



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Elaboración de Microesferas de
quitosán acopladas con antígenos
tumorales para inmunoterapia
antitumoral**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Jesús Espinosa de los Monteros López



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Gabriela Piñón Zárate
2018**

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Espinosa de los Monteros
López
Jesús
551760 7549
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
308083455

2. Datos del tutor
Dra.
Gabriela
Piñón
Zárate

3. Datos del sinodal 1
Dr.
Andrés Eliú
Castell
Rodríguez

4. Datos del sinodal 2
M. en C.
Miguel Ángel
Herrera
Enríquez

5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Sara Judith
Álvarez
Pérez

6. Datos del sinodal 4
Dra.
Silvia
Espinosa
Matías

7. Datos del trabajo escrito
Elaboración de microesferas de quitosán
acopladas con antígenos tumorales para
inmunoterapia antitumoral
62 pp.
2018

Agradecimientos

A los miembros del comité tutorial por su apoyo y dirección en la realización y revisión de esta tesis:

- Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
- M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez
- Dra. Gabriela Piñón Zárate
- M. C. Sara Judith Álvarez Pérez
- Dra. Silvia Espinosa Matías

A los miembros del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos e Inmunoterapia por su audaz apoyo y paciencia:

- Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
- Dra. Gabriela Piñón Zárate
- M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez
- M. C. Sara Judith Álvarez Pérez
- Dra. Katya Jarquín Yáñez
- Biol. Beatriz Hernández Téllez

A la Dra. Silvia Espinosa Matías del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias de la UNAM por su ayuda en el procesamiento de las muestras de microesferas de quitosán para ser observadas en Microscopio Electrónico de Barrido y por su asesoramiento durante el proceso de observación e identificación de las mismas.

A mis queridos amigos Serch y Su, con quienes espero seguir compartiendo entrenamientos y proyectos, por su continuo apoyo y motivación.

Dedicada a mis padres, por su amor y financiamiento todos estos años,
pero sobre todo por su amor.

1. Resumen	7
Abstract	9
2. Marco teórico	11
2.1 Ingeniería de tejidos.....	11
2.1.1 Biomateriales	13
2.1.1.1 Clasificación de los biomateriales	13
2.1.1.2 Actividad biológica de los biomateriales.....	15
2.2 Microesferas.....	17
2.2.1 Técnicas de elaboración	19
2.2.2 Aplicación de microesferas en inmunoterapia	24
2.2.3 Interacción de las microesferas con células dendríticas.....	25
2.3 Microesferas de quitosán.....	26
2.3.1 Quitosán	26
2.3.2 Estructura química del quitosán	30
2.3.5 Aplicación en inmunoterapia	30
2.4 Antígenos tumorales empleados en inmunoterapia	31
2.4.1 Antígenos tumorales de melanoma	33
2.5 Células dendríticas	34
2.5.1 Efecto en células dendríticas.....	35
3. Planteamiento del problema	36
4. Justificación	37
5. Objetivo general	37
6. Objetivos particulares	37
7. Hipótesis	38
8. Materiales y métodos	38
8.1 Elaboración de microesferas.....	38
8.1.1 Materiales	38
8.1.2 Método.....	38
8.1.2.1 Obtención de lisado tumoral.....	38
8.1.2.2 Preparación de la solución acuosa	39

8.1.2.3 Emulsión w/o.....	39
8.1.2.4 Reticulación	39
8.1.2.5 Lavados y extracción del solvente.....	40
8.1.2.6 Observación de microesferas en microscopio fotónico.....	40
8.2 Prueba de vida y muerte con esplenocitos	40
8.2.1 Materiales	40
8.2.2 Método.....	40
8.3 Análisis morfológico de las microesferas	41
8.4 Citometría de flujo para conteo de microesferas	41
8.5 Prueba de liberación de proteínas	42
9. Resultados.....	43
9.1 Microesferas de quitosán observadas con microscopio fotónico.	43
9.2 Microesferas de quitosán observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y conteo por citometría de flujo.	43
9.3 Esterilización de microesferas.....	45
9.4 Prueba de citotoxicidad.....	46
9.5 Prueba de liberación de proteínas.	48
10. Discusión	48
11. Conclusiones.....	52
12. Apéndice	52
13. Referencias.....	53

1. Resumen

Actualmente, el cáncer representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Esto ha favorecido en todo el mundo la búsqueda de métodos de diagnóstico y tratamiento cada vez más novedosos y efectivos que permitan aumentar la calidad y esperanza de vida de los pacientes.

A partir de esta búsqueda ha surgido el campo de la inmunoterapia, el cual se fundamenta en la estimulación de células del sistema inmune para que éstas puedan producir una respuesta que favorezca el tratamiento de un padecimiento. Para estimular las células del sistema inmune se han empleado diferentes estrategias, una de las cuales se apoya en el uso de biomateriales para producir sistemas de entrega de moléculas que favorecen la respuesta inmune. Se ha observado que algunos de estos biomateriales pueden actuar por sí mismos como adyuvantes potenciando la respuesta.

Dentro de estos sistemas de entrega de moléculas se encuentran las microesferas, las cuales presenta diversas ventajas en el campo de la inmunoterapia dirigida contra el cáncer. A éstas pueden añadirse antígenos tumorales específicos que sean reconocidos por células dendríticas para desencadenar una respuesta inmunogénica contra el tumor.

Uno de los biomateriales más usados en la fabricación de microesferas es el quitosán, polímero obtenido mediante la desacetilación de la quitina. Se ha observado que este polímero, puede ser reconocido por macrófagos y células dendríticas (DCs), e incluso puede inducir su activación. De esta forma, es posible que las DCs activadas puedan iniciar o incrementar la respuesta inmune antitumoral, por lo que en el presente trabajo se estandarizó el procedimiento de elaboración de microesferas de quitosán acopladas con antígenos tumorales.

Para elaborar las microesferas acopladas con antígenos tumorales, se usó el método combinado de emulsión simple y reticulación, el cual consiste en realizar una emulsión acuosa/oleosa (w/o), la cual se mantiene en agitación para posteriormente agregar un entrecruzante, el cual es un agente químico que se encarga de estabilizar el complejo polimérico mediante la formación de enlaces covalentes.

Para realizar la porción acuosa de la emulsión se diluyeron 0.2 g de quitosán desacetilado $\geq 75\%$ y 0.01 g de un coctel de antígenos tumorales (obtenidos a partir de un lisado de un cultivo celular de la línea tumoral B16f10) en 10 ml de una solución de ácido acético glacial al 2% y se mantuvo en agitación en agitador magnético por 24 horas. Después de agitarse por un día se preparó la solución oleosa con 100 ml de aceite mineral y 1 ml de SPAN80 como tensoactivo. La solución acuosa se incorporó a la fase oleosa mediante goteo por 7 minutos aproximadamente mientras se agitaba con Ika ultraturax[®] a 10,200 rpm. Finalizada la mezcla acuosa/oleosa se mantuvo en agitación con agitadora magnética por 3 horas. Para finalizar se realizaron lavados alternativos con agua destilada y hexano centrifugando a 4000 rpm en ultracentrífuga.

Para realizar las pruebas de citotoxicidad se obtuvieron células de bazo de ratones c57BL/6. De estas células, se cultivaron aproximadamente 10 millones con medio DMEM a 37°C y CO₂ al 5%, de este modo se les colocaron microesferas previamente esterilizadas con alcohol y luz UV. Después de 24, 48 y 72 horas se realizó una tinción con calceína y homodímero de etidio.

Para probar la adhesión de los antígenos a las microesferas, se mantuvieron en agitación en baño maría por 24, 48 y 72 horas mientras se encontraban disueltas en agua destilada. Posteriormente se realizó un corrimiento en geles de poliacrilamida.

A partir del método estandarizado que se empleó para la preparación de microesferas, se obtuvieron partículas no citotóxicas de forma esférica con un diámetro de entre 0.5 y 1.5 µm. Los antígenos se adhirieron de manera efectiva a las microesferas.

El método combinado de emulsión simple y reticulación, es de bajo costo en comparación con otros métodos. Para estandarizar este procedimiento se modificaron diversas variables hasta conseguir un óptimo resultado. Algunos factores a los que se tuvo que prestar especial atención fueron: el aumento de temperatura durante los periodos de agitación, la velocidad de agitación y la etapa de eliminación del solvente en la cual se realizaron lavados alternativos con agua destilada y hexano. Este tipo de ensayo podrá ser empleado para la fabricación de microesferas que puedan ser utilizadas en la inmunoterapia, sobre todo porque de acuerdo a las características analizadas, éstas no inducen citotoxicidad y tienen un tamaño adecuado para ser reconocidas por células del sistema inmune del hospedero.

Abstract

At the moment, cancer represents one of the main causes of death in the world, this has caused the research worldwide for increasing novel and effective methods of diagnostic and treatment that allow the improve of life quality in patients.

From this research has arise the field of immunotherapy, which is based in immune cell stimulation in order to cause a response that allow the treatment of some ailment. In order to stimulate the cells of the immune system several strategies had been tried. One of those is based in the use of biomaterials to produce molecular delivery systems to improve the immune response, some of these biomaterials can act for themselves like adjuvants.

Between this kind of systems we can find the microspheres, which have numerous advantages in the field of immunotherapy against cancer. To these microspheres can be added specific antigenic antigens which can be recognized by dendritic cells to trigger an immunogenic response against tumor.

Microspheres can be manufactured with different materials, such as poly lactic acid (PLA), poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), calcium alginate, among others. However, it has to be noted that chitosan is a non cytotoxic and biodegradable biopolymer, that can be recognized by macrophages and dendritic cells (DCs), and even be able to cause its activation. So, according to chitosan microspheres characteristic, they may use as vehicle and immunomodulator that may induce a successful antitumor immune response. After all above, the main objective of this work was the standardization of the manufacturing procedure of chitosan microspheres coupled with tumor antigens.

In order to manufacture microspheres coupled with tumor antigens, a combined simple emulsion and reticulation method was used. It consisted in making an emulsion water/oil (w/o) and then mixed with a crosslinker.

In order to manufacture the aqueous phase of the emulsion, $\geq 75\%$ 0.2 g of deacetylated chitosan was diluted and 0.01 g of tumor antigens cocktail (obtained from a lysed B16-F10 cell culture) were mixed in 10 of 2% glacial acetic acid and maintained stirring by 24 hours. Then, an oil phase was performed with 100 ml of mineral oil and 1 ml of SPAN80 as surfactant. The aqueous phase was incorporated to the oil phase by dropping and stirring with the Ika ultraturrax[®] at 10,200 rpm for about 7 minutes. Afterwards, the emulsion was kept in agitation with a magnetic stirrer for 3 hours.

To perform cytotoxic tests, bone marrow cells were obtained from c57BL/6 mice. 1×10^7 bone Marrow cells were cultivated with microspheres previously sterilized in alcohol and UV. 24, 48 and 72 hours later, cells were staining with calcein and ethidium homodimer kit.

In order to prove the adhesion of the antigens, microspheres coupled antigens were stirred at 36°C in distilled water for 24, 48 and 72 hours. Later the presence of the antigens was obtained with polyacrylamide gels.

Simple emulsion and reticulation method is cheaper than other methods of microspheres manufacturing. Many variables were taken into account to achieve an optimal standardization of this method. Some of the main factors in this process were: achieve a stable temperature during stirring, the stirring speed and the solvent elimination stage based in alternative wash with distilled water and hexane. After all changes made, spherical, antigens charged and non-cytotoxic particles from 0.5 to 1.5 μ of diameter were obtained.

The microspheres manufacturing method was standardized, obtaining spherical and non-cytotoxic particles from 0.5 to 1.5 μ of diameter. Also, antigens were effectively adhered to microspheres.

2. Marco teórico

2.1 Ingeniería de tejidos

La idea de reemplazar un tejido estropeado por otro sano ha rondado el ideario médico desde el siglo XVI (O'Brien, 2011). El término "Ingeniería de Tejidos" fue acuñado hasta 1988 por la Fundación Nacional para la Ciencia, por sus siglas en inglés, "NSF's". La NSF denominó el campo de la ingeniería de tejidos como: "La aplicación de principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida hacia el entendimiento fundamental de las relaciones entre estructura y función en tejidos de mamíferos normales y patológicos y el desarrollo de substitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de los tejidos". A partir del desarrollo de esta área del conocimiento han surgido diversas técnicas para el tratamiento y la sustitución de órganos y tejidos afectados por diversas causas.

O'Brien (2011) a su vez aclara que la ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario, construido a partir del trabajo de expertos en diferentes áreas del conocimiento relacionadas tanto con las ciencias de la vida como con la ingeniería. Para entender cómo interfiere la ingeniería de tejidos en la labor biomédica es necesario conocer los tres pilares en que se basa la ingeniería de tejidos: células, señales y andamios. Las células, siendo la unidad fundamental de la vida contribuyen en gran medida a la reparación tisular, por su parte las señales son moléculas encargadas de desencadenar una respuesta en el tejido blanco, a su vez, los andamios son estructuras elaboradas con materiales de origen natural o sintético que actúan como soporte de las señales y las células. Estos tres elementos a menudo son referidos como "la triada de la ingeniería de tejidos". Esta combinación de elementos puede ser implantada directamente en el sitio dañado donde el andamio es substituido lentamente por las células propias del cuerpo o puede cultivarse *in vitro* como soporte de otras células hasta formar un tejido que será después implantado en el sitio dañado del paciente (O'Brien, 2011).

En el área de la ingeniería de tejidos la fabricación de andamios tiene vital importancia ya que estos, además de actuar como soporte, son los encargados de proporcionar al tejido receptor las moléculas encargadas de activar al sistema inmune. Para Howard et al. (2008) "Los andamios están diseñados para influir el entorno físico, químico y biológico de una población celular y sus funciones características son las de proveer soporte estructural y la entrega de factores de crecimiento y/o células para formar tejidos nuevos". De este modo para reparar tejidos dañados se usan andamios tridimensionales porosos que proveen soporte tanto para células, como para factores de crecimiento y otras moléculas que contribuyen a la reparación tisular. Chan y Leong (2008), menciona a los andamios como elementos estructurales que unen y permiten la comunicación entre células y tejidos, además son elaborados típicamente con biomateriales poliméricos, los cuales mejoran su interacción con sistemas orgánicos.

Para elaborar un andamio funcional se deben considerar diversos factores. Para empezar, el andamio debe contar con características que le permitan interactuar con los componentes del sistema vivo en el cual será implantado sin generar respuestas que comprometan la integridad del

organismo hospedero. Es por esto que el primer aspecto a considerar en la elaboración de un andamio es su biocompatibilidad, cualidad que le permite al material interactuar con un organismo sin causar daño. Además es importante que el andamio presente bioadhesión del tejido al implante y que promueva la proliferación celular y migración dentro de su misma estructura (Velasco y Garzón, 2010). Asimismo, es de vital importancia que el andamio implantado no cause una respuesta inflamatoria que ocasione el rechazo del implante por el organismo (Badylak y Gilbert, 2008).

Además de su interacción con sistemas biológicos, las propiedades mecánicas del andamio son de vital importancia para su diseño y utilización, ya que dependiendo del sitio en el cual sea implantado se requerirán de distintas cualidades mecánicas. En este sentido deben tener la fuerza suficiente para permitir la manipulación quirúrgica durante su implantación. Además de estos factores, la arquitectura del andamio debe permitir la penetración celular y la difusión de nutrientes, así como la salida de los productos de la degradación. Para esto su estructura tiene que componerse de poros interconectados, además los poros deben tener el tamaño adecuado para la correcta migración y adhesión de las células. El tamaño crítico de poro depende del tipo celular que será utilizado (Bružauskaitė et al. 2016).

Otro aspecto importante a considerar es la biodegradabilidad, que es la capacidad que tiene el andamio para ser reemplazado paulatinamente por las células propias del cuerpo del paciente. Los andamios por lo tanto, deben ser biodegradables para permitir a las células la producción de su propia matriz extracelular. Además, los subproductos de esta degradación no deben ser tóxicos y tienen que ser capaces de salir del organismo sin causar ningún daño a otros órganos. La degradación del andamio en conjunto con la formación de tejido nuevo requiere de la participación del sistema inmune, es por eso que la inmunología juega un papel fundamental en la en las terapias regenerativas.

