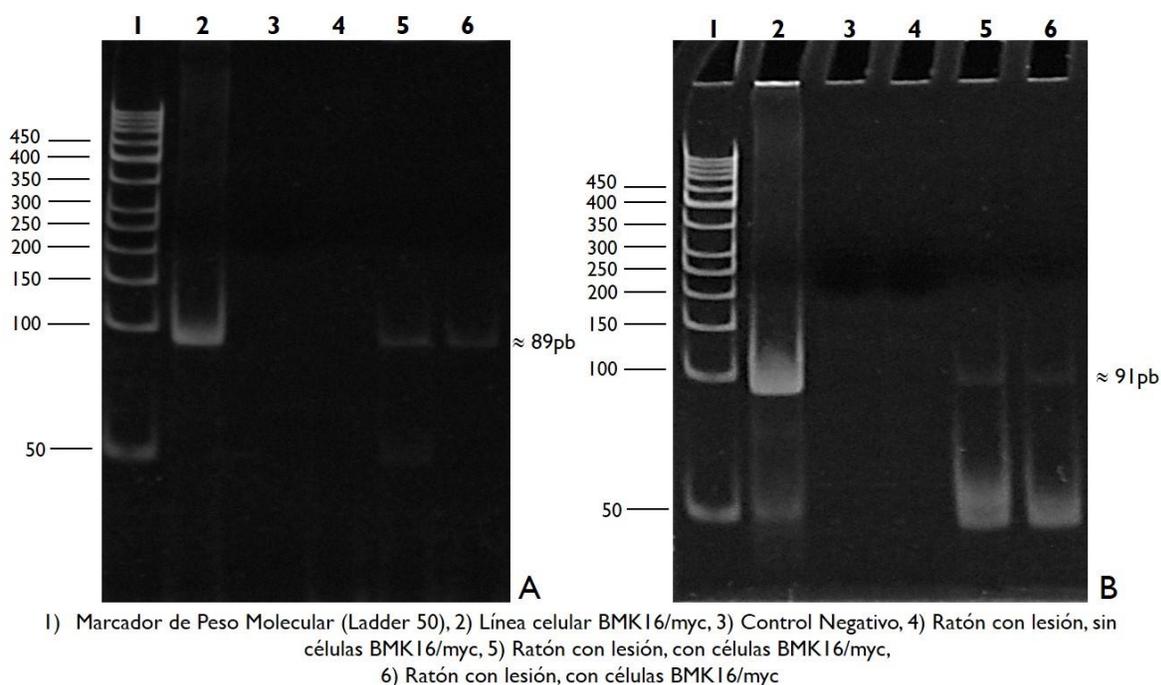


Figura 21. Expresión de los oncogenes E6 y E7 en el modelo murino de CaCU.
 A) Expresión del oncogén E6 de VPH 16. B) Expresión del oncogén E7 de VPH 16.

Con el objetivo de verificar la masa tumoral y el desarrollo de un modelo murino de CaCU, se realizó la extirpación del aparato reproductor de las ratonas con 45 días de evolución después de la aplicación de las células BMK16/myc. En la figura 22A se muestra la región vulvoperineal de ratonas con el desarrollo de tumores aparentes donde es evidente inflamación en esta zona, y en la figura 22B se observa el aparato reproductor extirpado de las ratonas a los 45 días posteriores a la administración de las células tumorales. Notablemente, se observa el crecimiento de una masa tumoral en la región cervicovaginal, así como inflamación en los cuernos uterinos, lo cual es evidente cuando se compara con la morfología de un aparato reproductor de una ratona sin lesión (Figura 22C). Sin embargo, para determinar la implantación de las células BMK16/myc en el cérvix, es necesario el diagnóstico histopatológico de las biopsias.

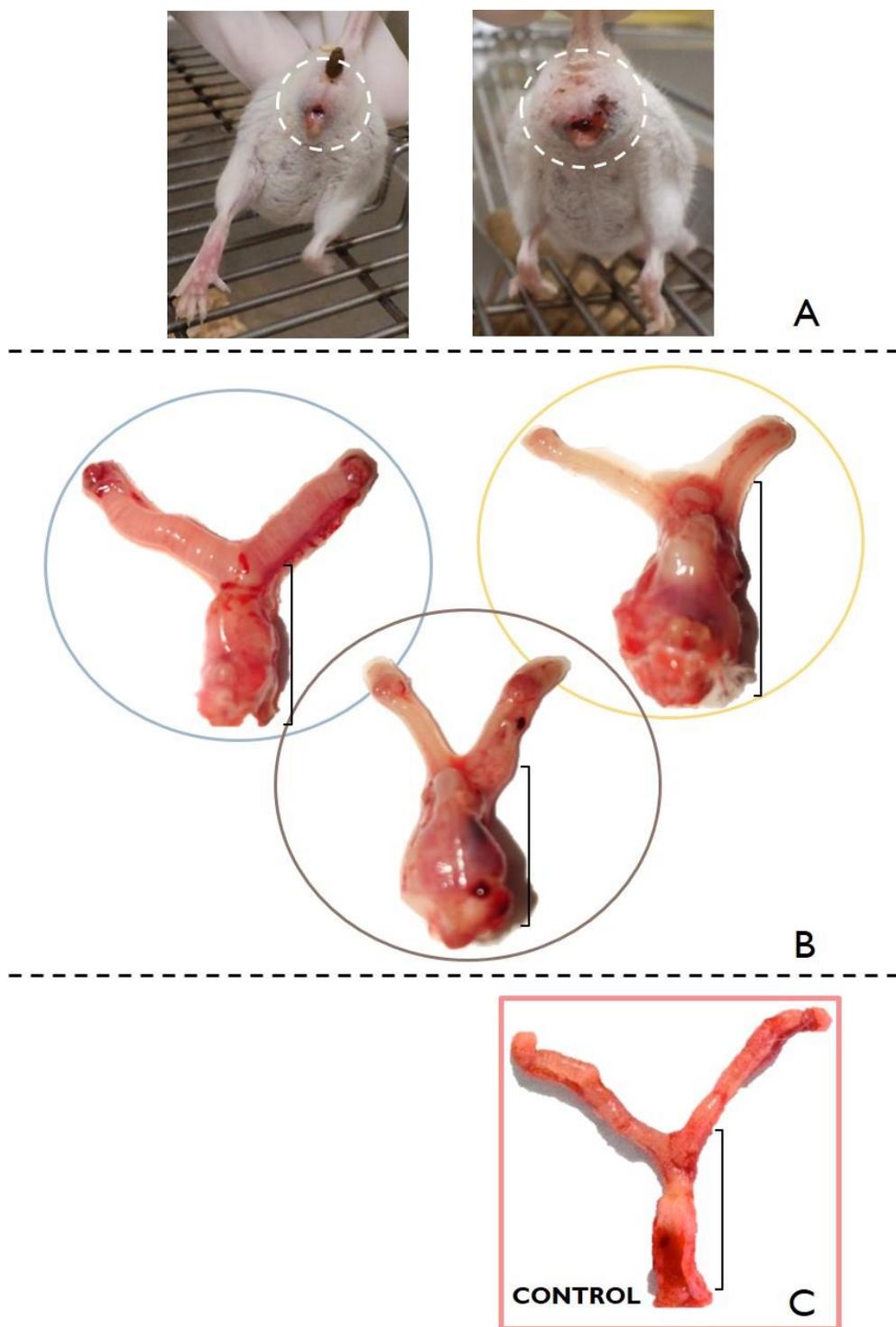


Figura 22. Biopsias del aparato reproductor de ratonas Balb/c posterior a la generación de modelo de CaCU.

A) Lesión visible en la zona vulvoperineal. B) Aparato reproductor de ratonas posterior a la generación del modelo de CaCU. Se observa crecimiento de masa tumoral en la región cervicovaginal. C) Aparato reproductor de una ratona sin intervención.