Los sistemas de entrega de fármacos y moléculas son un tipo de andamios diseñados a escalas nanométricas y micrométricas. Estos dispositivos deben contar con diversas características que les permitan ser funcionales *e.g.* biodegradabilidad, biocompatibilidad, estructura porosa y propiedades mecánicas idóneas son características consideradas durante su elaboración, sin embargo, actúan a escalas mucho menores de modo que sirven como soporte de moléculas de tamaños nanométricos como citocinas o antígenos y son usadas a menudo en la estimulación y activación del sistema inmunológico. En estos sistemas de entrega (delivery systems), los agentes bioactivos se encuentran envueltos dentro de una matriz polimérica, la cual los libera lentamente en un proceso de erosión, difusión o ambos (Nair y Laurencin, 2007).

Las microesferas funcionan como andamios debido a su capacidad portadora y liberadora de moléculas, añadiendo la particularidad de que tienen movilidad dentro del organismo debido a su tamaño y morfología (Blanco et al. 2015), lo cual las hace un instrumento de gran utilidad para estimular células del sistema inmune.

2.1.1 Biomateriales

El Instituto Nacional Americano de Salud, por sus siglas en inglés “NIH”, define a los biomateriales como “cualquier sustancia o combinación de sustancias, excepto fármacos, de origen sintético o natural, que pueden ser usadas por un periodo de tiempo, para aumentar o reemplazar total o parcialmente un tejido, órgano o función del cuerpo, para mantener o mejorar la calidad de vida del individuo”. Además, Nair y Laurencin, 2007 señalan que “no hay sólo un biomaterial que pueda considerarse como biomaterial ideal, sino que la fabricación de algún biomaterial depende de la aplicación médica en la que quiera ser utilizado”.

Además de la capacidad del biomaterial para interactuar con sistemas biológicos, para poder determinar el uso de un biomaterial se deben probar sus características físicas, algunas de las cuales son: módulo elástico, el cual mide la tasa de tensión que el biomaterial puede soportar antes de sufrir fractura; compresión, la cual mide la tensión que puede soportar el biomaterial al ser sometido a fuerzas de presión; fatiga, la cual ocurre cuando el biomaterial después de ser sometido de manera repetida a fuerzas tensiles o de compresión; viscoelasticidad que está asociada con la capacidad de deformación del biomaterial (dos Santos et al. 2017). Además es importante la interacción del biomaterial con el agua, esto es, sus propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas (Vogler 2004). La caracterización nano y micrométrica también es importante, porque de esto último puede depender como va a interactuar con ciertos tejidos y con células determinadas.

Hasta ahora, los biomateriales habían sido empleados sobre todo para la diferenciación de células precursoras de hueso, cartílago, tejido adiposo y otros, para tratar de mimetizar el microambiente de los tejidos, sin embargo, ahora también se ha estudiado el efecto de los materiales en los distintos tipos de respuestas inmunológicas, sobre todo porque es muy probable que los materiales empleados sean colocados en pacientes con alguna lesión. Así, se ha constatado que la forma, tamaño, superficie, funcionalidad química, peso molecular y tipo de degradación del biomaterial son factores que afectan el tipo de respuesta inmune causada por éste. Por ejemplo, se ha observado preferencia a internalizar nanopartículas de oro con forma de bastón vía micropinocitosis por parte de macrófagos, contrario a la internalización de nanoesferas del mismo material (Bartneck 2010). En otros estudios se ha comparado la activación del inflammasoma en presencia de partículas con superficie lisa y rugosa (Andorko y Jewell, 2017).

2.1.1.1 Clasificación de los biomateriales

Los biomateriales pueden clasificarse en base a su composición en tres grandes grupos: metales, cerámicas y polímeros. Los implantes metálicos son los materiales más usados en cirugía ortopédica. Aunque proveen fuerza mecánica y resistencia a la corrosión, pueden causar inflamación crónica e irritación. Debido a esto se han desarrollado implantes metálicos

biodegradables basados en magnesio (Mg), el cual es un mineral esencial en el metabolismo humano, actuando como cofactor enzimático y estabilizador de ácidos nucleicos.

Las cerámicas son compuestos inorgánicos no metálicos sólidos, formados por elementos metálicos y no metálicos unidos iónica y covalentemente endurecidos mediante la acción del calor. Son usados como empaste para rellenar imperfecciones óseas, fijación de fracturas y cubiertas protéticas. A su vez se dividen en bioinertes (aluminio, circonio, etc.), bioactivos (cerámicas vítreas) y bioreabsorbibles (fosfatos de calcio, etc.). Sus principales aplicaciones son como material de injertos óseos (Godavitarne et al., 2017).

Los polímeros son macromoléculas compuestas de monómeros unidos covalentemente. Pueden encontrarse en forma de co-polímeros (formados por unidades monoméricas diferentes) u homopolímeros (formados por unidades monoméricas iguales). Las cadenas poliméricas pueden ser lineales, ramificadas, entrecruzadas, amorfas o cristalinas. El tipo de cadena se relaciona con la fuerza y degradación del material. El uso de polímeros tiene la ventaja de que se pueden modificar sus propiedades mecánicas así como su cinética de degradación, por ello son ampliamente usados para la aplicación biomédica. Los polímeros pueden usarse en forma de hidrogeles, los cuales son redes tridimensionales de polímeros con la capacidad de incorporar agua sin disolverse.

A su vez, los polímeros pueden ser de origen natural o sintético. Los polímeros naturales se forman a partir de un proceso natural de polimerización, su composición se divide en proteínas, polisacáridos y glucosaminoglicanos. Este tipo de polímeros son usados para distintas aplicaciones clínicas, tales como rellenos dérmicos, selladores de heridas, esponjas quirúrgicas, etc. Como su nombre lo dice, son obtenidos de fuentes naturales *i. e.* son producidos en la naturaleza, de donde se obtienen. La agarosa por ejemplo, es un polisacárido de D-galactosa y 3, 6-anhidro L-galactopiranososa y es obtenido de las paredes celulares de las algas rojas; el colágeno es la proteína más abundante de los mamíferos y se encuentra en el tejido conectivo de estos; el alginato es un copolímero de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico y es extraído de las algas pardas; el ácido hialurónico es un glucosaminoglicano formado por residuos de N-acetilglucosamina y D-glucurónico y está presente en altas cantidades en la matriz extracelular del tejido conectivo, epitelial y tejidos neurales, sin embargo, su uso requiere de entrecruzantes ya que por sí mismo no gelifica y se degrada rápidamente en oligosacáridos por la acción de la enzima hialuronidasa; el quitosán es obtenido de la desacetilación de la quitina, otro polímero natural presente en el exoesqueleto de crustáceos, artrópodos y en las paredes celulares de hongos, puede formar geles mediante entrecruzamiento covalente con aldehídos como el glutaraldehído o por entrecruzamiento iónico con polianiones como citrato de sodio o tripolifosfato de sodio. Los polímeros naturales tienen mejor capacidad para interactuar con células y presentan poca respuesta inflamatoria. Muchos de este tipo de polímeros han sido usados en la fabricación de microesferas, *e. g.* quitina, gelatina, alginato de sodio y albúmina. La mayoría de los polisacáridos de origen natural como la celulosa, dextrina, pectina, ácido alginico, agar, agarosa y carrogenanos son ácidos, mientras que la quitina y el quitosán son polisacáridos altamente básicos (Cho et al. 2015; Dutta et al. 2004; Tamariz et al. 2013).

Los polímeros sintéticos son biomateriales diseñados por el ser humano. Poseen diversas cualidades físicas que les permiten ser usados en la biomedicina, algunas de estas cualidades implican mejor control de factores como el peso molecular, cinética de degradación, forma, entre otras características (Gunatillake 2003). Han sido usados en la fabricación de microesferas polímeros sintéticos como poliláctidos (PLA), poliglicólidos (PGA), poli (láctido co-glicólidos) (PLGA), polianhídridos, policianoacrilatos, poliuretanos, polifosfoésteres, polidixanona, etc. El PLGA es uno de los polímeros sintéticos que ha sido más usado para la fabricación de nano y microesferas debido a que presenta biocompatibilidad y es biodegradable (Navagarma et al. 2012). A su vez, los polímeros sintéticos pueden dividirse en polímeros de degradación hidrolítica y polímeros de degradación enzimática. Los primeros son usados generalmente como implantes y algunos ejemplos son: poli(α -hidroxiácidos), poliésteres, poliuretanos y poli(éster amidas) (Godavitarne et al. 2017; Tamariz et al., 2013).

Aquellos biomateriales obtenidos de fuentes naturales pero que pasan por procesos químicos son denominados “biomateriales semisintéticos” (Bhat 2013). En estos, el proceso de polimerización ocurre en la naturaleza, de donde son extraídos para ser posteriormente modificados artificialmente. Mogosanu et al. 2016 menciona algunos ejemplos de polímeros semisintéticos que han sido usados para elaborar sistemas de entrega de fármacos, tales como micropartículas y microesferas; la amilosa conjugada con ácido linoleico (CLA), almidón hidrofóbico modificado por entrecruzamiento con ácidos grasos de cadena larga, celulosa catiónica anfifílica, acetato de pullulan biotinilado (BPA), ácido hialurónico (HA) modificado hidrofóbicamente, HA entrecruzado con 2, 2'-(etilenedioxi)-bis-(etilamina), alginato tiolado (ALG-CYS), complejos de quitosán-tripopolifosfato, etil celulosa, acetato de celulosa, quitosán, entre otros.

2.1.1.2 Actividad biológica de los biomateriales

Se ha observado que los biomateriales tienen la capacidad de estimular vías del sistema inmune. El uso de polímeros naturales ha sido muy difundido en el transporte de agentes bioactivos debido a sus cualidades. El alginato, por ejemplo, es un polisacárido natural ampliamente usado, el cual es biocompatible, tiene poca toxicidad, además de ser biodegradable y presentar mucoadhesión. La facilidad de este tipo de polímeros de permanecer en el organismo sin generar efectos tóxicos les ha permitido ser centro de diversos estudios para la elaboración de microesferas y otros sistemas de entrega basados en la elaboración de partículas (Lehr et al. 1992).

Andorko et al. (2017) sugiere que estas respuestas son causadas por las propiedades fisicoquímicas de los biomateriales. El tamaño, la forma, la carga superficial, el peso molecular y la hidrofobicidad son algunas de las características que pueden ser modificadas y que afectan la interacción del biomaterial con el organismo en el cual será implantado. Los biomateriales y sus

propiedades han sido ampliamente aprovechados en ingeniería de tejidos, en la elaboración de sistemas de entrega de fármacos, en inmunoterapia y en el diseño de implantes (Buckles, 1983).

Muchos biomateriales presentan características estructurales que les permiten ser reconocidos como DAMPs y PAMPs por parte de receptores de membrana. Particularmente el sistema inmune responde a patrones repetitivos de cadenas poliméricas, como por ejemplo, los polisacáridos presentes en las paredes celulares de bacterias (Andorko et al. 2017). Una vez que el andamio ha sido implantado, éste forma parte del microambiente que favorece la respuesta de las células del sistema inmune del organismo, por lo cual los biomateriales que lo constituyen jugarán un papel importante en su interacción con el medio.

De esta manera, la interacción de un biomaterial determinado con el medio biológico dependerá en gran medida de su composición química y de las moléculas que hayan sido acopladas al material para ser liberadas dentro del organismo blanco. La biodegradabilidad le permite a los biomateriales realizar muchas de sus funciones en la biomedicina, además, es resultado de la interacción del material con su medio, *e. g.* en la degradación hidrolítica de polímeros biodegradables intervienen diversos grupos funcionales, tales como ésteres, ortoésteres, carbonatos, anhídridas, amidas, ureas, etc (Engineer et al. 2011).

Nair et al. (2007) destaca la importancia que han cobrado actualmente los materiales biodegradables (hidrolíticamente y enzimáticamente degradables) dentro del campo de la biomedicina. Estos han reemplazando paulatinamente el uso de muchos dispositivos prostéticos permanentes basados en biomateriales bioestables. La sustitución de biomateriales permanentes por biodegradables ha coincidido con la eclosión de áreas como la ingeniería de tejidos, la terapia génica y la nanobiotecnología (Hutmacher, 2001).

El proceso de biodegradación puede llevarse a cabo por interacciones físicas, químicas o biológicas *viz.* cuando un material está en contacto con fluidos corporales puede experimentar cambios en sus propiedades fisicoquímicas como resultado de sus interacciones con el medio. Los tipos de enlace que forman las cadenas poliméricas del biomaterial empleado, ejercen mucha influencia en la velocidad de degradación. Por ejemplo, en los polifosfacenos, la tasa de degradación varía dependiendo del tipo de ésteres amino acídicos usados, *e. g.* los polifosfacenos sustituidos con glicina etil ester muestran degradación más rápida (Lakshmi et al. 2003).

Dentro de un organismo, la tasa de degradación depende de las características del polímero y del sitio del cuerpo en el cual se encuentre. La degradación química está influenciada por la composición, estructura molecular, polidispersidad, cristalinidad, área de superficie, hidrofobicidad e hidrofiliidad. En general, este tipo de degradación causa el deterioro de las cadenas del polímero por escisión aleatoria de enlaces covalentes interfiriendo con el orden regular de la cadena y la cristalinidad. La degradación puede ser de dos tipos: superficial y a granel. En la segunda todo el material colapsa debido a que el proceso de degradación ocurre a través de todo su volumen. A diferencia de ésta, la degradación superficial ocurre en polímeros hidrofóbicos, dejando la estructura interna intacta; con estos polímeros es más fácil controlar la

tasa de degradación. Mientras que los materiales poliméricos pueden ser degradados dentro del cuerpo por al menos tres mecanismos: oxidación, hidrólisis y mediante actividad enzimática (Tamariz et al. 2013).

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas obtenidas como subproducto del metabolismo del oxígeno, las cuales tienen la capacidad de reaccionar indiscriminadamente con biomoléculas. Se ha observado que durante la respuesta inflamatoria, las células inflamatorias son capaces de producir altas cantidades de especies reactivas de oxígeno *i. e.* superóxido, (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO) y ácido hipocloroso (HOCl). El efecto oxidativo de estas especies puede causar rompimiento de las cadenas poliméricas y contribuir a su degradación (Tamariz et al. 2013).

Las reacciones hidrolíticas causan la ruptura de enlaces químicos y por lo tanto, la formación subsecuente de oligómeros y finalmente monómeros. Estas reacciones pueden llevarse a cabo mediante enzimas llamadas hidrolasas (esterasas, proteasas, glicosidasas, fosfatasas, etc.). Las reacciones de hidrólisis pueden catalizadas por ácidos, bases o sales (Tamariz et al. 2013).

Por último la degradación enzimática, como su nombre lo indica, involucra la actividad de diversas enzimas presentes en el organismo, las cuales pueden realizar su función de manera inespecífica, rompiendo enlaces de distintos polímeros como las hidrolasas o pueden realizar su función de forma específica como en el caso de los polímeros naturales *e. g.* en mamíferos, la degradación del ácido hialurónico se lleva a cabo por la hialuronidasa, la b-D-glucuronidasa y la b-N-acetil-D hexosaminidasa; en el caso de los derivados de la quitina, la lisozima es la encargada de su degradación dentro del cuerpo. También las enzimas liberadas por fagocitos activados participan en la degradación de los biomateriales implantados; se ha observado que los macrófagos y neutrófilos secretan altas cantidades de mieloperoxidasas, lisozimas y metaloproteinasas en respuesta a patógenos; a su vez, las superficies hidrofílicas de los biomateriales interactúan con proteínas de la sangre como fibronectina, fibrina y albúmina, las cuales inducen la adhesión de neutrófilos estimulando la liberación de gránulos que contienen grandes cantidades de enzimas (Reis et al. 2004). Algunos ejemplos de polímeros enzimáticamente degradables son las proteínas, colágena, poli aminoácidos naturales y sintéticos, poli ácido aspártico, elastina, fibrina, polisacáridos, quitina y quitosán.

2.2 Microesferas

Existen diferentes sistemas de entrega, los cuales varían en forma y tamaño, de este modo, pueden ser nano o micrométricos y pueden tener forma esférica, de bastón, amorfa, etcétera. Las microesferas son micropartículas (partículas de 1 a 1000 μm) de forma esférica, sin membrana o ninguna otra capa externa. Se componen de una matriz, la cual puede tener sustancias embebidas, disueltas o unidas mediante enlaces covalentes (Rajput et al. 2012; Vert et al. 2012). Al ser

combinadas con otras moléculas pueden formar sistemas de entrega. De este modo efectúan diferentes funciones como proteger a las moléculas transportadas de la degradación, liberar de manera controlada las moléculas acopladas o permitir la administración de dosis mayores a las permitidas en los tratamientos convencionales (Kim y Pack 2006).

Las microesferas están diseñadas para transportar agentes activos en dosis específicas y dirigirlos a la localización del cuerpo donde es requerido, de forma que optimiza la eficacia mientras que disminuye los efectos secundarios. De este modo permiten la protección de moléculas bioactivas, controlan su perfil espacio-temporal de liberación y permiten la entrega de diferentes agentes al mismo tiempo (Koshy y Mooney, 2016).

Las microesferas pueden transportar diferentes tipos de moléculas *e. g.* citocinas, fármacos o antígenos proteicos. Además, pueden ser cubiertas con diferentes materiales para incrementar la señal con algún material diferente o para aumentar el tiempo de liberación, de este modo, la composición del sistema de entrega tiene gran repercusión en la actividad de éste, *e. g.* Fontana et al. (2017) presentan diferentes tipos de estudios con microesferas, en uno de estos, se realizaron microesferas de PLGA con los antígenos MPLA y MUC1 encapsulados, para promover la activación de linfocitos T contra melanoma. En este estudio micro y nanoesferas de PLGA fueron cubiertas con una bicapa fosfolipídica a la que iban unidos los antígenos, de tal manera que se hallaban desplegados en la superficie de la partícula. Estas partículas aumentaron la producción de anticuerpos *in vivo*, además se liberaron altas cantidades de citocinas proinflamatorias mostrando resultados prometedores contra melanoma. Por otra parte, Lavi et al. 2007, reporta la elaboración de microesferas de PLGA, polímero sintético que también ha alcanzado alta demanda en la ingeniería de tejidos, para acoplar IL-1RA para el tratamiento de cáncer pulmonar murino. A su vez, la interacción que tienen los biomateriales que componen a las microesferas con el agua juega también un papel importante; a pesar de que las microesferas pueden realizarse con polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos, Baimark y Srisuwan (2013) han observado que la respuesta de las células a microesferas biodegradables hidrofílicas es mejor que a microesferas biodegradables hidrofóbicas.

La liberación controlada de moléculas bioactivas es otra de las ventajas del uso de microesferas en diferentes áreas de la biomedicina. Esta cualidad de los sistemas de entrega tiene diversas ventajas como proteger de la degradación *e. g.* en la encapsulación del DNA, éste se ve protegido de la degradación por nucleasas, además le permite ser administrado por diferentes rutas. A pesar de esto, la encapsulación por parte de microesferas presenta diversas desventajas, principalmente debido a la desnaturalización de las moléculas encapsuladas durante el proceso de preparación (Kim y Pack, 2006).

Las microesferas pueden tener moléculas adicionales que mejoran las propiedades biofísicas de la molécula activa, lo cual aumenta su biodisponibilidad, *e. g.* Silva et al. (2013) buscaron aumentar la solubilidad en agua de la anfotericina B, debido a que esta molécula es, por sí misma, anfotérica y

anfílica. Para lograrlo, la mezclaron con microesferas lipídicas y surfactantes, lo cual mejoró su administración por vía oral.

Dentro del campo de la inmunoterapia, el uso de microesferas presenta la gran ventaja de que éstas, además de actuar como cargadoras de otras moléculas, pueden actuar como adyuvantes por sí mismas, ejerciendo de este modo doble función: la de ser acarreadoras y al mismo tiempo moléculas activas, sin embargo, esta función depende principalmente del biomaterial del cual se conforman.

2.2.1 Técnicas de elaboración

Existen diferentes métodos para elaborar microesferas: coacervación, secado por pulverización, emulsión múltiple, gelificación iónica, emulsión simple, etc. (Tabla 1). La elección del método de preparación está en función de la naturaleza del polímero y del tipo de terapia que se quiere aplicar. A partir de la manipulación de las diferentes variables involucradas en los procedimientos para preparar microesferas, se pueden modificar sus características, tales como el tamaño de partícula, la eficiencia de retención del fármaco, el porcentaje de mucoadhesión y el tiempo de liberación de las moléculas unidas al sistema de entrega (Bansal et al. 2011; Kotadiya et al. 2009; Rajput et al., 2012).

La elaboración de sistemas de entrega moleculares (microesferas, liposomas, microcápsulas, etc.) usualmente implica el uso de solventes orgánicos y agentes entrecruzantes. Algunos procedimientos químicos consisten en la formación de complejos entre polímeros y surfactantes (Kim et al., 2002). Generalmente el tipo de técnica depende de los compuestos utilizados y de reacciones químicas y procedimientos físicos que se llevan a cabo durante el proceso. En algunos estudios se han usado lípidos y liposomas para generar vacunas. Fontana et al. (2017) usó listeriolisina O, molécula presente en la bacteria patógena *Listeria sp.* que le permite liberarse de los endosomas para vivir intracelularmente, para disminuir la inmunogenicidad de liposomas usados en vacunas. La elaboración de sistemas de entrega son muy importantes, dado que al cambiar los parámetros de los métodos de obtención de microesferas se pueden adquirir diferentes resultados, por ejemplo, diferentes tamaños de partícula. Los métodos usados más comúnmente a escala industrial son aquellos basados en la preparación de emulsiones seguida de la extracción del solvente. Aunque el uso de estas técnicas también puede presentar desventajas, como la dificultad de remover por completo residuos de los componentes orgánicos usados o de entrecruzantes a la solución (Kim y Pack, 2006).

Durante la preparación de las microesferas de quitosán intervienen muchos factores que pueden afectar sus propiedades. Se ha observado que la temperatura también afecta la formación de las partículas, Fan et al. 2012 menciona que al aumentar la temperatura durante el proceso de formación de 10°C a 60°C el tamaño tiende a disminuir, además la viscosidad de la solución también disminuye al aumentar la temperatura.

Tabla 1. Técnicas usadas en la elaboración de microesferas.

Técnica	Fundamento	Ejemplo	Referencias
Coacervación	Se solubiliza el polímero y posteriormente se añade sustrato para precipitar el polímero con un recubrimiento	Microesferas de hidrogel con polifosfacenos usadas para entrega de proteínas. Este procedimiento permitió la encapsulación de proteínas.	Sinha et al. (2004); Adrianov et al. (1998).
Coacervación compleja	Se usan diferentes materiales para el recubrimiento de las micropartículas; alginato de sodio, carboximetilcelulosa de sodio, k-carragenano, ácido poliacrílico, etc.	Eghbal et al. (2018), hacen una revisión de encapsulación y liberación de agentes en sistemas alimenticios; a su vez, Yin et al. (2003), preparó microesferas con anhídrido de estireno-alt-maleico y PDADMAC entrecruzados con poliaminas.	Sinha et al. (2004), Yin y Stöver (2003); Eghbal et al. (2018).
Emulsificación modificada y gelación ionotrópica	Se fundamenta en la interacción de los grupos funcionales con carga del quitosán con diferentes aniones a diferentes niveles de pH. En estos rangos de pH se forman micropartículas irregulares, después deben entrecruzarse con gelatina para la formación de microesferas.	Mediante esta técnica de separación Shu et al. (2001), prepararon microesferas de quitosán/gelatina usando las interacciones electrostáticas con tres tipos de aniones (tripopolifosfato, citrato y sulfato) en lugar de agentes entrecruzantes.	Shu et al. (2001).
Emulsificación y gelación ionotrópica	Se forman dos fases, la solución de quitosán como la parte dispersa y es añadida a la fase continua que la contiene. Se agregan contraiones para efectuar la gelación. Por último las microesferas son extraídas por el método de preferencia <i>e. g.</i> lavados y	Lim et al. (1997) reportan la preparación de microesferas de quitosán mediante este método sin agentes entrecruzantes, aprovechando al igual que el método anterior, la interacción del quitosán con	Lim et al. (1997).

	filtración.	contraiones.	
Emulsión múltiple	Se realiza la emulsión con los fármacos insolubles en la solución de quitosán y estos son atrapados mediante el paso de entrecruzamiento. A partir de la emulsión se puede extraer el solvente mediante diferentes técnicas, tales como evaporación o centrifugación.	Fabricación de microesferas de PLGA, quitosán, ácido poliláctico, entre otros materiales.	Lee y Weitz, (2009); Kemala et al. (2012).
Emulsión y entrecruzamiento	Se puede realizar con soluciones w/o, en las cuales la fase dispersa se compone del polímero disuelto en agua y se añade a la fase continua compuesta por la sustancia oleosa con un tensoactivo. También se puede realizar del modo contrario para formar soluciones o/w.	Baimark y Srisuwan (2014) recopilan ejemplos con diferentes polímeros usados como matriz <i>e. g.</i> fibroína de seda, quitosán, almidón etc. A su vez Hejazi y Amiji (2002) compararon en método de emulsión con entrecruzante y sin entrecruzante para formar microesferas que contenían tetraciclina.	Baimark y Srisuwan (2014); Hejazi y Amiji (2002).
Entrecruzamiento	Consiste en formar redes tridimensionales a partir de la formación de enlaces covalentes. Una sustancia denominada “entrecruzante” es la encargada de formar dichos enlaces. Esta sustancia puede estar formando enlaces directamente con la matriz polimérica o puede ser desechada después de producir la reacción química entre las moléculas del polímero. Pueden usarse entrecruzantes de	El-Shafy et al. (1999), reportan el uso de calor como agente entrecruzante. A su vez, Baimark y Srisuwan (2014) emplearon iones de Ca ²⁺ como agentes entrecruzantes en la fabricación de microesferas de alginato. En sus experimentos analiza el efecto de diferentes concentraciones de Ca ²⁺ en la liberación del fármaco y la morfología de las microesferas.	El-Shafy et al. (1999); Baimark y Srisuwan (2014).

	origen sintético como glutaraldehído, formaldehído, etc., o agentes de origen natural como la genipina.		
Gelación ionica	Generalmente se usan contraiones <i>i. e.</i> iones con carga contraria que neutralizan las cargas del polímero.	<p>Sinha et al. (2004) reporta que han sido usados contraiones de bajo peso molecular como pirofosfato, tripolifosfato, tetrapolifosfato, octapolifosfato, hexametafosfato; contraiones hidrofóbicos como alginato, k-carragenano, poli-1-hidroxi-1-sulfonato-propeno-2 y iones de alto peso molecular como octil sulfato, lauril sulfato, hexadecil sulfato, cetilstearyl sulfato, etc.</p> <p>Además Fan et al. (2012) mencionan que el tripopolifosfato de sodio (TTP), el cual es un polianion de baja toxicidad que ha sido usado en el proceso de formación por gelación ionica de microesferas de quitosán, debido a la interacción de las cargas positivas de los grupos amino del quitosán con las cargas negativas de TTP.</p>	Sinha et al. (2004); Fan et al. (2012).
Inversión de fase húmeda	La solución polimérica es mezclada con otra solución con contraiones, para después realizar el entrecruzamiento.	Sinha et al. (2004) reporta el uso de esta técnica para la formación de microesferas porosas.	Sinha et al. (2004)

Microemulsión	El método de microemulsión se ha usado para incrementar la solubilidad y biodisponibilidad de diferentes fármacos, además de reducir su citotoxicidad.	Silva et al. (2013), usaron este método para incorporar anfotericina B en micropartículas de aceite.	Silva et al. (2013).
Precipitación química	Consiste en la precipitación del polímero, la cual puede llevarse a cabo por la reacción con diferentes compuestos. Después de la precipitación pueden añadirse entrecruzantes para estabilizar la microesfera.	Downey et al. (1999) reportan la preparación de Microesferas de poli(divinilbenceno) precipitadas en acetonitrilo.	Downey et al. (1999).
Spray-drying	Mediante esta técnica, a partir de la solución líquida polimérica se elabora polvo seco con gas caliente y se añade entrecruzante. Para realizar esta técnica se requiere de máquinas especializadas.	Se han preparado microesferas de quitosán mediante este método con y sin entrecruzantes	He et al. (1999)

2.2.2 Aplicación de microesferas en inmunoterapia

La idea de estimular el sistema inmune propio del paciente para contraatacar enfermedades como el cáncer fue propuesta por William B. Coley a finales del siglo XIX (McCarthy 2006). Pero fue hasta el siglo pasado cuando se inició el uso de sistemas de entrega para inducir la activación del sistema inmune. Así, el desarrollo de sistemas de entrega ha sido de gran importancia para el tratamiento de distintas enfermedades ya que la administración repetitiva de medicamentos por largos periodos de tiempo puede tener efectos secundarios perjudiciales en el organismo. El uso de sistemas de entrega permite la liberación gradual de las moléculas activas durante periodos prolongados de tiempo, además de que éstas pueden estar dirigidas a tejidos o a órganos específicos. En las inmunoterapia contra el cáncer se han aplicado diferentes enfoques *e. g.* inhibidores de checkpoints, vacunas dirigidas contra tumores, entre otros (Zitvogel et al. 2008).

Las terapias más usadas actualmente, requieren de la administración reiterada de altas dosis del compuesto activo, para alcanzar concentraciones biológicamente relevantes en el tejido blanco, lo cual frecuentemente resulta en toxicidad sistémica. Además, los métodos actuales de transferencia adoptiva celular no siempre facilitan la activación óptima de células T. Debido a esto, el uso de vehículos basados en biomateriales en la inmunoterapia ha cobrado gran importancia, ya que permite sortear las limitaciones antes mencionadas (Cheung y Mooney, 2015). Por otro lado, Li et al. (2013) analizaron el efecto de nanopartículas liposomales con IL-15 α e IL-21 unidas a la superficie de linfocitos T autólogos específicos para melanoma que habían sido extraídos previamente del paciente. Estas partículas potenciaron la supervivencia y la circulación sistémica de las células T.

Se han propuesto distintas alternativas basadas en el uso de nanoesferas, micropartículas y andamios en la inmunoterapia (Koshy y Mooney, 2016). En relación con las micropartículas, se han propuesto diferentes tipos de éstas para ser usadas como sistemas de entrega en terapias contra cáncer (nanopartículas poliméricas, liposomas, micelas, micropartículas inorgánicas, etc.). El uso de micro y nanopartículas en vacunas antitumorales ha mostrado resultados prometedores en estudios preclínicos (Wong et al. 2016), sin embargo, aún no se han realizado estudios clínicos exitosos con vacunas para el tratamiento contra el cáncer. Actualmente, los sistemas actualmente más estudiados, son aquellos basados en partículas poliméricas, en dichos sistemas, se han usado antígenos con adyuvantes. Además se ha observado que la entrega de antígenos mediante nano o micropartículas promueve la presentación cruzada *i. e.* la presentación del antígeno en el MHC I de las células presentadoras de antígenos (APCs) (Shen et al. 2006). Esto es de gran importancia en la terapia antitumoral ya que esta estrategia induce la activación y subsecuente proliferación de células T CD8 (citotóxicas), las cuales pueden atacar directamente a las células tumorales (Fontana et al. 2017). De este modo, partículas de escala nano y micrométrica son dirigidas contra células del sistema inmune en los nódulos linfáticos (LNs), tejidos mucosos y el microambiente de tumores. Generalmente, partículas de 0.5 a 2 μ m son procesadas en el sitio de inyección por APCs, mientras que partículas más pequeñas (20 – 200 nm) pueden circular por sí solas a los LNs, donde son procesadas por DCs residentes. En otros casos, algunas nanopartículas se han diseñado para

ser administradas en los pulmones, donde son activamente procesadas por DCs, las cuales circulan a los NLs, donde generan altas cantidades de células T citotóxicas (CTLs) capaces de proteger al organismo de futuras infecciones (Li et al. 2013).

Las microesferas son vehículos de entrega de moléculas bioactivas, son de gran utilidad en el campo de la inmunoterapia debido a su capacidad de prolongar la activación de las DCs y potenciar el procesamiento de los antígenos, además de otras funciones. Su interacción con el sistema inmune depende de sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño, superficie, carga y forma. Estas características físicas también afectan el proceso de degradación y, por lo tanto, el tiempo de liberación de las moléculas activas. En los sistemas de entrega formados por polímeros, la degradación puede llevarse a cabo por dos mecanismos denominados “bulk degradation” o degradación a granel y “surface degradation” o degradación superficial. En los sistemas de entrega cargados con proteínas se prefiere el uso de polímeros con degradación superficial ya que mediante este mecanismo no hay desnaturalización de la proteína, además los polímeros de degradación superficial tienen generalmente cinética de degradación de orden cero, en la cual el fármaco es liberado a una tasa constante, lo cual es de gran importancia en la elaboración de sistemas de entrega ya que mejora el control de la liberación del agente y reduce la frecuencia de administración del fármaco. Se ha observado que la degradación del quitosán es principalmente de tipo superficial y que la degradación a granel en este polímero inicia ya que se ha desintegrado la mayor parte del material (Jayarurita y Mauch, 2011; Nair y Laurencin, 2007).