Efecto antitumoral de IL-12

Con la intención de evaluar el efecto antitumoral del gen de IL-12 en el modelo murino de CaCU, se administró una dosis única de 5 µg del plásmido pNGVL3-mIL12 de forma tópica en complejo quitosán-DNA plasmídico. La aplicación se realizó mediante micropipeta al quinto día posterior a la administración de las células tumorales (día en que se verificó la implantación de las células BMK-16/myc). Debido a la complejidad de cómo evaluar el efecto antitumoral del gen de la IL-12 en el modelo tumoral murino VPH 16 positivo en la región cervicovaginal, se midió la expresión de los oncogenes E6 y E7 en raspados cervicovaginales de ratonas con tumor tratadas con el gen de IL-12 versus sin tratamiento a diferentes tiempos. El análisis de la expresión de los oncogenes E6 y E7 se realizó por RT-PCR tiempo real, considerando la expresión relativa de cada oncogén en las ratonas tratadas con quitosán/pDNA(IL-12) comparando con la expresión relativa de cada oncogén de las ratonas con tumor sin tratamiento (ver materiales y métodos). En la figura 23 se observa que la expresión del oncogén E6 disminuye a las 24 y 48 horas posteriores a la aplicación de los complejos quitosán/pDNA(IL-12) comparado con las ratonas con tumor pero sin tratamiento. Sin embargo, la expresión aumenta ligeramente a las 72 horas. Por otro lado, la expresión del oncogén E7 inicialmente presenta un ligero aumento a las 24 horas posteriores a la administración de los complejos quitosán/pDNA(IL-12). Sin embargo, a las 48 horas la expresión disminuye y es más evidente a las 72 horas posteriores a la aplicación de los complejos quitosán/pDNA(IL-12). Estos resultados indican que en el tratamiento con los complejos quitosán/pDNA(IL-12) en el modelo experimental tumoral VPH 16 positivo desarrollado en la región cervicovaginal; la IL-12 favorece la activación de la respuesta inmune celular generando efectos sobre las células tumorales en la región cervicovaginal y en consecuencia la expresión de los oncogenes E6 y E7 disminuye. Sin embargo, no se detectó inhibición total de la expresión de los oncogenes, lo cual abre la posibilidad de aumentar la concentración del DNA plasmídico y el número de dosis vía tópica.

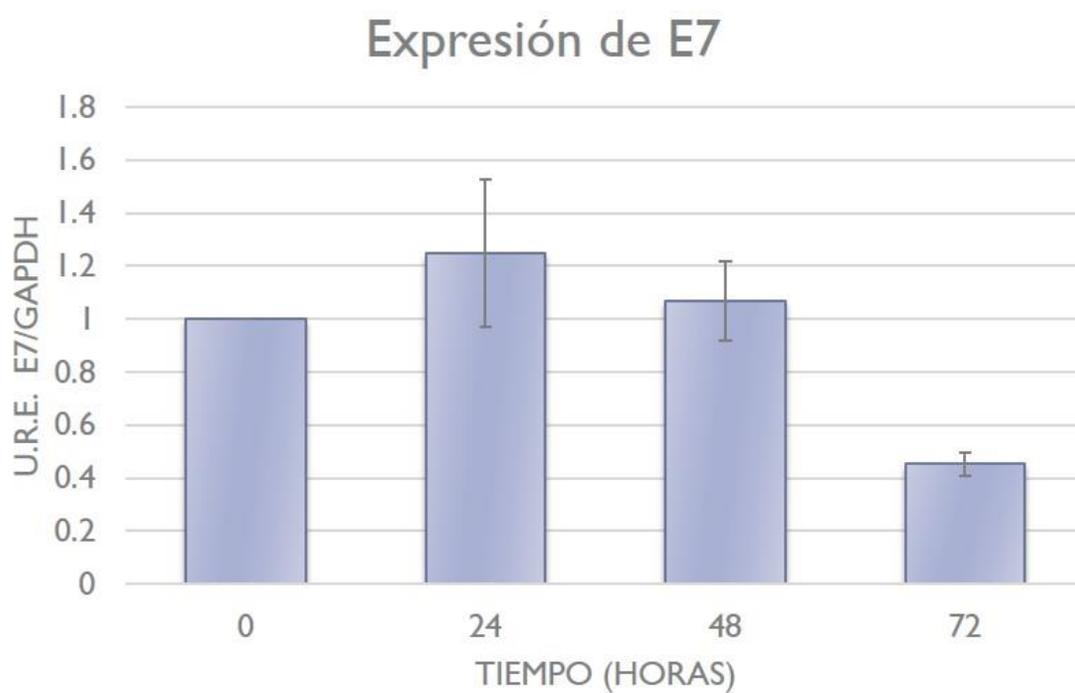
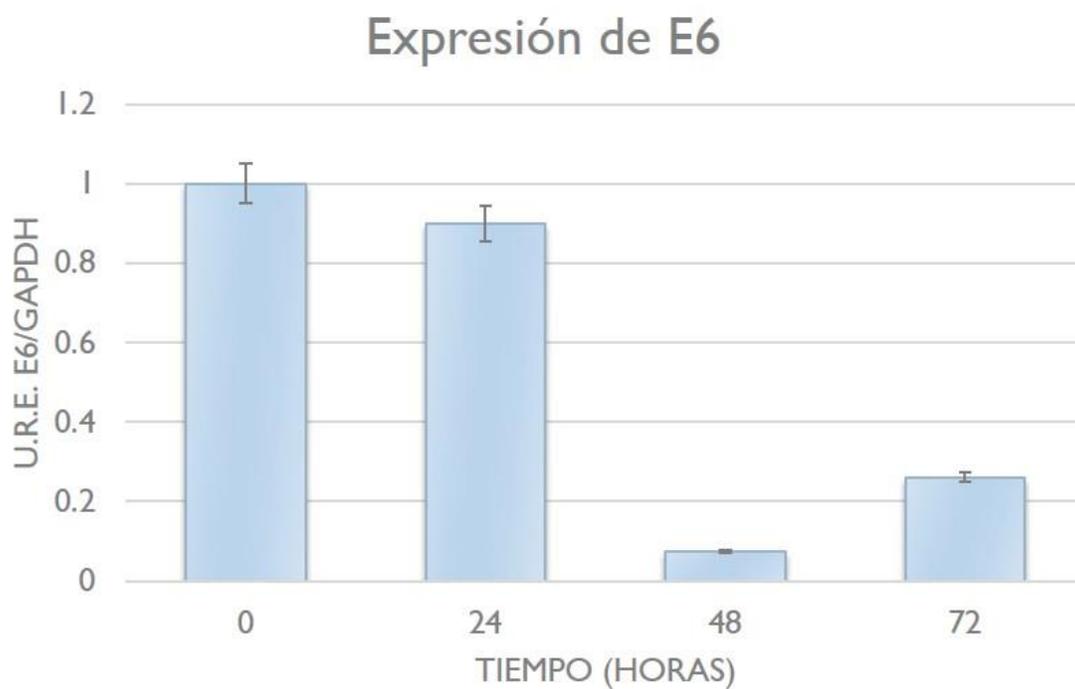


Figura 23. Expresión de los oncogenes E6 y E7 posterior a la aplicación de los complejos chitosán/pDNA(IL-12).

DISCUSIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCU) representa un problema de salud pública global por lo que es necesario fomentar la investigación en la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias profilácticas enfocadas en la prevención de la infección por virus del papiloma humano (VPH) y terapéuticas enfocadas en el tratamiento de lesiones premalignas y del CaCU. En este sentido, la evaluación de nuevas moléculas con potencial terapéutico ha sido promisorias y particularmente las citocinas como inmunoreguladores tienen un potencial muy relevante para el tratamiento del cáncer.

Ampliamente se ha demostrado en diversos modelos preclínicos de cáncer que la interleucina 12 (IL-12) tiene propiedades antitumorales.⁷²⁻⁷⁵ Sin embargo, la administración sistémica en pacientes es limitada debido a su toxicidad dosis-dependiente.^{68, 69, 71} A fin de evitar la toxicidad sistémica causada por la administración de la proteína recombinante de IL-12, se ha utilizado la terapia génica como una herramienta molecular que permite la expresión local y eficiente del gen que codifica para IL-12 en el tumor manteniendo bajas concentraciones de IL-12 en el suero. Adicionalmente, con la perspectiva para el tratamiento de lesiones premalignas y del CaCU, se propone a un biopolímero catiónico como vehículo de liberación del gen de IL-12 de forma local y tópica mediante terapia génica no viral (DNA desnudo), como una estrategia terapéutica que se puede llevar a la práctica clínica. Particularmente, el quitosán es un polímero biodegradable que tiene las propiedades de ser biocompatible, mucoadhesivo, antimicrobiano, antifúngico y tiene muy baja toxicidad;^{15, 16, 133} al ser un polication puede encapsular a DNA plasmídico, por lo tanto es un excelente vehículo para transportar un plásmido que exprese el gen de la IL-12 para el tratamiento local (mediante spray) de lesiones premalignas y del CaCU.

El interés del presente trabajo fue desarrollar complejos de quitosán con DNA plasmídico que contengan el gen de IL-12, caracterizar los complejos, determinar la capacidad de encapsulamiento de DNA plasmídico por el quitosán, envasar los complejos en un sistema de spray, monitorear la distribución y la permanencia de los complejos quitosán/pDNA en las células epiteliales de la mucosa cervical y determinar el efecto antitumoral de los complejos quitosán/pDNA(IL-12) en un modelo de cáncer cervicouterino VPH 16 positivo desarrollado en ratones Balb/c.