También han sido empleadas las nanopartículas en la inmunoterapia. Los tratamientos con nanopartículas unidas a antígenos contra cáncer pulmonar han mostrado que estas partículas son asimiladas por DCs que más tarde activan a las células T. Del mismo modo se han unido antígenos a partículas liposomales en conjunto con adyuvantes para activar de forma efectiva a las APCs (Koshy et al. 2016; Li et al. 2013). Las partículas que son reconocidas por APCs son endocitadas en endosomas y fagosomas, lo cual puede dar como resultado la rápida degradación del biomaterial con la consecuente liberación de la carga (fármacos, citocinas, antígenos, etc.) debido al ambiente ácido de la vesícula. Esto incrementa la probabilidad de que antígenos intactos sean procesados y presentados por los MHC. Aunado a lo anterior, algunas microesferas pueden estar diseñadas para liberar su carga antigénica en presencia de un ambiente ácido similar al microambiente de los endosomas (Cheung y Mooney, 2015; Li et al. 2013).

2.2.3 Interacción de las microesferas con células dendríticas

Recientemente, la terapia contra el cáncer se ha enfocado en la activación y maduración de las células dendríticas para poder generar respuestas específicas contra las células del tumor. La inoculación de DCs autólogas activadas con antígenos *in vitro* se ha usado repetidamente en pruebas preclínicas, sin embargo, la tasa de respuesta ha sido generalmente lenta (Waeckerle-Men y Groettrup, 2005).

La activación de las DCs está asociada con la expresión de moléculas coestimuladoras de superficie y producción de citocinas. Este cambio fenotípico en las DCs facilita el procesamiento de los antígenos endocitados para su posterior unión a los MHC de la superficie celular y presentación a las células T. Para que las DCs sean activadas, primero deben reconocer a las partículas contra las que desencadenarán la respuesta inmune. Este reconocimiento genera cambios en la superficie de la membrana (como protrusión o invaginación) que permiten la endocitosis de la partícula (Hirota y Terada, 2012).

Existen diferentes mecanismos mediante los cuales las partículas son endocitadas. El mecanismo usado por la célula depende en gran medida del tamaño de la partícula. La fagocitosis es un mecanismo dependiente de energía y ocurre con partículas que miden de 0.5 a 10 μm . El otro mecanismo dependiente de energía es la pinocitosis y se puede dividir en cuatro tipos: macropinocitosis (100 nm a 5 μm), pinocitosis mediada por clatrina (~ 120 nm), pinocitosis mediada por caveolina (~ 80 nm) y pinocitosis independiente de caveolina y clatrina (~ 50 nm) (Hirota y Terada, 2012).

Andorko y Jewell, (2017) mencionan diferentes estudios en los que se muestra que el tamaño de la partícula tiene efectos diferentes en la célula con la cual entra en contacto *e. g.* se ha analizado el comportamiento de DCs al ser incubadas con partículas de oro de 3 y 12 nm, lo cual resultó en diferentes niveles de activación de estas células. Las partículas de 3 nm causaron niveles más altos de activación y secreción de IL-12 α interferón- γ , mientras que las partículas de 12 nm indujeron la producción de IL-4. Además también se ha observado que partículas de diámetros de 20 a 50 nm pueden pasar pasivamente a través de órganos linfáticos, mientras que partículas más grandes son dependientes de fagocitosis por parte de APCs que llevan la carga fagocitada a los NLs. Esto ocurre en parte debido a que la circulación es provocada por el gradiente de presión que existe entre la sangre y los vasos linfáticos, lo cual causa que la fuerza impulse las pequeñas partículas dentro de los vasos. A su vez, Waeckerle-Men y Groettrup, (2005) ha observado en células dendríticas derivadas de monocitos la internalización de grandes cantidades de microesferas de PLGA sin observar consecuencias negativas. Este hecho da indicios de la capacidad que tienen las DCs para endocitar partículas de escala micrométrica. Del mismo modo, se ha observado que los antígenos transportados por las microesferas de PLGA eran presentados por los MHC I y II, lo cual indujo respuesta específica antitumoral mediante CTLs.

2.3 Microesferas de quitosán

2.3.1 Quitosán

La quitina es el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza, después de la celulosa. Está presente en exoesqueletos de crustáceos y artrópodos, además de la pared celular de algunos hongos (Tharanathan y Kittur, 2003). No es tóxico, es biodegradable y biocompatible. Se ha

observado que la forma más desacetilada presenta la tasa más baja de degradación (Nair y Laurencin, 2007). De ésta se obtiene el quitosán, el cual “es un polisacárido con una estructura similar a la celulosa formado por cadenas de monosacáridos D-glucosamina B(1→4) con una cantidad de grupos n acetilglucosamina determinada por su grado de desacetilación” (Nair y Laurencin, 2007). El grado de desacetilación indica el porcentaje molar de unidades monoméricas que tienen grupos amino. Los grupos amino que contiene en su estructura le confieren carga positiva y le otorgan muchas de sus cualidades que son de gran utilidad en inmunoterapia, la mucoadhesión es una de estas cualidades. El quitosán, en soluciones ácidas diluidas se comporta como polielectrolito catiónico (Dos Santos et al. 2009; Hirano 1988).

El procesamiento del exoesqueleto de crustáceos para aislar quitina comienza con la desproteínización, a continuación debe ser desmineralizado, decolorado y, por último, es desacetilado hasta obtener el grado deseado de desacetilación del quitosán. La desacetilación de la quitina se genera colocando el polímero en una base mientras se aumenta la temperatura. Dependiendo el grado de desacetilación, el quitosán puede contener de 5% a 8% de nitrógeno (Dutta et al. 2004; Yuan et al. 2011). La degradación de estos polímeros da origen a los oligómeros que activan a los macrófagos. *In vitro* se ha observado que el quitosán puede ser degradado por diferentes enzimas, tales como la quitinasa, lisozima y papaína, mientras que *in vivo* la degradación la produce principalmente la lisozima (Ren et al. 2005).

Gracias a sus propiedades, actualmente se estudia el quitosán para ser usado como material de soporte en andamios para piel, hueso y cartílago (Nair y Laurencin 2007). Huang et al. (2004) sin embargo mencionan que el quitosán también puede ser degradado *in vivo* por enzimas como la lisozima y la quitinasa y ser transformado en oligómeros y, después en N-glucosamina.

Las propiedades que el quitosán presenta (Tabla 2), se deben a su carga positiva derivada de los grupos amino que lo componen. En condiciones ácidas, la protonación de los grupos amino causa la repulsión electrostática entre las moléculas de quitosán. Se ha observado que el uso de iones de TPP neutraliza los grupos amino protonados, lo que disminuye el valor del potencial z. Mediante la manipulación de la cantidad de TPP se puede modificar el tamaño de las partículas de quitosán (Fan et al. 2012).

De todos los polímeros biodegradables hasta ahora utilizados, el quitosán es el único en presentar carácter catiónico, lo cual le otorga cualidades de gran utilidad en la biomedicina y, particularmente, en la producción de sistemas de entrega de fármacos y otras moléculas. Debido a estas cualidades, este polímero es la mejor opción cuando se trata de liberar de manera controlada fármacos aniónicos (*e. g.* naproxeno), sin embargo, también puede usarse para atrapar fármacos catiónicos mediante el uso de excipientes aniónicos poliméricos. Además, su carga altamente positiva, le permite interactuar con la carga negativa de la membrana mucosa, por lo cual actúa como mucoadhesivo (Nair y Laurencin 2007).

Debido a su biocompatibilidad, el quitosán es un material útil para la preparación de micropartículas de uso terapéutico, como lo demuestra su uso en diferentes modelos para tratamientos médicos (Rodrigues et al. 2012).

Tabla 2. Características del quitosán

Característica	Ejemplos	Resultado	Referencia
Liberación controlada de fármacos	Complejo de Enoxaparina/quitosán	Formación de complejos estables y mejora en la administración del fármaco	Sun et al. (2010).
Propiedades mucoadhesivas	Administración de Buserelina con quitosán y otros polímeros mucoadhesivos	Mejora de la biodisponibilidad oral	Lueßen et al. (1996).
Gelificación	Gelificación <i>in situ</i> de un sistema de entrega formado con quitosán y ácido poliacrílico	Obtención de un sistema de entrega que gelificaba al pasar de un pH de 6.0 (estado líquido) a 7.4 (gel)	Gupta et al. (2010).
Mejoramiento de transfección	Formación de complejos de quitosán con DNA	Protege al DNA de la degradación con DNAsas, mejorando su biodisponibilidad	Malmo et al. (2011).
Aumento de permeabilidad celular	Pruebas con diferentes grados de desacetilación del quitosán en células epiteliales	Se mostró que a mayor grado de desacetilación con quitosán de alto peso molecular incrementa la permeabilidad epitelial	Schipper et al. (1996).

Tabla elaborada a partir de la información obtenida de *Bernkop-Schnürch y Dünnhaupt (2012)*.

El quitosán es poco soluble en agua y en disolventes orgánicos pero es soluble en soluciones ácidas, las cuales pueden transformar las unidades de n-glucosamina del quitosán en formas solubles de $R-NH_3^+$, sin embargo puede formar geles en soluciones alcalinas o polianiónicas. Comercialmente, el quitosán es presentado en forma de polvo, su peso molecular varía de 3800 a 2, 000, 000 y se encuentra en grados de desacetilación que van del 66% al 99% (Sinha et al. 2004).

Algunos estudios muestran que el tamaño de las microesferas de quitosán obtenidas mediante el uso de alguna técnica de elaboración determinada depende del peso molecular (Mw) y del grado de desacetilación que tenga el polímero, por lo cual, deben tomarse en consideración dichos factores en la elaboración de nano o microesferas con este material (Taranejoo et al. 2009; Gupta y Jabrail, 2008). Huang et al. 2004, muestran que al cambiar el Mw de 213 a 17 kDa, el tamaño de las partículas disminuye de 188 a 122 nm, sin embargo, al usar quitosán de 10 kDa, ocurre el proceso contrario y la partícula aumenta a 265 nm. Sin embargo, algunos autores han obtenido resultados diferentes al acoplar quitosán con diferentes fármacos: Berthold et al. 1996 encontró que el Mw del quitosán afectaba la adsorción de algunos fármacos pero no influía en el tamaño de partícula, la apariencia o el potencial z. En la elaboración de sistemas de entrega, ya sea de fármacos, genes, agentes virales, etc., se han usado preferentemente nano y micropartículas de quitosán de bajo peso molecular (LMw), debido a que en comparación con las de alto peso molecular (HMw), muestran mejor solubilidad, biocompatibilidad, bioactividad, biodegradabilidad y menor toxicidad (Fan et al. 2012).

Por otro lado, se ha observado que concentraciones bajas de quitosán presentan poca eficiencia de encapsulación de fármacos, sin embargo, en grandes cantidades, se forman soluciones muy viscosas. Además, la superficie de las microesferas también puede verse afectada por diferentes factores, *e. g.* Miglani (2002) observó que al aumentar la carga con nifedipina, la superficie de las microesferas se observa menos lisa. Shiraishi et al. (1993) y Polk et al. (1994) han probado la liberación de fármacos con microesferas de quitosán con diferente peso molecular. Otros factores que afectan la degradación y liberación de moléculas activas en los sistemas de entrega son: la concentración del quitosán, la cantidad de fármaco y la cantidad de entrecruzante. Uno de los entrecruzantes más usados en las microesferas de este polímero es el glutaraldehído (Berthold et al. 1996; Sinha et al. 2003).

Berthold et al. (1996b) elaboraron microesferas de quitosán con fármacos dirigidos al tratamiento de colitis ulcerosa. He et al. (2016) estudió el uso de microesferas de quitosán para encapsular norisoboldina (NOR), fármaco usado en el tratamiento contra la artritis reumatoide, ya que en modelos de ratones se observó previamente que al administrar NOR vía intravenosa, las concentraciones en plasma declinaban vertiginosamente

2.3.2 Estructura química del quitosán

El quitosán es un polímero lineal de $\alpha(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deoxy- β -D-glucopiranososa. Este polímero presenta solubilidad limitada en pH neutro, lo cual permite formar sistemas de entrega de moléculas, sin embargo, esto también obstaculiza su aplicación en condiciones fisiológicas. El quitosán puede ser conjugado fácilmente con materiales orgánicos como DNA, proteínas, etc. (Koev et al. 2006). Este polímero mejora la disolución de fármacos poco solubles y tiene la capacidad de formar geles al entrar en contacto con contraiones de bajo peso molecular como polifosfatos y sulfatos. El quitosán se comporta como base débil en agua y solventes orgánicos, mientras que en soluciones ácidas tiende a diluirse en unidades de glucosamina de forma $R-NH_3^+$. Gracias a sus cualidades se han formado sistemas de entrega con quitosán de administración oral, ocular, nasal, parenteral, bucal, etc. (Bernkop-Schnürch y Dünnhaupt, 2012; Dutta et al. 2004; Sinha et al. 2004; Tamariz et al. 2013).

El quitosán es un polímero lineal, con grupos amino e hidroxilo reactivos que le dan la capacidad de actuar como quelante de iones metálicos de transición, además es un polielectrolito débil con pK de alrededor de 6.5. El grado de protonación del quitosán depende principalmente del pH de la solución (Fan et al. 2012). Shu y Zhu (2002) observaron que al disminuir la acidez de la solución del quitosán de 4.7 a 8, disminuye drásticamente el grado de protonación del quitosán de 100% a 0%.

El peso molecular del quitosán depende de la fuente de origen (hongos, cangrejos, camarones, etc.) y puede disminuir durante el proceso de desacetilación (Yuan et al. 2011). Muchas de sus propiedades, como se ha mencionado, proceden de los grupos amino de su estructura. Gracias a la carga positiva que le confieren puede reaccionar con polímeros de carga negativa y también actuar como quelante de iones metálicos. Además, posee propiedades mucoadhesivas gracias a la interacción electrostática de sus moléculas positivamente cargadas con el mucus y las moléculas negativamente cargadas de los residuos de ácido siálico presentes en superficies mucosas. Esta bioadhesión es ventajosa en la aplicación de diversas terapias *e. g.* se ha observado que disminuye la pérdida de fármacos administrados por vía nasal (Berthold et al. 1996; Sinha et al. 2003). Además, el quitosán, gracias a su cualidad policationica, es mucoadhesivo y puede interactuar con un gran número de biomoléculas (Berthold et al. 1996).

2.3.5 Aplicación en inmunoterapia

Se ha estudiado el efecto tanto del quitosán como de la quitina en el sistema inmune (Komi et al. 2018; Jan et al. 2012; Zaharoff et al. 2007). Se ha constatado que ambos estimulan macrófagos, además de tener propiedades quimioatrayentes en neutrófilos. Por otro lado, dada su biocompatibilidad, mucoadhesión y a su capacidad de promover respuestas Th1 dependientes de linfocitos T citotóxicos, además que permite prolongar el tiempo de retención de antígenos en sitios mucosos (Li et al. 2013). Gracias a lo anterior se ha usado mediante administración nasal

contra *Bordetella pertussis* en ratones. en combinación con diferentes antígenos (Illum et al. 2001). También tiene la habilidad de inducir permeabilidad vascular, lo cual induce la migración de leucocitos al tejido conjuntivo circundante (Carroll et al. 2016; Xia et al.2015).

La capacidad de encapsulación del quitosán ha permitido su uso en diversos modelos de sistema de entrega de fármacos. Por ejemplo, se ha usado en conjunto con un mineral denominado paligorskita para preparar microesferas cargadas con diclofenaco sódico (Wu et al. 2014). En este composito la polaridad negativa del quitosán derivada de sus grupos amino, le permite reaccionar con las cargas negativas de las arcillas de paligorskita tratada con surfactantes. La capacidad de generar sistemas de entrega de este tipo de fármacos es una contribución que genera grandes expectativas para el tratamiento de enfermedades cancerosas (Babu y Ramesh, 2017).

2.4 Antígenos tumorales empleados en inmunoterapia

Las células tumorales poseen diversos antígenos con capacidad inmunogénica (Tabla 3), estas moléculas pueden ser utilizadas en inmunoterapia (Piñón 2015). Existen diferentes tipos de antígenos como se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Tipos de antígenos tumorales

Tipo de antígeno	Sitio de expresión/origen	Ejemplos
Antígenos de diferenciación	Células tumorales, melanocitos y células de melanoma.	Gp100, tirosinasa y melan-A/MART-1
Antígenos cáncer/testis	Células tumorales (melanoma, linfomas, etc.) y células del conducto seminífero.	MAGE, NY-ESO-1
Antígenos sobreexpresados	Células tumorales y células somáticas como melanocitos.	HER-2/neu, Melan A/MART 1
Antígenos originados por mutaciones	Originados por mutaciones en genes de supervivencia, proliferación y muerte celular	Genes de la vía p53 y RB
Antígenos virales	-----	Insertados por EPV y HPV

Información obtenida de la tesis de doctorado de Piñón 2015.

De forma general, los antígenos tumorales pueden categorizarse en dos grupos: antígenos definidos o neoantígenos, los cuales son proteínas específicas que pueden ser usadas para tratamiento contra antígenos tumorales específicos y antígenos no definidos, de los cuales no se conoce con exactitud cuales están presentes, por ejemplo los usados en lisados tumorales. Las vacunas basadas en antígenos no definidos se componen de lisados celulares, células intactas, RNA y proteínas de choque térmico. De este modo se obtiene mayor cantidad de posibles objetivos para generar una respuesta inmunogénica contra el tumor. Sin embargo, cuando se usan antígenos definidos se puede correlacionar la respuesta inmune con el antígeno usado, lo cual provee recursos para estudiar y mejorar la inmunogenicidad de la vacuna (Srinivasan y Wolchok, 2004).

El uso e identificación de antígenos tumorales ha sido de gran importancia en la inmunoterapia ya que permite evaluar respuestas específicas contra antígenos presentes en tumores malignos y generar un tratamiento. Debido a esto se han buscado antígenos asociados a tumores (TAA) universales *i. e.*, que puedan expresarse en casi todos los tumores y no se presenten en tejidos normales y cuya expresión continua es necesaria en el proceso oncogénico. Gordan y Vonderheide, (2002) mencionan cuatro ejemplos de candidatos a TAAs universales: la transcriptasa inversa de la telomerasa, (hTERT), la survivina inhibidora de apoptosis, la MDM2 (interactúa con p53) y la 1B1, isoforma del citocromo P450. Algunos péptidos derivados de estos antígenos se expresan en la superficie celular tumoral. La identificación de TAAs universales permite sortear el problema de generar una respuesta inmune contra antígenos que pueden expresarse tanto en tumores como en circunstancias normales, *e.g.* Melan-A/Mart-1 o MAGE-1, lo cual puede causar la evasión del tumor a la respuesta inmune (Gordan y Vonderheide, 2002).

Teóricamente los tumores extirpados contienen todos los tipos de antígenos, incluidos neoantígenos, resultado de mutaciones, por lo que pueden ser usado como fuente efectiva de antígenos, por ejemplo, en lisados tumorales, ofreciendo mayor posibilidad de combatir la inmunoselección tumoral. Esto representa una gran ventaja debido a que la mayoría de los neoantígenos generados *de novo* son paciente-específicos (Gammon et al. 2016).

Por otro lado, el uso de antígenos de diferenciación para tratamiento de inmunoterapia es prometedor para tumores de tipos celulares no vitales como melanocitos y epitelio prostático, pero menos ventajoso para otros tipos tumorales como cáncer de pulmón y renal. Para poder ser usados en inmunoterapia, los antígenos deben tener nula o casi nula expresión en tejidos normales, de modo que se prevenga una respuesta autoinmune. Recientemente han emergido nuevas categorías de moléculas que sirven como objetivo de terapias contra el cáncer basadas en vacunas. Éstas incluyen antígenos mutados (p53, k-Ras, CDK4), proteínas sobreexpresadas (HER2), antígenos virales (VPH) y antígenos de diferenciación (CD20 en linfoma de células B, gp100, MART-1, MELAN A) (Ferrucci et al. 2012).

Los antígenos tumorales se han usado para inducir una respuesta específica contra el tumor, así se han usado DCs programadas para iniciar una respuesta citotóxica capaz de generar una respuesta terapéutica contra el melanoma murino B16-F10, promoviendo la respuesta antitumoral. También se ha tratado de emplear estrategias comúnmente usadas en la ingeniería de tejidos para inducir distintas respuestas inmunológicas, En inmunoterapia se han usado diversos antígenos, sin embargo, la respuesta inmune generada por los péptidos y proteínas en su forma soluble es pobre, debido al limitado reconocimiento por parte de las APCs y a las condiciones fisiológicas adversas, como la presencia de enzimas de degradación, la interacción no específica con otras moléculas e interferencia en la matriz celular con el proceso de presentación antigénica. Sin embargo, el uso de vehículos nano y micrométricos basados en biomateriales permiten sortear estos inconvenientes. Esto protege a los antígenos de la degradación y potencia la presentación a las células T, además de controlar la velocidad y tiempo de liberación (Zhang et al. 2017). Estudios preclínicos han mostrado que complejos peptídicos de proteínas de choque térmico derivadas de tumores (HSPPC), son capaces de generar inmunidad, por lo cual también son sido utilizadas en vacunas (Ferrucci et al. 2012). Otra alternativa empleada fue el uso de criogeles inyectables con inmunoestimulantes como CpGs y GM-CSF, en conjunto con antígenos de melanoma (Bencherif et al. 2015; Koshy et al. 2016).

2.4.1 Antígenos tumorales de melanoma

Los lisados tumorales de melanoma se han empleado en inmunoterapia por sí solos o en sistemas de entrega de antígenos, sin embargo, los primeros han resultado inestables, con activación de macrófagos pobre y presentación cruzada ineficiente. La estrategia de administrarlos en sistemas de entrega ha brindado mejores resultados, por lo cual, la encapsulación de antígenos en biomateriales se ha propuesto como estrategia prometedora para promover la inmunogenicidad durante la vacuna (Reddy et al. 2006).

Son múltiples los antígenos encontrados en el melanoma, pero los que se han empleado más para generar inmunización específica han sido MAGE-3, MART-1, tirosinasa, gp100, NY-ESO-1 y MAGE-1. Éste último fue el primer producto génico de melanoma clonado reconocido como blanco de células T (Hodi, 2006). Todos ellos se han caracterizado por inducir respuestas inmunológicas dependientes de linfocitos T CD4+ y CD8+, e incluso se han observado reacciones de autoinmunidad *in vivo* (Ferrucci et al. 2012). Mientras que los lisados tumorales son usados para tratamientos más completos, en los que el espectro de antígenos presentados es muy amplio y el tratamiento es más efectivo, el empleo de antígenos solos permite analizar de manera específica las características individuales de sólo esa molécula y su comportamiento en sistemas biológicos.

Por otro lado, se han empleado estrategias usadas en Ingeniería de Tejidos para combatir al melanoma, por ejemplo, Shi et al. (2017) empleó nanopartículas de quitosán acopladas con

antígenos tumorales obtenidos del lisado de células de la línea B16 cultivadas. Las partículas (Man-CTS-TCL-NPs) además, estaban cubiertas con manosa para promover el reconocimiento de las DCs derivadas de médula ósea (BMDC). En este estudio se observó que las BMDCs maduraron al estar en contacto con las Man-CTS-TCL-NPs *in vitro*. También al ser inyectadas por vía subcutánea activaron DCs dentro de los nódulos linfáticos y promovieron la producción de IFN- γ e IL-4. Así, mostraron efectos terapéuticos en ratones con melanoma.

2.5 Células dendríticas

Las células dendríticas (DCs) son un tipo de células presentadoras de antígenos (APCs) *i. e.* son capaces de internalizar antígenos para presentar después péptidos derivados de estos a células T. Cumplen funciones tanto en el sistema inmune innato como en el adaptativo y presentan diversos receptores en su superficie para poder reconocer y endocitar microbios y productos microbianos. Los antígenos endocitados son procesados y expuestos en los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC I y II) para después ser presentados a las células T. Las dos principales subpoblaciones de células dendríticas son las mieloides (mDCs) y las plasmacitoides (pDCs) (Andersson et al. 2008).

Las DCs inmaduras pueden encontrarse en cualquier lugar del organismo y poseen gran capacidad endocítica, pero son poco efectivos al activar linfocitos T. Si el estímulo antigénico está acompañado de moléculas proinflamatorias, las DCs expresará su fenotipo de maduración y después migrará a los nódulos linfáticos, donde activará a las células T para proliferar y desarrollar una respuesta antitumoral (Koshy et al. 2016). Para el reconocimiento de patógenos, estas células, así como los macrófagos, tienen receptores de membrana llamados Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRRs), los cuales les permiten reconocer patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Las DCs inmaduras tienen diferentes mecanismos por los cuales internalizan agentes externos. Los antígenos solubles y partículas pequeñas son capturados por macropinocitosis, endocitosis mediada por receptores y pinocitosis (Andersson et al. 2008). La familia de receptores denominada “Toll like receptors” o TLRs, es el grupo de receptores de reconocimiento de patrones mejor estudiado en mamíferos, estos aumentan la eficiencia de la endocitosis. Los receptores adicionales expresados por DCs incluyen a Fc γ RII (CD32), Fc γ RI (CD64), Fc ϵ RI y los receptores complementarios tipo 3 (CD11b). El reconocimiento de moléculas mediante estos receptores inicia diferentes vías de señalización que inducen que las DCs maduren y comiencen la síntesis de citocinas, moléculas esenciales para que se lleve a cabo una respuesta inmunológica (Andorko et al. 2017). Ya en los órganos linfoides secundarios, las DCs maduras poseen poca capacidad endocítica, pero expresan en su superficie moléculas de MHC II y moléculas accesorias/coestimuladoras de superficie incluyendo (ICAM)-1/CD54, ICAM-3/CD50, antígenos funcionales de leucocitos (LFA)-3/CD58, B7-1/CD80 y B7-2/CD86 lo cual estimula la interacción y

estimulación con linfocitos (Stockwin et al. 2000), que les permiten madurar y activar a los linfocitos T. Las DCs pueden realizar presentación cruzada (“cross priming”) de antígenos en la MHC I. En esencia, esto permite a la DC presentar nuevos péptidos a los linfocitos T CD8+ (Andersson et al. 2008). Las DCs activan a los linfocitos T mediante tres señales que actúan en conjunto: 1) A partir de la unión del complejo MHC de la APC con el receptor de células T (TCR); 2) Mediante la unión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, etc.) a receptores (e.g. CD28) de las células T y 3) A partir de citocinas (Fontana et al. 2017).

Debido a su morfología, las DCs tienen una gran área de superficie, lo que les permite estar en contacto con un gran número de elementos y células circundantes. Se ha observado que una sola DC madura es suficiente para estimular de 100 a 3000 células T.

En relación con el efecto de diversos biomateriales en las DCs, se ha observado que DCs incubadas en capas delgadas de biomateriales basados en polímeros naturales (alginato, agarosa, quitosán y ácido hialurónico) o en polímeros sintéticos (ácido poliláctico co-glicólico o PLGA, etc.) expresan de manera diferencial distintos marcadores de activación (CD40, MHC II, CD80, CD86, etc.), los cuales son necesarios para la activación de células T y B. Además, el uso de andamios de PLGA en ratones para liberar factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), ha mostrado ser útil en la estimulación de DCs (Koshy et al. 2016).

2.5.1 Efecto en células dendríticas

Saleh y Shojaosadati (2016) menciona tres categorías de vacunas contra el cáncer dirigidas a DCs: 1) Extracción de DCs del paciente y posterior modificación *ex vivo* de las mismas (ya sea mediante la activación con antígenos tumorales y estímulos de maduración o por modificación genética, con la finalidad de que expresen el fenotipo inductor de la respuesta antitumoral), para ser de nuevo reinyectadas al paciente. 2) Uso de vectores virales portadores de los antígenos de interés. 3) Entrega de antígenos para la activación de DCs mediante el uso de sistemas de entrega basados en nano o micropartículas. Algunos biomateriales tienen propiedades intrínsecas que inducen la maduración de DCs (Babensee et al. 2005).

Gracias a su función y a su rol clave en la regulación de la tolerancia y la inmunidad, las DCs son blanco frecuente de estudios en inmunoterapia. En el cuerpo humano pueden encontrarse diferentes subpoblaciones de DCs. Se ha observado que partículas de 20 nm de poliestireno eran capturadas con mayor frecuencia por DCs intra nasales y sólo las partículas más pequeñas causaban proliferación de células T inducida por la presentación de antígenos. En el mismo estudio se sugiere que el tamaño de partícula es fundamental en la captura de éstas por parte de las DCs (Seydoux et al. 2014). Además, en algunos estudios se ha observado que la endocitosis celular de nanopartículas de quitosán disminuye al mismo tiempo que decrece el peso molecular y el grado de desacetilación (Salatin et al. 2017). Huang et al. (2004) muestran que la endocitosis disminuye 26% al cambiar el Mw de 213, 000 a 10, 000, así mismo, disminuye 41% cuando el grado de

desacetilación cae de 88% a 46%. Además, se observó que la presentación del quitosán en nanopartículas facilita su endocitosis, a diferencia de las moléculas solubles. En el mismo estudio se probó la citotoxicidad tanto de moléculas de quitosán como de nanopartículas del mismo polímero en una línea celular de carcinoma pulmonar (A549) y se observó que la citotoxicidad se atenúa al disminuir el grado de desacetilación y el Mw del quitosán.

También se ha estudiado el mecanismo de reconocimiento de quitosán en DCs. Para que se lleve a cabo la endocitosis, primero debe ser reconocida la molécula de quitosán por receptores de las DCs. A partir del reconocimiento de la moléculas del quitosán se desencadenan reacciones intracelulares en las DCs que provocan su activación y maduración, con la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86. Esta activación también induce la producción de interferones tipo I y promueve la respuesta Th1 a partir de la vía cGAS-STING. Esta vía es dependiente de especies reactivas de oxígeno mitocondriales y de la presencia de DNA en citoplasma. Al estudiar esta vía se advirtió que el quitosán estimula la liberación intracelular de DNA. El estimulador de genes de interferón (STING) actúa en respuesta al DNA citosólico y activa factores de transcripción como el factor nuclear Kappa B (NF- κ B) y el factor regulador de interferón 3 (IRF-3) a través de la quinasa I κ B y la quinasa TBK1. La enzima c-di-GMP-AMP sintasa (cGAS) se une al DNA para catalizar la síntesis de c-di-GMP-AMP (cGAMP), la cual después se une a STING para activarlo. Los interferones de tipo I promueven la activación y maduración de DCs, promoviendo su migración y presentación antigénica a CD4⁺, así como presentación cruzada (Carroll et al. 2016).

Aunado a lo anterior, el quitosán en combinación con antígenos, estimula la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I) además de estimular la producción de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40), así como la secreción de IL-6, IL-12, MIP-1 y TNF- α . Esta combinación de moléculas desencadena la respuesta de células CD8⁺ con su subsecuente proliferación (Xia et al. 2015). Además, el quitosán usado en conjunto con IL-12 generó la respuesta antígeno-específica de células T CD8⁺, caracterizada por la producción de INF- γ , lo cual puede causar respuestas Th1. Esto indica que el quitosán puede actuar como adyuvante, lo cual es de gran utilidad en la generación de vacunas antitumorales (Lin et al. 2014).

3. Planteamiento del problema

El uso de biomateriales en la inmunoterapia ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas que permiten mejorar el tratamiento contra el cáncer. Entre ellas se encuentra la elaboración de sistemas de entrega de antígenos, lo cual incluye la fabricación de microesferas. Debido a que la generación de resistencia mediante el proceso de inmunoedición es un problema latente en la activación de APCs hacia un solo antígeno, en este trabajo se ha usado un coctel de antígenos de melanoma, para así producir una respuesta inmune más amplia. De este modo, la pregunta

fundamental de este estudio es: ¿la elaboración de microesferas de quitosán acopladas con antígenos tumorales mediante la técnica combinada de emulsión simple con reticulación será capaz de formar un complejo y liberar antígenos de manera paulatina y prolongada *in vitro* idóneo en la activación de DCs para su uso en terapia antitumoral?

4. Justificación

Los tratamientos usados contra el cáncer hasta el momento presentan diversas deficiencias y en algunos casos resultan en daños colaterales al organismo debido a su mecanismo de acción. En el caso de la inmunoterapia se han usado diversas estrategias que no han dado resultados del todo eficaces para ser admitidas como tratamiento viable contra el cáncer en humanos.