Los complejos quitosán/pDNA fueron preparados por el método de coacervación y caracterizados considerando la eficiencia de encapsulamiento, ensayo de retardamiento en gel y estabilidad posterior al disparo mediante un sistema de spray. En relación a la eficiencia de encapsulamiento, se obtuvieron valores aproximados del 90% para el plásmido pNGVL3-mIL12 (6.2 Kb) y 85% para el plásmido pcDNA3 (5.4 Kb). Con estos resultados se observó que existe una relación entre el peso molecular del DNA plasmídico y la eficiencia de encapsulamiento, donde a mayor peso molecular del DNA plasmídico mayor es la eficiencia de encapsulamiento.

Los resultados son congruentes con la eficiencia de encapsulamiento reportada por Ozbas-Turan en 2003, y además fue superior a lo reportado por Dastan y Turan en 2004.^{134, 177} Esto se debe a que el método utilizado para formación de los complejos chitosán/pDNA fue optimizado. Durante la formación de los complejos chitosán/pDNA, ocurre la interacción iónica entre los grupos amino cargados positivamente presentes en las unidades glucosamina del chitosán y las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA.^{178, 179} En el proceso el chitosán es diluido en ácido acético previo a la interacción con el DNA plasmídico para aumentar la interacción con el DNA, en nuestra metodología el chitosán se mantuvo diluido por mayor tiempo en ácido acético. Probablemente, esta modificación aumentó las cargas positivas en sus grupos amino en el chitosán, incrementando la interacción con los grupos fosfato del DNA plasmídico y favoreciendo la formación de los complejos. Con estos resultados, se demuestra que el chitosán puede encapsular los plásmidos pNGVL3-mIL12 y pcDNA3 en altos porcentajes. Por otro lado, con la finalidad de monitorear el chitosán y el DNA plasmídico en la mucosa cervical, el chitosán es marcado con rodamina y el DNA fue marcado con Cy5 previo a la formación de los complejos de manera independiente. La eficiencia de encapsulamiento se mantuvo constante en los complejos chitosán-rodamina, sin embargo, para el DNA-Cy5 la eficiencia de encapsulamiento disminuye hasta un 55.0%. La baja eficiencia puede estar relacionada con la unión covalente que se forma entre la Cy5 y el pDNA lo que genera un impedimento estérico y limita la formación de los complejos con el chitosán.

Adicionalmente, se demostró que la integridad del DNA plasmídico no fue afectada por el proceso de preparación de los complejos. El análisis electroforético de los complejos y los productos intermediarios de los procesos, demostró que la integridad y movilidad electroforética del DNA plasmídico no se afectan por el tratamiento con Na_2SO_4 (para aumentar las cargas positivas del DNA), ni por los lavados y precipitación de los complejos chitosán/pDNA (figura 11). Cuando el DNA plasmídico es encapsulado por el chitosán se forman complejos que impiden que el DNA sea liberado, por lo que en los geles de agarosa se detecta al DNA plasmídico en el pozo de carga del gel encapsulado por el chitosán y es incapaz de migrar a través del gel; la concentración del DNA plasmídico sin encapsular es tan pequeña que no es posible ser visualizada en el gel. Estos resultados son consistentes con previos reportes en referencia a la formación de complejos chitosán-pDNA.^{180, 181} Adicionalmente, se verificó que la estabilidad de los complejos no se viera afectada por la presión ejercida por la bomba de spray al momento del disparo. Los complejos chitosán/pDNA recuperados después del disparo se analizaron electroforéticamente y se comprobó que no hubo liberación de DNA plasmídico de los complejos chitosán/pDNA. Estos resultados demuestran que el chitosán es un polímero que tiene capacidad de encapsular al DNA plasmídico con alta eficiencia y que los complejos chitosán/pDNA formados se mantienen estables aún después de su aplicación en un sistema de spray.

Por otro lado, se monitoreó la localización del chitosán y del DNA plasmídico de los complejos chitosán/pDNA en las células del epitelio cervicovaginal. Al aplicar complejos de chitosán-pCDNA3 (chitosán marcado con rodamina y DNA marcado con Cy5 de manera independiente) en forma spray en la región cervicovaginal de ratonas, no se pudo detectar el chitosán y al DNA plasmídico. La boquilla de la bomba de spray no fue la más adecuada para el tamaño anatómico de la vagina de las ratonas, lo cual no favorece la entrada de los complejos chitosán/pDNA en la región cervicovaginal. Debido a esto el monitoreo del chitosán y DNA en la mucosa cervical se realizó mediante aplicación local con una micropipeta, ya que es más estrecha y los complejos chitosán/pDNA se pueden aplicar con mayor profundidad en la región cervicovaginal.

Durante el rastreo celular se verificó que tanto el DNA plasmídico como el chitosán se internalizan a partir de las primeras horas posteriores a la aplicación. Este resultado concuerda con lo reportado por Huang y colaboradores en 2005, donde a partir de la primera hora posterior a la transfección las micropartículas de chitosán/pDNA se localizan dentro de la célula.¹⁸² Cuando se realiza el seguimiento al rastreo celular de los complejos chitosán/pDNA a diferentes tiempos, podemos verificar la presencia tanto de chitosán como de DNA plasmídico a las 24 horas dentro de la célula e incluso en el núcleo celular, lo cual corresponde a lo reportado por Nimesh y colaboradores en 2010.¹⁷⁸ La presencia de DNA plasmídico en el interior de la célula se mantuvo hasta las 72 horas, a diferencia del chitosán que se mantuvo hasta las 48 horas, lo cual puede indicar la biodegradación del chitosán en la región cervicovaginal. Estos resultados son corroborados al medir la permanencia del chitosán en la región cervicovaginal, donde se encontró que el chitosán permanece hasta las 48 horas dentro de la región cervicovaginal y posteriormente la señal de chitosán (rodamina) es muy débil. Por lo que podemos concluir que el chitosán favorece la transgénesis del DNA plasmídico en las células epiteliales de la mucosa cervicovaginal, y que después de las 48 horas posteriores a la aplicación, el chitosán es biodegradado.

Por otro lado, se han desarrollado diversos modelos de tumor en ratones asociados al VPH, con un acercamiento al cáncer cervical para probar estrategias enfocadas en el tratamiento de lesiones precursoras y neoplasias asociadas al cáncer cervicouterino. Sin embargo, no se ha logrado generar el modelo más cercano a lo que ocurre en humanos. Los primeros modelos tumorales reportados están basados en papilomas en conejos asociados a virus del papiloma de conejos, sin embargo la limitante de este modelo es la especificidad del virus y su extrapolación en humanos.¹⁶⁴ Adicionalmente, se han generado modelos tumorales basados en la administración de líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino VPH 16 y 18 positivos en ratones desnudos. Estos modelos han sido usados ampliamente para probar drogas y sistemas de inhibición de los oncogenes E6 y E7, sin embargo no pueden ser utilizados para evaluar estrategias terapéuticas basadas en la activación de la respuesta inmune, ya que son modelos inmunodeficientes.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Otros modelos se han desarrollado en ratones inmunocompetentes usando líneas celulares singénicas de ratones transformadas con los oncogenes E5, E6, E7 o

combinaciones de estos. En estos modelos se han evaluado múltiples estrategias terapéuticas que incluyen, entre otras, la activación de la respuesta inmune. Sin embargo estos modelos tienen la desventaja de desarrollarse en sitios anatómicos fuera de donde normalmente se desarrolla la lesión (ectópico), o el desarrollo de cáncer cervicouterino es resultado de un evento secundario.^{170, 183} En este sentido, el presente trabajo estuvo enfocado a desarrollar un modelo tumoral más cercano a la historia natural del cáncer cervicouterino en humanos asociado a la infección por el virus del papiloma humano. En este trabajo se desarrolló un modelo de cáncer cervicouterino en ratonas balb/c inmunocompetentes mediante la implantación de células singénicas transformadas con el genoma completo del virus del papiloma humano y con la expresión de los oncogenes E6 y E7 (BMK-16/myc). Basados en un modelo de cáncer cervicouterino generado por la implantación de una línea de cáncer de mama VPH negativa, se generó el modelo tumoral VPH 16 positivo.¹⁷⁶ Se administraron células BMK16/myc en la región cervicovaginal de ratonas balb/c. Previo a la administración de las células tumorales, se indujo el desarrollo de una lesión con ácido acético (ver metodología). El monitoreo de la lesión se realizó mediante citologías cervicovaginales, las cuales revelaron cambios morfológicos sugestivos al desarrollo de lesiones intraepiteliales de bajo grado. Con la finalidad de determinar la implantación de las células tumorales en la lesión, se evaluó la expresión de los oncogenes E6 y E7 mediante RT-PCR de raspados cervicovaginales en el sitio de la lesión. La expresión de los oncogenes E6 y E7 indica que las células BMK-16/myc al ser administradas permanecen viables y se están implantando en región cervicovaginal de las ratonas. Estos resultados demuestran la capacidad de implantación de las células tumorales y la generación de una lesión en la región cervicovaginal positiva al VPH 16. La localización anatómica de la lesión no permite el monitoreo visual directo del desarrollo de ésta. Por ésta razón se extirpó el aparato reproductor de ratonas con una lesión de 35 días de evolución y así poder obtener una imagen clara del crecimiento de la masa tumoral. El análisis macroscópico del aparato reproductor de las ratonas, demostró evidente inflamación en la región cervicovaginal y en los cuernos uterinos, así como el crecimiento de una masa tumoral en la región cervical, la cual es evidente cuando se compara con la morfología de un aparato reproductor de una ratona sin lesión. Sin embargo, el diagnóstico histopatológico del tejido es necesario para determinar la implantación de las células tumorales específicamente en el cérvix.