La elaboración de un vehículo micrométrico de antígenos permite que estos puedan estar protegidos durante su administración en el organismo y por lo tanto evita que sean degradados en poco tiempo.

Las propiedades físicas y químicas del quitosán permiten la correcta adhesión de los antígenos a las microesferas, además es biodegradable, lo que permite que las moléculas transportadas sean liberadas paulatinamente. La ventaja de usar quitosán estriba en su capacidad de actuar como coadyuvante. Se ha observado que el quitosán induce la activación de APCs y en conjunto con los antígenos tumorales es probable que induzca el desarrollo de una respuesta antitumoral específica.

5. Objetivo general

Elaborar microesferas de quitosán acopladas con antígenos tumorales.

6. Objetivos particulares

Analizar mediante microscopía electrónica de barrido la morfología y el tamaño de las microesferas de quitosán acopladas a antígenos tumorales.

Evaluar la citotoxicidad de las microesferas de quitosán acopladas con antígenos naturales.

Identificar la presencia de antígenos tumorales en la microesfera mediante geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE).

7. Hipótesis

Si es posible elaborar un protocolo para la fabricación de microesferas de quitosán acopladas a antígenos tumorales, estas microesferas podrán ser utilizadas en inmunoterapia.

8. Materiales y métodos

8.1 Elaboración de microesferas

8.1.1 Materiales

Quitosán de cangrejo desacetilado $\geq 75\%$ (quitina desacetilada poly(D-glucosamina)) de alta viscosidad se adquirió en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Glutaraldehído 25.19% w/w se obtuvo de Electron Microscopy Sciences, Philadelphia, USA. Aceite mineral de Mw variable (205 y 500 g/mol), punto de ebullición de 260°C a 360°C, el cual se obtuvo en Farmacia París, México. Albúmina fracción V, se obtuvo en Electron Microscopy Sciences. SPAN 80 se obtuvo en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Ácido acético glacial 17.48 M suministrado por Merck, Hexano 86.18 g/mol.

Linea celular: El lisado tumoral se obtuvo del cultivo de células tumorales de melanoma murino de la línea B16-F10 con haplotipo H-2Kb fue adquirida en The American Type Culture Collection, USA. Las células se cultivaron con RPMI suplementado con estreptomicina (100mg/ml, Sigma), L-glutamina (2mM Sigma), mercaptoetanol (50mM) y 10% de suero bovino fetal (Biowest, USA).

8.1.2 Método

La elaboración de las microesferas de quitosán se realizó mediante el método combinado de emulsión simple (w/o) y reticulación. Durante el proceso de preparación de microesferas se añadió un lisado tumoral obtenido de la línea celular B16-F10.

8.1.2.1 Obtención de lisado tumoral

Cultivo celular

Se cultivaron células de la línea B16-F10 con haplotipo H-2kb en cajas de Petri de 100 mm hasta alcanzar la confluencia, es decir, las células cubrían casi toda la superficie de la base de la caja, (aproximadamente 2 semanas para cada caja); posteriormente se añadió solución de tripsina (0.05%) y EDTA (0.02%) a cada caja para despegar las células y se centrifugaron a 1700 rpm por 3 minutos. A partir del botón obtenido realizar el conteo celular por cámara de Neubauer.

De las células obtenidas, se resuspendieron aproximadamente 5×10^7 millones de células en 2.5 ml de solución salina (NaCl a 0.9%, pH de 7.4)

Lisado y cuantificación de proteínas

El lisado celular se realizó mediante ciclos de congelación-descongelación similar al procedimiento realizado por Alaniz et al. (2014). Para esto, las células se colocaron en un tubo Falcon y posteriormente se congelaron a -70°C por cinco minutos, enseguida se colocaron por cinco minutos en incubadora a 37°C . El ciclo se repitió cinco veces. Por último, antes de realizar el conteo de proteínas, se centrifugó la muestra a 15,000 rpm. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Lowry.

8.1.2.2 Preparación de la solución acuosa

En primer lugar, se elaboraron microesferas con 0.01 g de albúmina fracción V diluida en 10 ml de agua destilada por 15 minutos. Posteriormente se añadieron 0.2 g de quitosán en polvo a la solución y se dejó reposar por aproximadamente una hora para permitir la hidratación del polímero. Después de la hidratación, la mezcla se puso en agitación en agitadora magnética por una hora y después se añadieron 200 μl de ácido acético glacial sin detener la agitación por aproximadamente 24 horas.

En el caso de la preparación de las microesferas con antígenos tumorales (sin albúmina) se añadieron 0.01 g de antígenos tumorales de melanoma B16-F10 a la solución acuosa en agitación (después de las 24 horas de agitación), y se completó otro ciclo de agitación de 30 minutos. Se obtuvieron 10 ml de solución acuosa (quitosán + albúmina) ó (quitosán + antígenos).

8.1.2.3 Emulsión w/o

Se mezclaron 100 ml de aceite mineral con 1 ml de SPAN 80. Posteriormente, la solución se agitó por 10 minutos, a continuación, se añadió por goteo 3.3 ml de la solución acuosa para formar la emulsión. Durante la incorporación de la solución acuosa al aceite mineral con SPAN 80, la mezcla continuó en agitación a 10200 rpm en un ultraturrax. Después de haberse añadido los 3.3 ml de sol. acuosa, la mezcla se mantuvo en agitación a 12, 200 rpm durante 1 minuto y luego en agitadora magnética durante 30 minutos.

8.1.2.4 Reticulación

La técnica de reticulación consiste en añadir un entrecruzante capaz de formar redes tridimensionales entre las moléculas del polímero y la molécula bioactiva que va a transportar. Para esto, se añadieron 10 ml de glutaraldehído por técnica de goteo a la solución de quitosán durante aproximadamente 5 minutos al mismo tiempo que se encontraba en agitación constante. Después se agitó la mezcla por 3 horas en agitadora magnética.

8.1.2.5 Lavados y extracción del solvente

Después de realizar la reticulación, se llevaron a cabo lavados consecutivos con hexano y agua destilada para eliminar los residuos de glutaraldehído, aceite y el solvente de la solución acuosa y poder separar la mayor cantidad de microesferas. Los lavados se realizaron de la siguiente manera:

Después de que se terminó de agitar la emulsión, ésta se distribuyó en tubos falcon de 50 ml y se centrifugó a 4000 rpm y -4°C durante 10 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante y las microesferas se lavaron con hexano y agua destilada, la solución se centrifugó nuevamente a 4000 rpm, -4°C por 10 minutos. Se siguieron realizando lavados consecutivos de hexano y agua (se realizaron dos lavados de agua destilada por cada lavado de hexano) hasta eliminar todo el aceite. A continuación, se resuspendió la muestra en agua destilada y se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml. Se realizaron 3 lavados más de 30 minutos con agua destilada, cada uno en microcentrífuga y por último, se almacenó la muestra a 4°C.

8.1.2.6 Observación de microesferas en microscopio fotónico

Ya que se prepararon las microesferas y se resuspendieron en agua destilada, se tomó con micropipeta de 20 µl una muestra de agua con microesferas y se observó en microscopio fotónico para corroborar su presencia.

8.2 Prueba de vida y muerte con esplenocitos

8.2.1 Materiales

Ratones: Para realizar las pruebas de citotoxicidad se obtuvieron esplenocitos de bazo de ratones adultos macho derivados de la cepa C57BL/6, los cuales se mantuvieron en condiciones de temperatura controladas, con disponibilidad de agua y alimento *ad libitum* y ciclos de luz y oscuridad controlados en el bioterio del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Microesferas: Microesferas de quitosán elaboradas con el método combinado de emulsión simple y reticulación.

Calceína y homodímero de etidio para tinción.

8.2.2 Método

Para probar el posible efecto citotóxico de las microesferas, se colocaron en incubación con células de bazo (Tabla 4). El bazo fue extraído de ratones C57BL/6 y se colocó enseguida en un tubo falcon con PBS. Después se lavó con PBS en tres ocasiones. Ya lavado, se colocó en una caja Petri con RPMI y se perfundió usando una jeringa. Se retiró el medio resultante y se contó la cantidad de células obtenidas. Se colocaron 250,000 células/ml de bazo en 7 pozos de una placa de 24 pozos. A cada pozo se añadieron diferentes concentraciones de microesferas como se muestra en la tabla

4. Las microesferas fueron previamente esterilizadas colocándolas por 25 minutos en luz UV. Posteriormente se tomaron 500 μ l de medio con células de cada pozo a las 24 horas y a las 48 horas después del tratamiento y se realizó la tinción con una solución de calceína y homodímero de etidio que contenía 0.5 μ l de calceína y 2 μ l de homodímero de etidio por ml. A los controles positivos para muerte (pozos M) se les añadió 500 μ l de alcohol al 70% mientras que a los controles positivos sólo se les añadió solución balanceada de Hanks (HBSS). Después se analizaron las muestras con ayuda del un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i, se tomaron 132 fotos a 20x en diferentes campos de cada tratamiento y se realizó un conteo con el programa Image J. Por último se graficaron los datos obtenidos y se analizaron mediante una prueba de t de student.

M= Células muertas

V= Células vivas

N1= Células + 0.01236 g de microesferas

N2= Células + 0.00618 g de microesferas

N3= Células + 0.00206 g de microesferas

Tabla 4. Representación de los tratamientos con microesferas y grupos control. Se representa en los recuadros de la tabla 4 los pozos con los tratamientos (N1, N2 y N3) y los pozos control (M y V) de una placa de 24 pozos. De cada uno de los pozos se tomaron 500 μ l de medio a las de incubación para realizar la prueba de citotoxicidad.

8.3 Análisis morfológico de las microesferas

La morfología de las microesferas fue analizada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Para realizar la observación se colocó una gota de la solución de agua destilada con microesferas en una rejilla de cobre, en la cual se dejó evaporar a temperatura ambiente. Posteriormente la rejilla de cobre se colocó sobre un portamuestra de aluminio y se metalizó con oro en una ionizadora Denton Vacuum Desk II. Las observaciones y registro fotográfico se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5310-LV.

La gota de solución con microesferas se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente fue transportada la muestra al microscopio de barrido del Departamento de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

8.4 Citometría de flujo para conteo de microesferas

Con el propósito de calcular la cantidad obtenida de microesferas de un lote de 3.3 ml de solución de quitosán (ver método de preparación de microesferas), se midieron con ayuda de un citómetro de flujo FACScalibur del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo del Instituto de

Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Para llevar a cabo la medición y obtener el tamaño de las microesferas de quitosán, la muestra se comparó con un grupo modelo de microesferas BD Cytometer setup and Tracking Beads de vidrio de Beckton and Dickinson con número de catálogo 641319, amablemente proporcionadas por el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

8.5 Prueba de liberación de proteínas

Las microesferas acopladas a antígenos obtenidas mediante el método combinado de emulsión simple (w/o) y reticulación. Se colocaron 0.0206 g de microesferas en baño maría, en agitación constante, resuspendidas en 500 μ l de PBS durante cinco días. Posteriormente se tomaron muestras de 100 μ l primero a la hora después de haber colocado las microesferas en PBS y luego cada 24 horas durante los siguientes cuatro días y se almacenaron a -20°C para después ser caracterizadas mediante electroforesis con gel de poliacrilamida y cuantificar la cantidad de antígenos liberados. Las muestras se tomaron en el orden que se indica en la tabla 5.

No. De muestra	Intervalo de tiempo entre cada toma	Tiempo desde el inicio de la prueba hasta cada toma
1	1 hr.	1 hr.
2	24 hrs.	25 hrs
3	24 hrs.	49 hrs.
4	24 hrs.	73 hrs.
5	-----	97 hrs.

Tabla 5. Prueba de liberación de antígenos acoplados a microesferas de quitosán. De la muestra inicial de 500 μ l se tomaron 5 muestras durante 4 días (la primera toma fue después de 1 hora de haber colocado las microesferas en agitación). En la columna central se muestra el tiempo que debía pasar entre cada toma y en la columna de la derecha se muestra el tiempo total que habían permanecido las microesferas en agitación antes de ser almacenadas.

9. Resultados

9.1 Microesferas de quitosán observadas con microscopio fotónico.

Una vez que se terminaron de elaborar las microesferas con el método mencionado anteriormente, se observaron en microscopio óptico. Se observaron microesferas de diferente tamaño y forma redondeada (Figura 1).

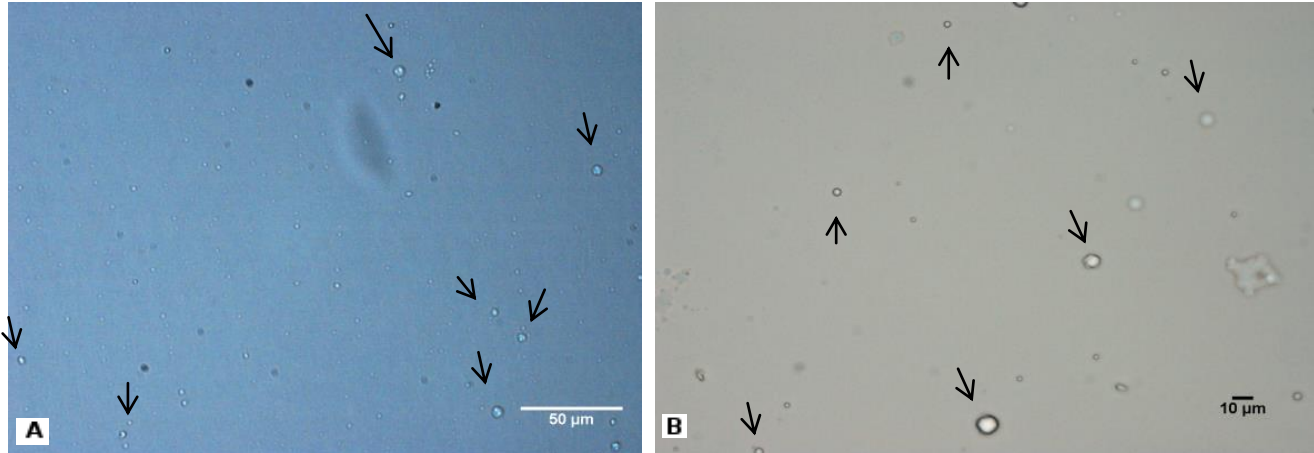
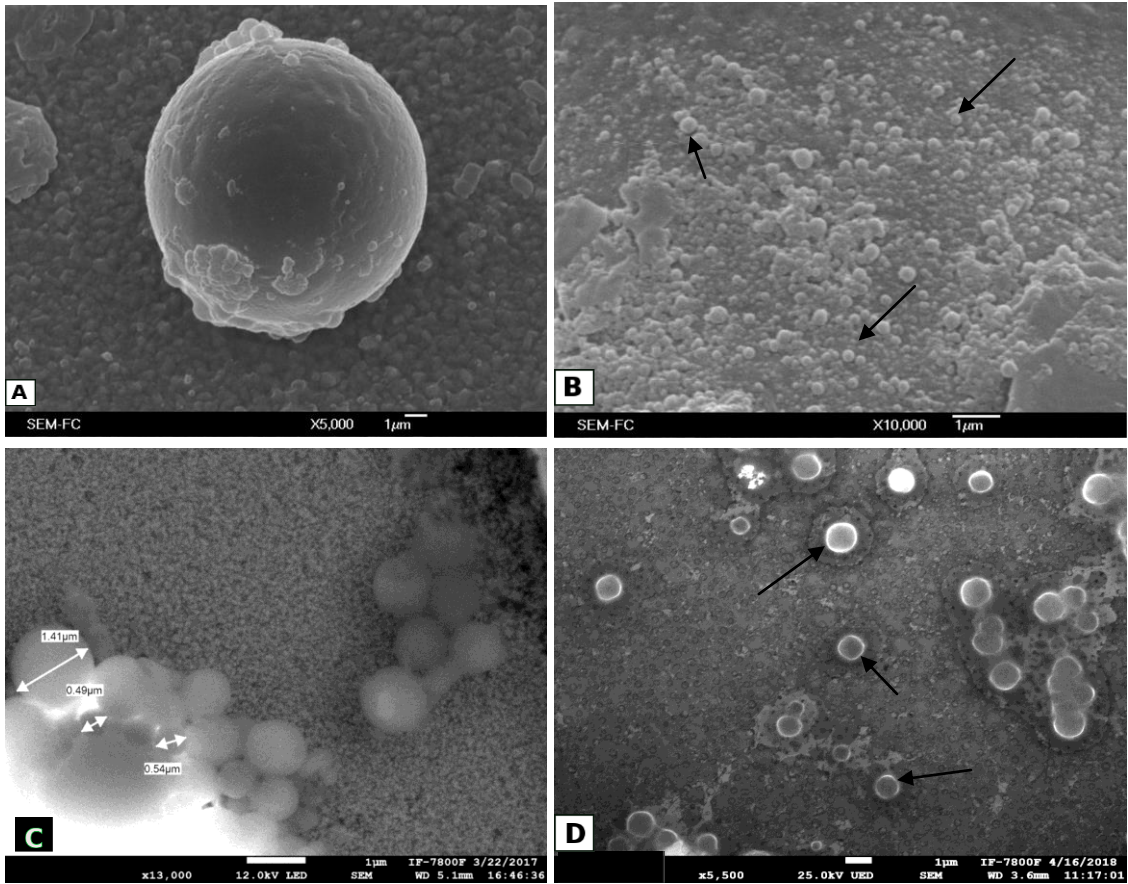


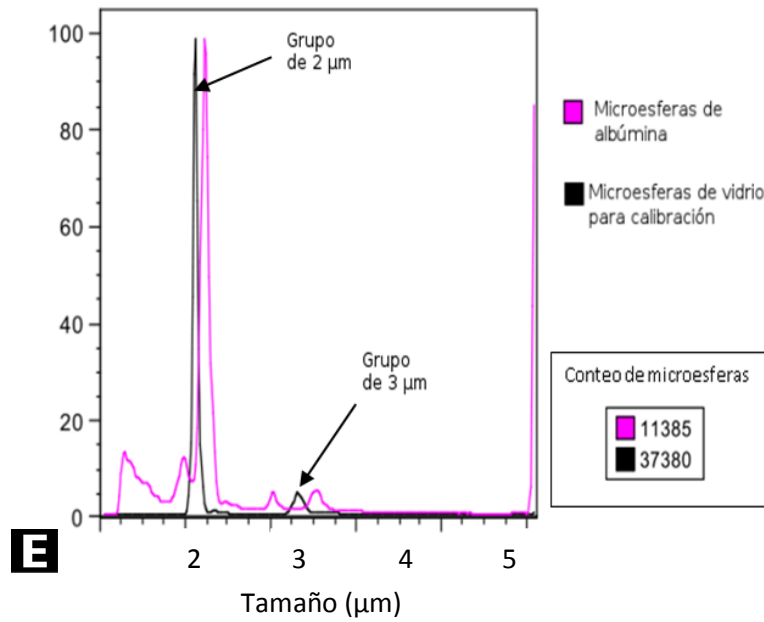
Figura 1. Microesferas de quitosán acopladas a antígenos observadas en microscopio óptico. En la imagen **A** se muestra las microesferas con aumento de 20x mientras que en la imagen **B** se muestran con aumento de 40x. Las fotos fueron tomadas justo después de su elaboración con el método de emulsión simple y reticulación. Las flechas señalan algunas de las microesferas visibles; las microesferas más grandes miden aproximadamente 10 µm de diámetro mientras que las más chicas que se alcanzan a apreciar tienen aproximadamente 1 µm.

9.2 Microesferas de quitosán observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y conteo por citometría de flujo.

Para determinar y analizar la morfología y la superficie de las microesferas, se observaron con microscopio electrónico de barrido. Se constató que las microesferas tienen una forma esférica y superficie lisa, además se observaron microesferas de diferentes tamaños, predominando microesferas de diámetros menores a 1 µm. Para determinar la cantidad de microesferas producidas en un lote con 3.3 ml de solución de quitosán (*i. e.* con ≈ 0.06 g de quitosán) y el tamaño promedio de éstas, se analizaron con un citómetro de flujo. Para comparar el tamaño de las microesferas se usaron como referencia dos muestras de microesferas de vidrio con un tamaño promedio de 2 µm (48% de la muestra), 2.5 µm (4.5%), 3 µm (3.07% de la muestra), mientras que el 2.78% de las microesferas tenía un tamaño de más de 3 µm (Figura 2-E y F).



Conteo de microesferas por citometría de flujo



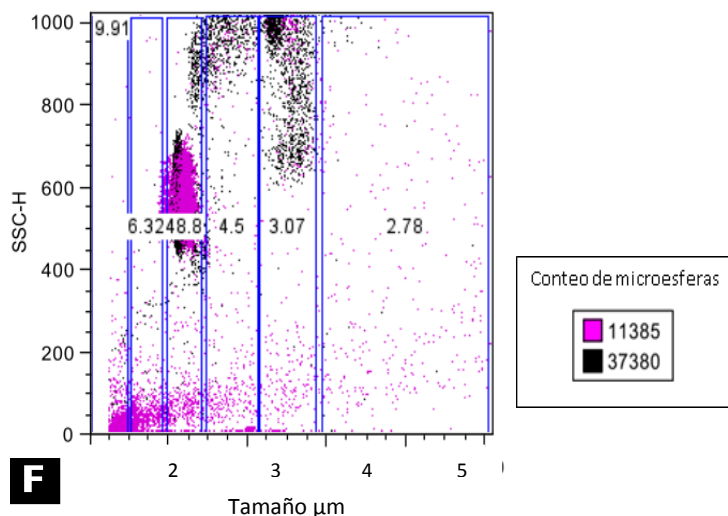


Figura 2. Microesferas de quitosán elaboradas con el método combinado de emulsión simple (w/o) y reticulación observadas con microscopio electrónico de barrido (SEM) y conteo de microesferas con citometría de flujo: (A) microesfera sola de aproximadamente 10 μm de diámetro. **(B)** se puede apreciar un gran número de microesferas menores a 1 μm de diámetro. Con flechas se señalan algunas de las microesferas. **(C)** microesferas de aproximadamente 1 μm de diámetro con mediciones de su tamaño indicadas por flechas. **(D)** microesferas de vidrio que son usadas como referencia para realizar el conteo de microesferas por citometría de flujo, se señalan algunos ejemplos con flechas. **(E)** gráfica obtenida por el conteo por citometría de flujo donde se indica con flechas los dos grupos de microesferas de vidrio usados como referencia de 2 y 3 μm . Con el color rosa se indican las microesferas de quitosán elaboradas por el método combinado de emulsión simple y reticulación. **(F)** gráfico de puntos que indica la distribución de los diferentes grupos de microesferas.

9.3 Esterilización de microesferas

Para poder emplear las microesferas en ensayos *in vitro*, fue necesario esterilizarlas para eliminar patógenos. Las microesferas se esterilizaron mediante exposición a rayos UV durante 25 minutos, posteriormente para asegurar su esterilidad, las microesferas se colocaron en medio completo DMEM a 38°C y 5% de CO₂ durante 24 y 48 horas. Se constató que las microesferas no contenían patógenos y que podían ser empleadas en ensayos *in vitro* al ser observadas después de 24 horas (Figura 3-A) y 48 horas (Figura 3-B) y no encontrar presencia de bacterias u hongos.

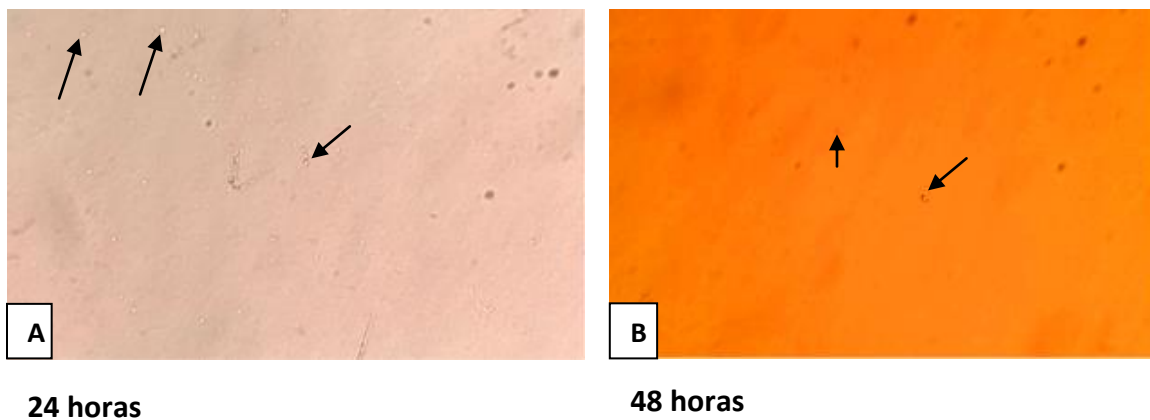


Figura 3. Microesferas de quitosán acopladas con antígenos tumorales esterilizadas en medio DMEM. **(A)** imagen tomada 24 horas después de haber sido esterilizadas con luz UV y **(B)** imagen tomada 48 horas después de haber sido esterilizadas con luz UV.

9.4 Prueba de citotoxicidad

Para comprobar que las microesferas no inducen muerte celular, se realizaron cocultivos con diferentes concentraciones de microesferas con esplenocitos murinos durante 48 horas. Se pudo observar que la mayoría de las células de bazo eran positivas a calceína en todos los cultivos, lo cual demostró que las células mostraron actividad metabólica y por lo tanto eran viables (Figura 4). También se muestra el control positivo de células muertas para corroborar la efectividad de la técnica (Figura 4-E).

Posteriormente se realizó el análisis de la citotoxicidad, los grupos se compararon entre sí, primero con una prueba ANOVA y luego con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se observó una diferencia significativa entre el grupo con la mayor cantidad de microesferas (0.01236 gramos) y los demás grupos (Figura 4-F). No obstante la viabilidad celular se mantuvo alta. No se observaron diferencias significativas en la comparación entre los otros tratamientos y el control de células vivas.

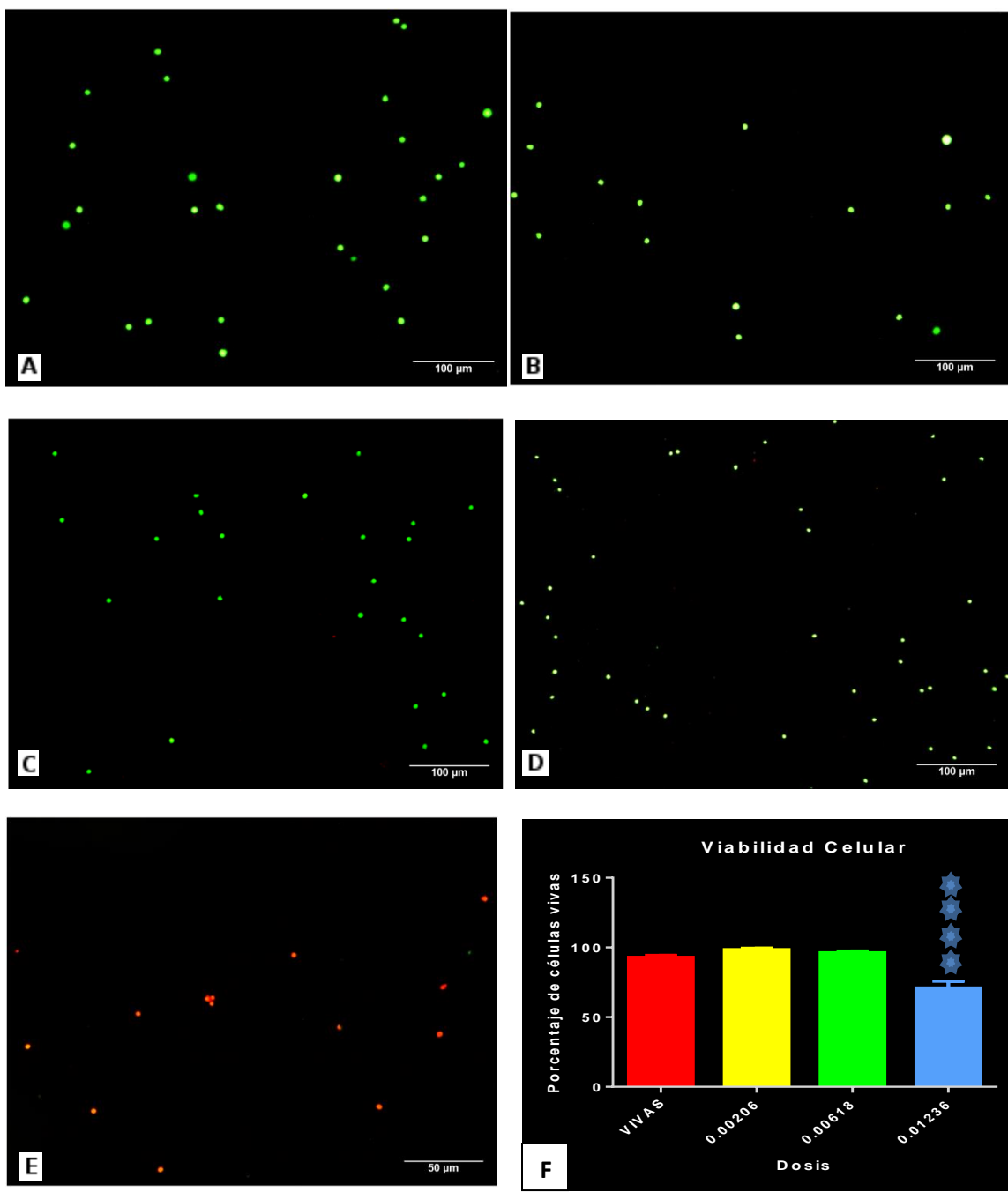


Figura 4. Esplenocitos murinos incubados con microesferas de quitosán y teñidos con calceína y homodímero de etidio. (A) Esplenocitos incubados con 0.01236 g de microesferas de quitosán, 20x. **(B)** Esplenocitos incubados con 0.00618 g de microesferas de quitosán. **(C)** Esplenocitos incubados con 0.00206 g de microesferas de quitosán. **(D)** Control negativo para muerte de esplenocitos. **(E)** Control positivo para muerte de esplenocitos incubados con alcohol al 70%. **(F)** Porcentaje de esplenocitos vivos incubados con 0.00206 g, 0.00618 g y 0.01236 g de microesferas de quitosán durante 48 horas. Los asteriscos señalan diferencia estadísticamente significativa con respecto a los otros tres grupos. **** $p < 0.0001$ ANOVA, Tukey.

9.5 Prueba de liberación de proteínas.

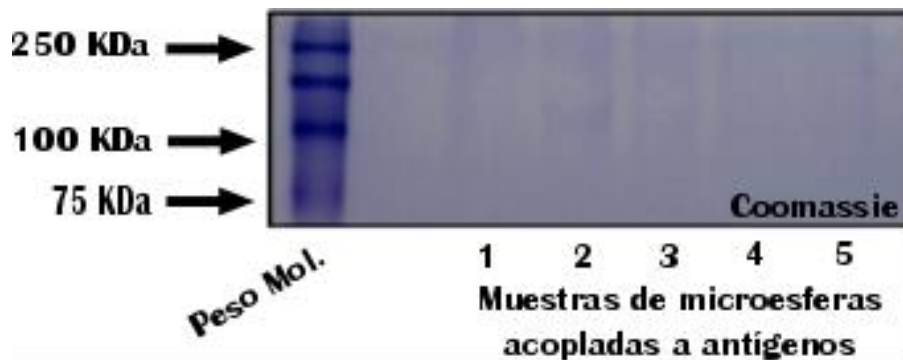


Figura 5. Gel de poliacrilamida con muestras de microesferas acopladas a antígenos. De izquierda a derecha se observan las columnas de las cinco muestras de 100 μ l de pbs con microesferas, las cuales se mantuvieron en agitación por 1 hora, 25 horas, 49 horas, 73 horas y 97 horas respectivamente.

10. Discusión

En la presente investigación se elaboraron microesferas de quitosán capaces de ser usadas en inmunoterapia. Éstas fueron acopladas con antígenos derivados de melanoma, con la finalidad de que, en trabajos posteriores, pueda ser usado este sistema de entrega para generar una respuesta antitumoral eficiente.