Por otra parte, la IL-12 es una de las citocinas más promisorias en terapia contra el cáncer. Sus efectos terapéuticos han sido demostrados en una gran variedad de tumores en modelos animales mediante su administración sistémica o local.⁷²⁻⁷⁵ Sin embargo, debido a la toxicidad dosis-dependiente causada por la administración sistémica de la proteína, la expresión local y eficiente del gen que codifica para IL-12 en el tumor (terapia génica), representa un enfoque alternativo a la inmunoterapia. Particularmente, la IL-12 es una de las citocinas más utilizadas en terapia génica contra el cáncer cervicouterino. Su efecto antitumoral se ha demostrado en

diversos modelos animales con tumores asociados al VPH, mediante el uso de terapia génica no viral (DNA desnudo), terapia génica viral con adenovirus, terapia celular y en combinación con los oncogenes E6 y E7; observándose un efecto de represión del crecimiento tumoral en todos los casos.^{168, 184, 185} No obstante, los modelos tumorales utilizados en estos ensayos son desarrollados en sitios anatómicos fuera de donde normalmente se desarrolla el cáncer cervicouterino y sus lesiones precursoras. Debido a esto, una vez generado el modelo de cáncer cervicouterino positivo al VPH 16 en ratón. Se evaluó el efecto antitumoral del gen de IL-12 aplicado mediante complejos quitosán/pDNA. La administración del plásmido pNGVL3m-IL-12 en complejos quitosán/pDNA(IL-12) se realizó de forma directa en la lesión generada mediante una punta de micropipeta usando una dosis única de 5 µg de DNA plasmídico.

El efecto antitumoral del gen de IL-12 sobre el modelo de cáncer cervicouterino se evaluó de una forma indirecta, detectando la expresión de los oncogenes E6 y E7 en raspados cervicovaginales de ratonas con tumor tratadas con el gen de IL-12 a diferentes tiempos mediante RT-PCR tiempo real versus los ratones control (sin tratamiento con lesión). En los ensayos cuantitativos por RT-PCR tiempo real se encontró que la expresión de los oncogenes E6 y E7 disminuye después de la aplicación de los complejos quitosán/pDNA(IL-12) comparado con la expresión de los oncogenes E6 y E7 de ratonas sin tratamiento pero con lesión. Con estos resultados se puede concluir que el gen de IL-12 aplicado mediante complejos quitosán/pDNA(IL-12) en el modelo murino de cáncer cervicouterino tiene un efecto antitumoral. Estos resultados son congruentes con reportes en donde se demuestra la habilidad de la IL-12 para inducir la regresión tumoral y el desarrollo de una potente inmunidad antitumoral en estudios preclínicos en ratones.¹⁸⁶⁻¹⁸⁹ Algunos de estos reportes han demostrado que el efecto antitumoral de IL-12 es dependiente de la activación y proliferación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos y del aumento en la producción de IFN-γ en el sitio de inmunización, el cual es producto de la activación de las células NK.^{187, 190} Debido a esto, es posible inferir que la administración de los complejos quitosán/pDNA(IL-12) favorece la activación de la respuesta inmune celular, la cual ejerce su función efectora sobre las células tumorales, disminuyendo la expresión de los oncogenes E6 y E7. Sin embargo, no se logra abatir totalmente la expresión de los oncogenes E6 y E7 en el modelo tumoral. La baja toxicidad del quitosán, su biocompatibilidad y biodegradabilidad en conjunto con la baja concentración en suero de IL-12 permiten abrir la perspectiva de aumentar la concentración del DNA plasmídico (pNGVL3mIL-12) y el número de dosis aplicadas vía tópica o combinaciones de ambas.

En este trabajo se planteó generar una estrategia terapéutica para el cáncer cervical con una perspectiva de aplicación tópica, mediante terapia génica usando el gen IL-12 en conjunto con un sistema de liberación de genes basado en el biopolímero quitosán. Se demostró que el quitosán tiene la capacidad de encapsular al DNA plasmídico formando micropartículas quitosán/pDNA. Estas micropartículas se mantienen estables y mantienen íntegro al DNA plasmídico después de ser aplicadas mediante un sistema de spray. Adicionalmente se

demostró que el quitosán es un buen candidato como vehículo de liberación de genes y que favorece la transgénesis *in vivo* del DNA plasmídico en las células del epitelio cervical. Finalmente se demostró que la aplicación del gen de IL-12 mediante complejos quitosán/pDNA en un modelo murino de cáncer cervicouterino ejerce un efecto antitumoral discreto con la dosis empleada. Por lo que esta estrategia tiene un gran potencial como tratamiento tópico para el control de lesiones premalignas y CaCU asociadas a la infección de VPH.

CONCLUSIONES

- El chitosán tiene la habilidad de encapsular al pDNA formando partículas estables bajo las condiciones mostradas.
- La presencia de chitosán y DNA plasmídico tanto en la membrana como en el interior de las células epiteliales de la mucosa cervical después de la aplicación de los complejos chitosán/pDNA, demuestra que el chitosán es un buen candidato como vehículo de liberación de genes en células de la mucosa cervical.
- El complejo chitosán/pDNA desarrollado tiene capacidad de transgénesis a las 24 horas después de su aplicación en la mucosa cervicovaginal.
- La aplicación en spray del complejo chitosán/pDNA no pudo demostrarse por problemas anatómicos del modelo.
- El tiempo de biodegradación de chitosán de bajo peso molecular fue de aproximadamente 72 horas en la región cervicovaginal de ratonas balb/c.
- Se generó un modelo murino de cáncer cervicouterino positivo a VPH 16 en ratones balb/c mediante la inoculación de células BMK16/myc en la región cervicovaginal de las ratonas.
- La expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH, disminuye después de la aplicación de los complejos chitosán-pDNA (IL-12).

PERSPECTIVAS

- Confirmar la implantación de las células BMK-16/myc en el modelo murino de cáncer cervicouterino mediante histopatología.
- Desarrollar un método más eficiente para dar seguimiento al efecto de IL-12 en el modelo murino de cáncer cervicouterino.
- Medir la expresión de IL-12 en el modelo murino de cáncer cervicouterino después de la aplicación de los complejos chitosán/pDNA(IL-12).
- Evaluar el efecto terapéutico de IL-12 en el modelo murino de cáncer cervicouterino incrementando la dosis terapéutica o el número de dosis.
- Medir el perfil de expresión de citocinas de la respuesta inmune tipo Th1/Th2 en respuesta a la aplicación de los complejos chitosán/pDNA(IL-12).

REFERENCIAS

1. Jemal, A. et al. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**, 69-90 (2011).
2. Ferlay, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **127**, 2893-2917 (2010).
3. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews. Cancer* **2**, 342-350 (2002).
4. zur Hausen, H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* **184**, 9-13 (1991).
5. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* **110**, 525-541 (2006).
6. de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U. & zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**, 17-27 (2004).
7. Monie, A., Hung, C.F., Roden, R. & Wu, T.C. Cervarix: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics : targets & therapy* **2**, 97-105 (2008).
8. Govan, V.A. A novel vaccine for cervical cancer: quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) recombinant vaccine (Gardasil). *Therapeutics and clinical risk management* **4**, 65-70 (2008).
9. Dawar, M., Deeks, S. & Dobson, S. Human papillomavirus vaccines launch a new era in cervical cancer prevention. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **177**, 456-461 (2007).
10. Frazer, I.H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature reviews. Immunology* **4**, 46-54 (2004).
11. García-Carrancá, A. Vaccines against human papillomavirus and perspectives for the prevention and control of cervical cancer. *Salud Publica Mex* **45**, S437-S442 (2003).
12. Barrera-Rodriguez, R., Peralta-Zaragoza, O. & Madrid-Marina, V. [Molecular bases of cancer immunology]. *Salud Publica Mex* **37**, 344-353 (1995).
13. Bermudez-Morales, V.H., Peralta-Zaragoza, O. & Madrid-Marina, V. [Gene therapy with cytokines against cervical cancer]. *Salud Publica Mex* **47**, 458-468 (2005).
14. Fewell, J.G. et al. Synthesis and application of a non-viral gene delivery system for immunogene therapy of cancer. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **109**, 288-298 (2005).
15. Barrera Bautista, E., Bermúdez-Morales, V. & Hernández Baltazar, E. Materiales poliméricos de aplicación en terapia génica. *Revista Iberoamericana de Polímeros* **12**, 32-50 (2011).
16. Panos, I., Acosta, N. & Heras, A. New drug delivery systems based on chitosan. *Current drug discovery technologies* **5**, 333-341 (2008).
17. Guzman-Olea, E. in Escuela de Salud Pública de México, Vol. PhD (Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernava, Morelos; 2013).
18. Ferlay, J. et al., Vol. 2012 (International Agency for Research on Cancer, Lyon, France; 2010).
19. WHO (World Health Organization, Barcelona, Spain; 2010).
20. (CONAPO), C.N.d.P. (Consejo Nacional de Población, México; 2010).

21. SSA, Vol. NOM-014-SSA2-1994. (ed. SSA) 29-45 (Diario Oficial de la Federación, México; 1998).
22. Córdova-Villalobos, J. et al. (ed. SSA) (México, D.F.; 2008).
23. Tovar, V.J., Ortiz, F., Jimenez, F.R. & Valencia, G. Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México (1980-2004). *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* **51**, 47-51 (2008).
24. Palacio, L.S. Cervical cancer, a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Publica Mex* **45**, 315-325 (2003).
25. Walboomers, J.M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* **189**, 12-19 (1999).
26. Chan, P.K. et al. Distribution of human papillomavirus types in anogenital warts of men. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **44**, 111-114 (2009).
27. Torres-Poveda, K.J., Burguete, A., Bermudez-Morales, V.H. & Madrid-Marina, V. [Human papilloma virus infection and cervical cancer: a public health perspective]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* **60**, 414-420 (2008).
28. Tirado-Gomez, L.L. et al. [Risk factors in invasive cervical cancer among Mexican women]. *Salud Publica Mex* **47**, 342-350 (2005).
29. del Amo, J. et al. Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain. *Sexually transmitted infections* **81**, 79-84 (2005).
30. Bosch, F.X. & de Sanjose, S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Disease markers* **23**, 213-227 (2007).
31. Putral, L.N. et al. RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. *Molecular pharmacology* **68**, 1311-1319 (2005).
32. Alcocer-Gonzalez, J.M. et al. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral immunology* **19**, 481-491 (2006).
33. Bermudez-Morales, V.H., Gutierrez, L.X., Alcocer-Gonzalez, J.M., Burguete, A. & Madrid-Marina, V. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer investigation* **26**, 1037-1043 (2008).
34. Clifford, G.M., Goncalves, M.A. & Franceschi, S. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *AIDS* **20**, 2337-2344 (2006).
35. De Guglielmo, Z. et al. Virus del papiloma humano y factores de riesgo. *Rev Venez Oncol* **22**, 32-38 (2010).
36. Munoz, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine* **348**, 518-527 (2003).
37. Gonzalez Martin, A. Molecular biology of cervical cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* **9**, 347-354 (2007).
38. zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 690-698 (2000).

39. Longworth, M.S. & Laimins, L.A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **68**, 362-372 (2004).
40. Piersma, S.J. Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* **4**, 361-375 (2011).
41. Zheng, Z.M. & Baker, C.C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **11**, 2286-2302 (2006).
42. Lewis, H., Webster, K., Sanchez-Perez, A.M. & Gaston, K. Cellular transcription factors regulate human papillomavirus type 16 gene expression by binding to a subset of the DNA sequences recognized by the viral E2 protein. *The Journal of general virology* **80 (Pt 8)**, 2087-2096 (1999).
43. López, J. & Ancízar, F. Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* **35**, 5-32 (2006).
44. López Saavedra, A. & Lizano Soberón, M. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerlogía* **1**, 31-55 (2006).
45. Horvath, C.A., Boulet, G.A., Renoux, V.M., Delvenne, P.O. & Bogers, J.P. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology journal* **7**, 11 (2010).
46. Sapp, M. & Bienkowska-Haba, M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *The FEBS journal* **276**, 7206-7216 (2009).
47. Woodman, C.B., Collins, S.I. & Young, L.S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer* **7**, 11-22 (2007).
48. Rivera Z, R., Delgado D, J., Painel P, V., Barrero P, R. & Larraín H, A. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus del papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol* **71**, 135-140 (2006).
49. Weiss-Steider, B., Soto-Cruz, I., Martinez-Campos, C.A. & Mendoza-Rincon, J.F. Expression of MICA, MICB and NKG2D in human leukemic myelomonocytic and cervical cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **30**, 37 (2011).
50. Stanley, M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* **24 Suppl 1**, S16-22 (2006).
51. Coleman, N. et al. Immunological events in regressing genital warts. *American journal of clinical pathology* **102**, 768-774 (1994).
52. Eiben, G.L., Velders, M.P. & Kast, W.M. The cell-mediated immune response to human papillomavirus-induced cervical cancer: implications for immunotherapy. *Advances in cancer research* **86**, 113-148 (2002).
53. Garcia-Lora, A., Algarra, I. & Garrido, F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of cellular physiology* **195**, 346-355 (2003).
54. Stohlman, S.A., Bergmann, C.C., Lin, M.T., Cua, D.J. & Hinton, D.R. CTL effector function within the central nervous system requires CD4+ T cells. *J Immunol* **160**, 2896-2904 (1998).
55. Ibrahim, R. et al. 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 (2006).

56. Barrera-Rodriguez, R., Peralta-Zaragoza, O. & Madrid-Marina, V. Bases moleculares de la inmunología del cáncer. *Salud Publica Mex* **37**, 344-356 (1995).
57. Tindle, R.W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature reviews. Cancer* **2**, 59-65 (2002).
58. Garcia-Lora, A., Martinez, M., Algarra, I., Gaforio, J.J. & Garrido, F. MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **106**, 521-527 (2003).
59. Hazelbag, S. et al. Cytokine profile of cervical cancer cells. *Gynecologic oncology* **83**, 235-243 (2001).
60. Dinarello, C.A. Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**, 503-508 (2000).
61. Lee, S. & Margolin, K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers* **3**, 3856-3893 (2011).
62. Matte, I., Lane, D., Laplante, C., Rancourt, C. & Piche, A. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *American journal of cancer research* **2**, 566-580 (2012).
63. Haabeth, O.A. et al. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature communications* **2**, 240 (2011).
64. Nevala, W.K. et al. Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 1931-1939 (2009).
65. Jacobs, N. et al. Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. *Clinical and experimental immunology* **111**, 219-224 (1998).
66. Peralta-Zaragoza, O. et al. E6 and E7 oncoproteins from human papillomavirus type 16 induce activation of human transforming growth factor beta1 promoter throughout Sp1 recognition sequence. *Viral immunology* **19**, 468-480 (2006).
67. Trinchieri, G. Function and clinical use of interleukin-12. *Current opinion in hematology* **4**, 59-66 (1997).
68. Trinchieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology* **13**, 251-276 (1995).
69. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology* **3**, 133-146 (2003).
70. Hasko, G. & Szabo, C. IL-12 as a therapeutic target for pharmacological modulation in immune-mediated and inflammatory diseases: regulation of T helper 1/T helper 2 responses. *British journal of pharmacology* **127**, 1295-1304 (1999).
71. Del Vecchio, M. et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 4677-4685 (2007).
72. Egilmez, N.K. et al. In situ tumor vaccination with interleukin-12-encapsulated biodegradable microspheres: induction of tumor regression and potent antitumor immunity. *Cancer research* **60**, 3832-3837 (2000).
73. Faggioli, F. et al. Effects of IL-12 gene therapy on spontaneous transgenic and transplanted breast tumors. *Breast cancer research and treatment* **110**, 223-226 (2008).

74. Jia, S.F., Duan, X., Worth, L.L., Guan, H. & Kleinerman, E.S. Intratumor murine interleukin-12 gene therapy suppressed the growth of local and distant Ewing's sarcoma. *Cancer gene therapy* **13**, 948-957 (2006).
75. Lode, H.N. et al. Gene therapy with a single chain interleukin 12 fusion protein induces T cell-dependent protective immunity in a syngeneic model of murine neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 2475-2480 (1998).
76. Shi, F. et al. Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model. *Molecular cancer therapeutics* **1**, 949-957 (2002).
77. Colombo, M.P. & Trinchieri, G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews* **13**, 155-168 (2002).
78. Sangro, B., Melero, I., Qian, C. & Prieto, J. Gene therapy of cancer based on interleukin 12. *Current gene therapy* **5**, 573-581 (2005).
79. Pandhi, D. & Sonthalia, S. Human papilloma virus vaccines: Current scenario. *Indian journal of sexually transmitted diseases* **32**, 75-85 (2011).
80. Rambout, L., Hopkins, L., Hutton, B. & Fergusson, D. Prophylactic vaccination against human papillomavirus infection and disease in women: a systematic review of randomized controlled trials. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **177**, 469-479 (2007).
81. Rivera-Rodríguez, P. & Zúñiga-Lara, D. Infección por VPH, vacunas y nuevas tendencias. *Acta Med Grupo Angeles* **7**, 89-95 (2009).
82. Cutts, F.T. et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bulletin of the World Health Organization* **85**, 719-726 (2007).
83. Harper, D.M. et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* **367**, 1247-1255 (2006).
84. Villa, L.L. et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *British journal of cancer* **95**, 1459-1466 (2006).
85. Lin, K., Roosinovich, E., Ma, B., Hung, C.F. & Wu, T.C. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunologic research* **47**, 86-112 (2010).
86. Garcia-Carranca, A. Vaccines against human papillomavirus and perspectives for the prevention and control of cervical cancer. *Salud Publica Mex* **45 Suppl 3**, S437-442 (2003).
87. Hung, C.F., Ma, B., Monie, A., Tsen, S.W. & Wu, T.C. Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. *Expert opinion on biological therapy* **8**, 421-439 (2008).
88. Lin, K., Doolan, K., Hung, C.F. & Wu, T.C. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* **109**, 4-24 (2010).
89. Monie, A., Tsen, S.W., Hung, C.F. & Wu, T.C. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Expert review of vaccines* **8**, 1221-1235 (2009).

90. Sewell, D.A., Pan, Z.K. & Paterson, Y. Listeria-based HPV-16 E7 vaccines limit autochthonous tumor growth in a transgenic mouse model for HPV-16 transformed tumors. *Vaccine* **26**, 5315-5320 (2008).
91. Bermudez-Humaran, L.G. et al. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology* **68**, 917-922 (2002).
92. Cortes-Perez, N.G. et al. Cell-surface display of E7 antigen from human papillomavirus type-16 in *Lactococcus lactis* and in *Lactobacillus plantarum* using a new cell-wall anchor from lactobacilli. *Journal of drug targeting* **13**, 89-98 (2005).
93. Peters, C. & Paterson, Y. Enhancing the immunogenicity of bioengineered *Listeria monocytogenes* by passaging through live animal hosts. *Vaccine* **21**, 1187-1194 (2003).
94. Souders, N.C. et al. Listeria-based vaccines can overcome tolerance by expanding low avidity CD8+ T cells capable of eradicating a solid tumor in a transgenic mouse model of cancer. *Cancer immunity* **7**, 2 (2007).
95. Bermudez-Morales, V.H. et al. HPV 16 E2 protein induces apoptosis in human and murine HPV 16 transformed epithelial cells and has antitumoral effects in vivo. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **30**, 61-72 (2009).
96. Lamikanra, A., Pan, Z.K., Isaacs, S.N., Wu, T.C. & Paterson, Y. Regression of established human papillomavirus type 16 (HPV-16) immortalized tumors in vivo by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8(+) T-cell responses that home to the tumor site. *Journal of virology* **75**, 9654-9664 (2001).
97. Gomez-Gutierrez, J.G. et al. Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **56**, 997-1007 (2007).
98. Riezebos-Brilman, A. et al. Induction of human papilloma virus E6/E7-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in immune-tolerant, E6/E7-transgenic mice. *Gene therapy* **12**, 1410-1414 (2005).
99. Riezebos-Brilman, A., Regts, J., Chen, M., Wilschut, J. & Daemen, T. Augmentation of alphavirus vector-induced human papilloma virus-specific immune and anti-tumour responses by co-expression of interleukin-12. *Vaccine* **27**, 701-707 (2009).
100. Rudolf, M.P., Man, S., Melief, C.J., Sette, A. & Kast, W.M. Human T-cell responses to HLA-A-restricted high binding affinity peptides of human papillomavirus type 18 proteins E6 and E7. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**, 788s-795s (2001).
101. Frazer, I.H. et al. Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Vaccine* **23**, 172-181 (2004).
102. Tillman, B.W., Hayes, T.L., DeGrujil, T.D., Douglas, J.T. & Curiel, D.T. Adenoviral vectors targeted to CD40 enhance the efficacy of dendritic cell-based vaccination against human papillomavirus 16-induced tumor cells in a murine model. *Cancer research* **60**, 5456-5463 (2000).
103. Benencia, F., Courreges, M.C. & Coukos, G. Whole tumor antigen vaccination using dendritic cells: comparison of RNA electroporation and pulsing with UV-irradiated tumor cells. *Journal of translational medicine* **6**, 21 (2008).

104. Santin, A.D., Bellone, S., Gokden, M., Cannon, M.J. & Parham, G.P. Vaccination with HPV-18 E7-pulsed dendritic cells in a patient with metastatic cervical cancer. *The New England journal of medicine* **346**, 1752-1753 (2002).
105. Fioretti, D., Iurescia, S., Fazio, V.M. & Rinaldi, M. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, 174378 (2010).
106. (2009).
107. Zhou, H.S., Liu, D.P. & Liang, C.C. Challenges and strategies: the immune responses in gene therapy. *Medicinal research reviews* **24**, 748-761 (2004).
108. Scholl, S.M., Michaelis, S. & McDermott, R. Gene Therapy Applications to Cancer Treatment. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2003**, 35-47 (2003).
109. Borem, A., Santos, F. & Bowen, D. Understanding biotechnology. (Prentice Hall Press, 2003).
110. Baban, C.K., Cronin, M., O'Hanlon, D., O'Sullivan, G.C. & Tangney, M. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer. *Bioengineered bugs* **1**, 385-394 (2010).
111. Jewell, C.M. & Lynn, D.M. Surface-Mediated Delivery of DNA: Cationic Polymers Take Charge. *Current opinion in colloid & interface science* **13**, 395-402 (2008).
112. Luten, J., van Nostrum, C.F., De Smedt, S.C. & Hennink, W.E. Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **126**, 97-110 (2008).
113. Bolhassani, A., Safaiyan, S. & Rafati, S. Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy. *Molecular cancer* **10**, 3 (2011).
114. Mao, S., Sun, W. & Kissel, T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced drug delivery reviews* **62**, 12-27 (2010).
115. Boussif, O. et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7297-7301 (1995).
116. Godbey, W.T., Barry, M.A., Saggau, P., Wu, K.K. & Mikos, A.G. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *Journal of biomedical materials research* **51**, 321-328 (2000).
117. Grayson, A.C., Doody, A.M. & Putnam, D. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharmaceutical research* **23**, 1868-1876 (2006).
118. Son, S. & Kim, W.J. Biodegradable nanoparticles modified by branched polyethylenimine for plasmid DNA delivery. *Biomaterials* **31**, 133-143 (2010).
119. Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H. & Kawashima, Y. Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery. *International journal of pharmaceuticals* **354**, 210-216 (2008).
120. Figueiredo, M. & Esenaliev, R. PLGA Nanoparticles for Ultrasound-Mediated Gene Delivery to Solid Tumors. *Journal of drug delivery* **2012**, 767839 (2012).
121. Fox, M.E. et al. Synthesis and in vivo antitumor efficacy of PEGylated poly(l-lysine) dendrimer-camptothecin conjugates. *Molecular pharmaceuticals* **6**, 1562-1572 (2009).
122. Liu, G. et al. Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 34379-34387 (2001).

123. Funhoff, A.M. et al. Poly(3-guanidinopropyl methacrylate): a novel cationic polymer for gene delivery. *Bioconjugate chemistry* **15**, 1212-1220 (2004).
124. Gonzalez, H., Hwang, S.J. & Davis, M.E. New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics. *Bioconjugate chemistry* **10**, 1068-1074 (1999).
125. Hu-Lieskovan, S., Heidel, J.D., Bartlett, D.W., Davis, M.E. & Triche, T.J. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer research* **65**, 8984-8992 (2005).
126. Kim, W.J. et al. Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **14**, 343-350 (2006).
127. Johansson, H.J., Andaloussi, S.E. & Langel, U. Mimicry of protein function with cell-penetrating peptides. *Methods Mol Biol* **683**, 233-247 (2011).
128. Liu, X.X. et al. PAMAM dendrimers mediate siRNA delivery to target Hsp27 and produce potent antiproliferative effects on prostate cancer cells. *ChemMedChem* **4**, 1302-1310 (2009).
129. Zhou, J. et al. PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing. *Chem Commun (Camb)*, 2362-2364 (2006).
130. Patil, M.L. et al. Internally cationic polyamidoamine PAMAM-OH dendrimers for siRNA delivery: effect of the degree of quaternization and cancer targeting. *Biomacromolecules* **10**, 258-266 (2009).
131. Mansouri, S. et al. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **57**, 1-8 (2004).
132. Tiyaboonchai, W. Chitosan Nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Narasuan Unuversity Journal* **11**, 51-66 (2003).
133. Wang, J.J. et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International journal of nanomedicine* **6**, 765-774 (2011).
134. Ozbas-Turan, S., Aral, C., Kabasakal, L., Keyer-Uysal, M. & Akbuga, J. Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non-viral gene delivery vehicle. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* **6**, 27-32 (2003).
135. Felt, O., Buri, P. & Gurny, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy* **24**, 979-993 (1998).
136. Li, Q., Dunn, E., Grandmaison, E. & Goosen, M. Applications and properties of chitosan. *J. Bioactive and Compatible Polym* **7**, 370-397 (1992).
137. Bough, W., Salter, W., Wu, A. & Perkins, B. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. *Biotechnol Bioeng* **20**, 1931 (1978).
138. Muzzarelli, R.A. Chitin. *Pergamon: Oxford* (1977).
139. Maghami, G.G. & Roberts, G.A.F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Mackromol Chem* **189**, 195-200 (1988).

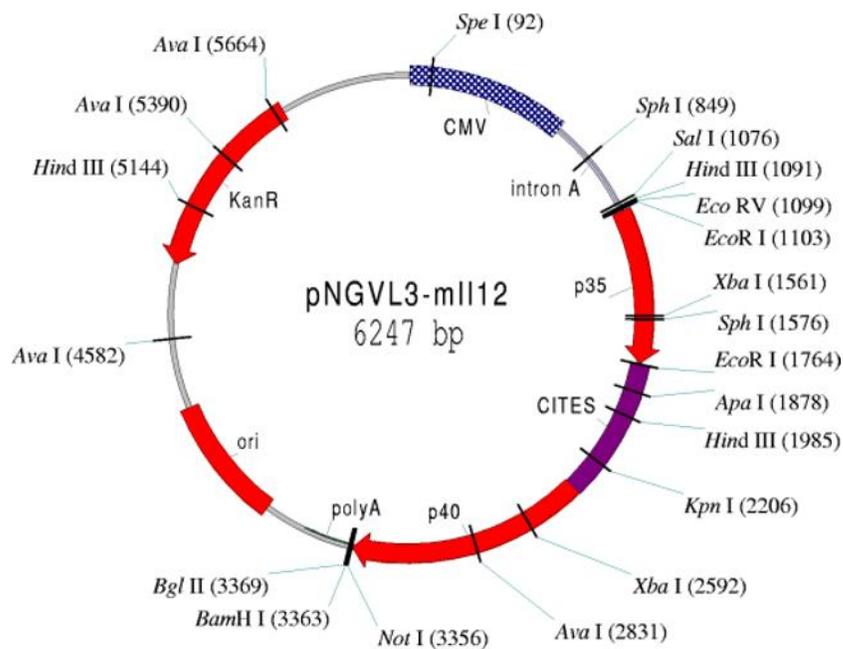
140. Dodane, V. & Vilivalam, V. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT* **1**, 246-253 (1998).
141. Zhang, J. et al. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Marine drugs* **8**, 1962-1987 (2010).
142. Bansal, V., Sharma, K., Sharma, N., OM., P. & Malviya, R. Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery. *Adv Biol Res* **5**, 28-37 (2011).
143. Chandy, T. & Sharma, C.P. Chitosan--as a biomaterial. *Biomaterials, artificial cells, and artificial organs* **18**, 1-24 (1990).
144. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* **31**, 603-632 (2006).
145. Kumar, M. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* **46**, 1-27 (2000).
146. No, H.K., Kim, S.D., Kim, D.S., Kim, S.J. & Meyers, S.P. Effect of Physical and Chemical Treatments on Chitosan Viscosity. *Journal of Korean Soc. For Chitin and Chitosan* **4**, 177-183 (1999).
147. Kurita, K., Shimada, K., Nishiyama, Y., Shimojoh, M. & Nishimura, S.I. Nonnatural Branched Polysaccharides: Synthesis and Properties of Chitin and Chitosan Having alpha-Mannoside Branches. *Macromolecules* **31**, 4764-4769 (1998).
148. Kurita, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol (NY)* **8**, 203-226 (2006).
149. Sinha, V.R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International journal of pharmaceutics* **274**, 1-33 (2004).
150. Schipper, N.G. et al. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharmaceutical research* **14**, 923-929 (1997).
151. Dodane, V., Amin Khan, M. & Merwin, J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *International journal of pharmaceutics* **182**, 21-32 (1999).
152. Schipper, N.G., Varum, K.M. & Artursson, P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharmaceutical research* **13**, 1686-1692 (1996).
153. Kotze, A.F. et al. Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **51**, 35-46 (1998).
154. He, P., David, S.S. & Illum, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International journal of pharmaceutics* **166**, 75-88 (1998).
155. Lueben, H.L. et al. Bioadhesive polymers for the peroral delivery of peptide drugs. *J. Control Rel.* **29**, 329-338 (1994).
156. Dutta, K., Dutta, J. & Tripathi, V.S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J. Scie Ind Res* **63**, 20-31 (2004).
157. Tomlinson, E. & Rolland, A.P. Rolland, Controllable gene therapy pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **39**, 357-372 (1996).
158. Mao, H., Roy, K., Le, V., August, J. & Leong, K. DNA-chitosan nanospheres: derivatization and storage stability. *Proc Int Symp Control Rel Bioactive Mater* **24**, 671-672 (1997).

159. Roy, K., Mao, H.-Q. & Leong, K. DNA-chitosan nanospheres: Transfection efficiency and cellular uptake. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater* **24**, 673-674 (1997).
160. Vol'fson, N.I. [Mouse vaginal papilloma produced by intravaginal administration of polyurethane]. *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* **62**, 90-94 (1966).
161. De, S., Chakraborty, J., Chakraborty, R. & Das, S. Chemopreventive activity of quercetin during carcinogenesis in cervix uteri in mice. *Phytother Res.* **14**, 347-351 (2000).
162. Reagan, J.W., Wentz, W.B. & Machicao, N. Induced cancer of the cervix uteri in the mouse. *A.M.A. archives of pathology* **60**, 451-456 (1955).
163. Rao, P.S. & Reddy, D.J. INDUCTION OF CARCINOMA OF CERVIX UTERI IN MICE WITH HUMAN SMEGMA. *Journal of the Indian Medical Association* **41**, 280-289 (1963).
164. Harvey, S.B. et al. Rabbit genital tissue is susceptible to infection by rabbit oral papillomavirus: an animal model for a genital tissue-targeting papillomavirus. *Journal of virology* **72**, 5239-5244 (1998).
165. Griep, A.E. et al. Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *Journal of virology* **67**, 1373-1384 (1993).
166. Lambert, P.F. et al. Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5583-5587 (1993).
167. Bonnef, W. et al. Propagation of human papillomavirus type 11 in human xenografts using the severe combined immunodeficiency (SCID) mouse and comparison to the nude mouse model. *Virology* **197**, 455-458 (1993).
168. Hallez, S. et al. Interleukin-12-secreting human papillomavirus type 16-transformed cells provide a potent cancer vaccine that generates E7-directed immunity. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **81**, 428-437 (1999).
169. Kondoh, G., Murata, Y., Aozasa, K., Yutsudo, M. & Hakura, A. Very high incidence of germ cell tumorigenesis (seminomagenesis) in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Journal of virology* **65**, 3335-3339 (1991).
170. Arbeit, J.M., Munger, K., Howley, P.M. & Hanahan, D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Journal of virology* **68**, 4358-4368 (1994).
171. De, S., Chakraborty, J., Chakraborty, R.N. & Das, S. Chemopreventive activity of quercetin during carcinogenesis in cervix uteri in mice. *Phytotherapy research : PTR* **14**, 347-351 (2000).
172. Chung, S.H., Wiedmeyer, K., Shai, A., Korach, K.S. & Lambert, P.F. Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer research* **68**, 9928-9934 (2008).
173. Gate2Tech (2008).
174. Jansson, D. in *Materials Engineering, Vol. Master* (Tampere University of Technology, 2010; 2010).
175. Ma, O. et al. Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate. *Carb Pol* **72**, 616-624 (2008).

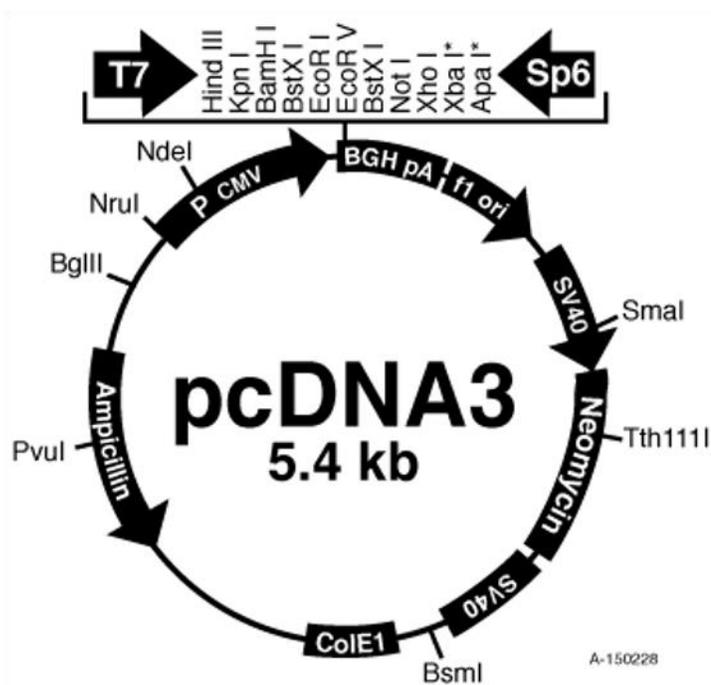
176. Brito, N.M. et al. Experimental inoculation model of Walker 256 carcinoma into vagina and cervix uteri of female rats. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* **22**, 495-498 (2007).
177. Dastan, T. & Turan, K. In vitro characterization and delivery of chitosan-DNA microparticles into mammalian cells. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* **7**, 205-214 (2004).
178. Nimesh, S., Thibault, M.M., Lavertu, M. & Buschmann, M.D. Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. *Molecular biotechnology* **46**, 182-196 (2010).
179. Borchard, G. Chitosans for gene delivery. *Advanced drug delivery reviews* **52**, 145-150 (2001).
180. Centelles, M.N., Qian, C., Campanero, M.A. & Irache, J.M. New methodologies to characterize the effectiveness of the gene transfer mediated by DNA-chitosan nanoparticles. *International journal of nanomedicine* **3**, 451-460 (2008).
181. Mumper, R.J., Wang, J., J.M., C. & Rolland, A.P. Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proceedings of the Controlled Release Society* **22**, 178-179 (1995).
182. Huang, M., Fong, C.W., Khor, E. & Lim, L.Y. Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **106**, 391-406 (2005).
183. Buitrago-Perez, A. et al. A humanized mouse model of HPV-associated pathology driven by E7 expression. *PloS one* **7**, e41743 (2012).
184. Ahn, W.S. et al. A therapy modality using recombinant IL-12 adenovirus plus E7 protein in a human papillomavirus 16 E6/E7-associated cervical cancer animal model. *Human gene therapy* **14**, 1389-1399 (2003).
185. He, Y.K. et al. Potentiation of E7 antisense RNA-induced antitumor immunity by co-delivery of IL-12 gene in HPV16 DNA-positive mouse tumor. *Gene therapy* **5**, 1462-1471 (1998).
186. Trinchieri, G. Immunobiology of interleukin-12. *Immunologic research* **17**, 269-278 (1998).
187. Cavallo, F. et al. Immune events associated with the cure of established tumors and spontaneous metastases by local and systemic interleukin 12. *Cancer research* **59**, 414-421 (1999).
188. Song, K., Chang, Y. & Prud'homme, G.J. IL-12 plasmid-enhanced DNA vaccination against carcinoembryonic antigen (CEA) studied in immune-gene knockout mice. *Gene therapy* **7**, 1527-1535 (2000).
189. Lui, V.W., He, Y., Faló, L. & Huang, L. Systemic administration of naked DNA encoding interleukin 12 for the treatment of human papillomavirus DNA-positive tumor. *Human gene therapy* **13**, 177-185 (2002).
190. Thomas, G.R., Chen, Z., Enamorado, I., Bancroft, C. & Van Waes, C. 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. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **86**, 368-374 (2000).

ANEXOS

A)

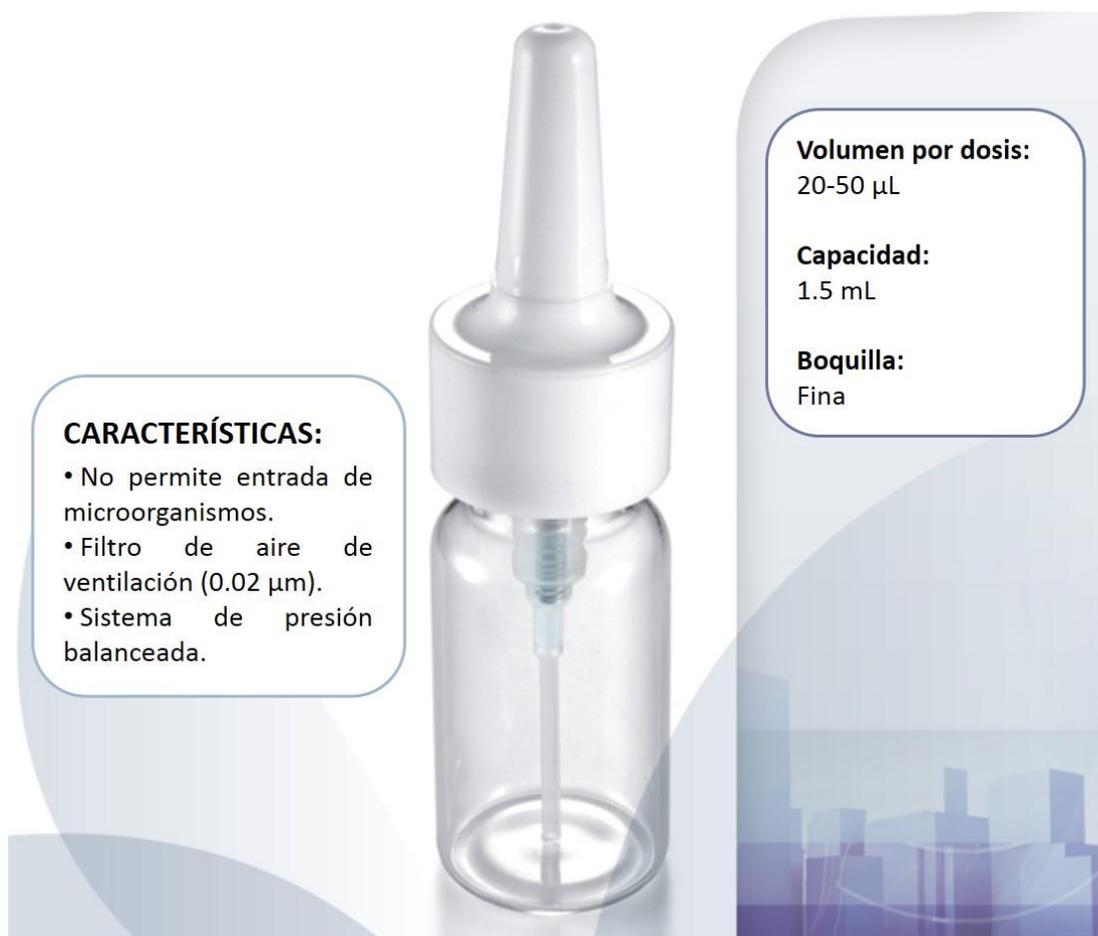


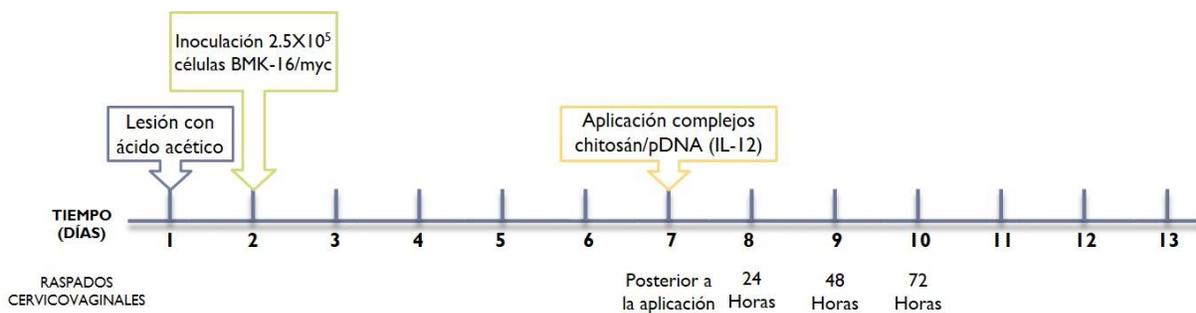
B)



Anexo 1. Plásmidos utilizados para la formación de complejos chitosán/pDNA. A) Plásmido pNGVL3m-IL12 B) Plásmido pcDNA3

SISTEMA PARA LA APLICACIÓN DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS





Anexo 3. Línea de tiempo del modelo murino de cáncer cervicouterino.
Se muestra aplicación de los complejos chitosán/pDNA(IL-12) y muestreo.