En un sistema de entrega es importante tomar en consideración diferentes características de la partícula que será usada como medio de transporte *e. g.* tamaño, la forma y el material del que se compone, así como el tipo de molécula que será transportada. También es relevante recalcar la forma esférica de las microesferas, así como el tamaño de la partícula, pues tienen importancia en el tipo de administración de la vacuna antitumoral *i. e.* el tamaño del diámetro de las partículas administradas en vasos sanguíneos también afecta su velocidad de transporte y la forma tiene influencia en su adhesión a las paredes de los vasos. Por ello la capacidad de la microesfera para circular a través de vasos y canales afectará en qué lugar será internalizada y procesada por las DCs (Champion et al. 2007). Para evaluar el tamaño y la morfología de la microesfera es

indispensable la observación mediante una técnica adecuada de microscopía; en el presente estudio se usó la microscopía electrónica de barrido (SEM) porque permite con gran precisión la evaluación del tamaño de partículas de escalas micro y nanométricas además de la observación de la morfología de su superficie. Ya se ha mencionado que el tamaño de la microesfera es relevante para el tipo de tratamiento que se quiere realizar. En este trabajo se obtuvieron diferentes tamaños de microesferas, pero principalmente se puede observar una población de 2 μm , la cual fue cuantificada mediante citometría de flujo y otra menor a 1 μm , la cual se observó mediante MEB. Ambas poblaciones pueden ser de gran utilidad en distintos tratamientos antitumorales, ya que la primera permite la activación directa de las DCs en el sitio de inyección, mientras que las más pequeñas tienen la capacidad de migrar a ganglios linfáticos donde activarán las DCs presentes en estos tejidos (Manolova et al. 2008), *i. e.* las microesferas de 10 a 100 nm presentan mejor los antígenos a las APCs dentro de los ganglios linfáticos cuando son inyectadas vía subcutánea debido posiblemente al tamaño de los capilares linfáticos por los cuales deben pasar las partículas para entrar al ganglio, en el cual ocurre la presentación y procesamiento de los antígenos con las DCs, además de la posterior presentación a las células T naïve (Koshy et al. 2016).

Además, la degradación y la difusión del fármaco a través de la partícula son dos factores que pueden ser controlados por la morfología y el tamaño de ésta (Nodoushan 2015). A pesar de que en esta investigación no se midió la difusión de los antígenos a través de las microesferas, el poder controlar estas variables puede ser de gran utilidad para estudios posteriores y para tratamientos. El tamaño de la microesfera también es importante debido a que afecta la velocidad del transporte y su interacción con el medio *i. e.* partículas más grandes tienen menos superficie de área disponible, lo cual disminuye la degradación de los productos de la partícula (Champion et al. 2007).

Otro parámetro importante en el desempeño de las microesferas es el material del cual está compuesto. La biocompatibilidad del material le permite interactuar con un sistema biológico sin interferir en su homeostasis, lo cual ha asegurado ampliamente el uso de biomateriales en el ámbito de la biomedicina. La elección del biomaterial que se usará en el tratamiento de una terapia antitumoral tiene relevancia pues el comportamiento del biomaterial en un organismo depende en gran medida de su estructura química. En la prueba de vida y muerte de estudio se observó que las microesferas de quitosán no causaban daño con dos diferentes dosis, sin embargo, las células expuestas con la dosis mayor presentaron menor viabilidad, lo que podría deberse a los residuos de glutaraldehído presente en las microesferas o a un error en el ensayo, para lo cual podrían realizarse más pruebas en investigaciones posteriores.

A pesar de que hay un gran número de biomateriales que presentan cualidades para formar sistemas de entrega de fármacos, ninguno presenta todas las cualidades en conjunto observadas en el quitosán. Hay diversos materiales de origen natural como glucosaminoglicanos, proteínas o pseudoaminoácidos (Nair et al. 2007); otros tienen altas tasas de degradación como algunos polifosfacenos o presentan buena biocompatibilidad como en el caso de los polifosfoesteres que

además tienen degradación hidrolítica y enzimática. Sin embargo, el quitosán es un biomaterial muy completo presentando todas estas cualidades, además, al presentar cinética de degradación de orden cero (Kariminia et al. 2016), mantiene la estimulación constante de las células presentadoras de antígenos del sistema inmune ya que la liberación de la molécula activa es constante; de este modo el sistema inmune puede ser estimulado para generar una respuesta específica por más tiempo. En esta investigación se observó que la liberación de antígenos se mantuvo constante por al menos cinco días, lo cual se ve reflejado en la prueba de liberación (Figura 5). A su vez Jayasurita et al. 2011 observó que la degradación de micropartículas de quitosán en PBS es inicialmente de tipo superficial, lo cual podría permitir a los antígenos mantenerse dentro de la matriz de quitosán por más tiempo, permitiendo que llegue mayor cantidad de proteínas acopladas a la matriz al interior de las APCs. Aunque en esta investigación no se realizaron pruebas que indicaran el tipo de degradación, se observó liberación antigénica por tiempo prolongado.

En algunos casos se han elaborado híbridos de quitosán con otros materiales para potenciar algunas de las funciones de los sistemas de transporte elaborados con estos materiales, *e.g.* Wu et al. 2014 preparó microesferas de quitosán hibridizadas con un mineral denominado paligorskita, el cual, a su vez había sido modificado con hexadecil betaína para aumentar su compatibilidad con la matriz de quitosán. Mediante los estudios realizados con estos materiales se observó que las propiedades del compuesto variaban en función de la cantidad del mineral usado, mostrando mayor eficiencia de encapsulación con 20% de paligorskita modificada, de este modo, en comparación con las microesferas formadas sólo de quitosán se observó mayor capacidad de hinchamiento, mostrando mayor eficiencia de encapsulación y liberación más baja y continua del fármaco. Así, el quitosán demuestra ser un material con gran versatilidad para mostrar nuevas cualidades e inclusive puede ser usado en conjunto con otros materiales para obtener características idóneas en el modelo usado. Es decir, aunque el quitosán por sí mismo muestra cualidades para acoplarse con moléculas biológicas, en algunos casos, se pueden aumentar estas cualidades para unirse a moléculas con las que no tiene tanta afinidad, como en el caso de fármacos catiónicos.

La elección del quitosán como principal componente de las microesferas portadoras de antígenos es de gran importancia ya que se ha observado que este compuesto induce la activación de macrófagos (Mori et al. 2005), lo cual permite que por sí mismo el quitosán actúe como vehículo de los antígenos para generar una respuesta específica y como adyuvante. Como ya se mencionó, el quitosán actúa no sólo en macrófagos, sino que también activa DCs a partir de la vía cGAS-STING (Carroll et al. 2016), potenciando la respuesta Th1 antígeno-específica. A pesar de que en esta investigación no se realizaron pruebas que demostraran la activación de macrófagos en presencia de quitosán, las microesferas elaboradas posibilitan la realización de futuros ensayos.

En relación al método de elaboración de las microesferas, se debieron tomar en cuenta diferentes variables como la velocidad de agitación o de goteo para obtener microesferas con las características que se observaron previamente (superficie lisa, esfericidad, etc.), sin embargo,

hubo algunas variables de difícil control, tales como la temperatura de la mezcla, la cual se veía afectada por la agitación, la temperatura de la agitadora magnética o la misma temperatura del ambiente, la cantidad exacta de solución, la cual se veía afectada por la evaporación de la solución durante los procesos largos de agitación, entre otras. A pesar de estas dificultades, se registraron los valores de estas variables para mantenerlas lo más semejantes posibles (Tabla 6).

T° inicial	29 °C	23.5°C	25.5°C
T° final	45°C	37°C	43°C
Quitosan	3.4 ml	3.3 ml	3.3 ml
Tiempo Q	4.10 min	4.39 min	2.53 min
Tiempo G	3.13 min	4.56 min	4.33 min

Tabla 6. Valores registrados de variables de difícil control. Se muestran variables que se registraban en cada experimento que no se podían controlar por completo. “T° inicial” es la temperatura de la mezcla del aceite mineral con el SPAN 80 antes de que se comenzara a agitar. “T° final” es la temperatura de la emulsión de quitosán cuando se terminaba de agitar en el ultraturrax a 12, 200 rpm. “Quitosan” indica la cantidad de quitosán usada por lote que no siempre era de exactamente 3.3 ml. “Tiempo Q” es el tiempo que tardaba en completarse el goteo de la solución acuosa de quitosán en la solución oleosa; idealmente el “Tiempo Q” debía ser de 3 minutos. “Tiempo G” es el tiempo que tardaba en completarse el goteo del glutaraldehído que idealmente debía ser de 5 minutos.

Algunos estudios muestran que la velocidad de agitación también afecta el tamaño de partícula, ya que éste disminuye al aumentar la velocidad. Sin embargo, al seguir aumentando la velocidad de agitación se llega al punto crítico en el cual se forman agregados de partículas, observándose como si fueran partículas más grandes, esto probablemente es causado por la fuerza mecánica que destruye las fuerzas de repulsión entre las partículas (Fan et al. 2012).

Mediante la técnica de emulsión simple y reticulación se obtuvieron microesferas de quitosán menores a 1 μm de diámetro (Figura 2-B, E y F) y, aunque en menor cantidad, también se observaron microesferas de aproximadamente 10 μm de diámetro (Figura 2-A). La capacidad de la técnica de emulsión y reticulación para obtener microesferas de tamaño homogéneo *i.e.* microesferas de alrededor de 1 μm , la convierte en una herramienta de gran utilidad en la fabricación de este tipo de partículas, ya que fortalece su capacidad de ser endocitadas por APCs y pasar por vasos y capilares para la entrega de antígenos. A su vez, la forma de la partícula depende de la técnica que se use. La técnica de emulsión simple y reticulación es ideal para la fabricación de microesferas, ya que es relativamente barata, simple, mantiene la integridad del biomaterial, así como de las moléculas transportadas ya que no requiere de la aplicación de temperaturas muy altas y permite la formación de partículas esféricas. Debido a esto, la estandarización de esta técnica es de gran importancia para su uso en investigación. Además, el proceso de esterilización es indispensable en la preparación de microesferas, ya que, al tener como finalidad la activación

de una respuesta específica, la presencia de patógenos ajenos al tratamiento puede obstaculizar el tipo de respuesta inmune específica contra el tumor. En algunos estudios se ha observado que la irradiación y a microesferas de quitosán aumenta su tasa de liberación de fármacos y disminuye su capacidad de hinchamiento (Abuhanoglu y Özer 2014), lo cual podría ser otro factor que considerar en estudios posteriores en los que se analice la función de las microesferas después de pasar por diferentes métodos de esterilidad. Así mismo es importante descartar que las microesferas puedan generar citotoxicidad, por lo cual se realizó la prueba de vida y muerte con calceína y homodímero de etidio. Este tipo de prueba está basada en el uso de colorantes fluorescentes no tóxicos, los cuales permiten la identificación de células vivas y muertas ya que la calceína es retenida en células vivas y produce fluorescencia verde, mientras que el homodímero de etidio entra a las células con membranas dañadas y puede adherirse al DNA, mostrando fluorescencia roja (Chee et al. 2014). En el presente trabajo, la prueba de vida y muerte se realizó en células de bazo murinas, ya que este órgano contiene un gran número de células del sistema inmune como linfocitos, macrófagos y DCs, las cuales son blanco de las microesferas para desarrollar una respuesta antitumoral. Así mismo, se observó que las microesferas no causaron citotoxicidad, lo cual sugiere que es factible el uso de este tipo de partículas en inmunoterapia.

11. Conclusiones

- Mediante la técnica de emulsión y reticulación pueden producirse microesferas de quitosán de forma esférica con superficie lisa, así mismo, se pueden acoplar a las microesferas biomoléculas, tales como proteínas tumorales.
- Mediante la misma técnica se pueden obtener microesferas un rango que comprende diámetros de microesferas de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 10 μm .
- Se pueden acoplar antígenos obtenidos de un lisado tumoral a microesferas de quitosán, observándose liberación de dichos antígenos por un periodo de al menos cinco días al estar suspendidas en PBS en agitación constante.
- Las microesferas obtenidas probaron no ser citotóxicas al ser cultivadas en esplenocitos en concentraciones menores a 0.00618 g.

12. Apéndice

APC: Célula Presentadora de Antígenos

BMDC: Células Dendríticas Derivadas de Médula Ósea

CTL: Linfocito T Citotóxico

DAMP: Patrones Moleculares Asociados a Daño

DC: Célula dendrítica

HMw: Peso molecular alto

IL: Interleucina

LN: Ganglio linfático

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad

Mw: Peso molecular

NIH: Instituto Nacional Americano de Salud

NSF: Fundación Nacional para la Ciencia

PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PLA: Ácido poli-láctico

PLGA: Ácido poli-láctico co-glicólico

PRR: Receptores de Reconocimiento de Patógenos

TAA: Antígenos Asociados a Tumores

TCR: Receptor de Células T

TPP: Tripolifosfato

13. Referencias

Abuhanoğlu, G., & Özer, A. Y. (2014). Radiation sterilization of new drug delivery systems. *Interventional Medicine and Applied Science*, 6(2), 51-60.

Alaniz, L., Rizzo, M. M., & Mazzolini, G. (2014). Pulsing dendritic cells with whole tumor cell lysates. In *Cancer Vaccines* (pp. 27-31). Humana Press, New York, NY.

Andrianov A. K., Chen J., & Payne L. G. (1998). Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions. *Biomaterials*, 19(1-3), 109-115.

Andersson, L. I., Hellman, P., & Eriksson, H. (2008). Receptor-mediated endocytosis of particles by peripheral dendritic cells. *Human immunology*, 69(10), 625-633.

Andorko J. I. & Jewell C. M. (2017). Designing biomaterials with immunomodulatory properties for tissue engineering and regenerative medicine. *Bioengineering & translational medicine* 2(2), 139-155.

Babensee, J. E., & Paranjpe, A. (2005). Differential levels of dendritic cell maturation on different biomaterials used in combination products. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 74(4), 503-510.

Babu, A., & Ramesh, R. (2017). Multifaceted applications of chitosan in cancer drug delivery and therapy. *Marine drugs*, 15(4), 96.

Badylak S. F. & Gilbert T. W. (2008, April). Immune response to biologic scaffold materials. In *Seminars in immunology* (Vol. 20, No. 2, pp. 109-116). Academic Press.

Baimark Y. & Srisuwan Y. (2013). Hollow chitosan microspheres prepared by an oil1-in-water-in-oil2 double emulsion method. *Powder technology*, 249, 436-442.

Baimark Y. & Srisuwan Y. (2014). Preparation of alginate microspheres by water-in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca²⁺ post-cross-linking. *Advanced Powder Technology*, 25(5), 1541-1546.

Bansal H., Kaur S., Gupta A. (2011). Microsphere: Methods of preparation and applications; A comparative study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. Vol.10:69-78.

Bartneck, M., Keul, H. A., Singh, S., Czaja, K., Bornemann, J., Bockstaller, M., Moeller M., Zwadlo-Klarwasser G. & Groll, J. (2010). Rapid uptake of gold nanorods by primary human blood phagocytes and immunomodulatory effects of surface chemistry. *ACS nano*, 4(6), 3073-3086.

Bhat, S., & Kumar, A. (2013). Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter*, 3(3), e24717.

Bencherif, S. A., Sands, R. W., Ali, O. A., Li, W. A., Lewin, S. A., Braschler, T. M., Shih T., Verbeke C. S., Bhatta D., Dranoff G. & Mooney, D. J. (2015). Injectable cryogel-based whole-cell cancer vaccines. *Nature communications*, 6, 7556.

Bernkop-Schnürch, A., & Dünnhaupt, S. (2012). Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(3), 463-469.

Berthold A., Cremer K., Kreuter J. (1996a). Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. *Journal of Controlled Release*. 39: 17-25.

Berthold, A., Cremer, K., & Kreuter, J. (1996b). Influence of crosslinking on the acid stability and physicochemical properties of chitosan microspheres. *STP pharma sciences*, 6(5), 358-364.

- Blanco E., Shen H. & Ferrari M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology* (33), 941-951.
- Bružauskaitė, I., Bironaitė D., Bagdonas E. & Bernotienė E. (2016). Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects. *Cytotechnology*, 68(3), 355-369.
- Buckles R. G. (1983). Biomaterials for drug delivery systems. *Journal of biomedical materials research*, 17(1), 109-128.
- Carroll, E. C., Jin, L., Mori, A., Muñoz-Wolf, N., Oleszycka, E., Moran, H. B., ... & Andersen, P. (2016). The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons. *Immunity*, 44(3), 597-608.
- Champion, J. A., Katare, Y. K., & Mitragotri, S. (2007). Particle shape: a new design parameter for micro-and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release*, 121(1-2), 3-9.
- Chan B., Leong K. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur spine J.* 17 (Suppl. 4):S467-S479.
- Chee, A. V., Ren, J., Lenart, B. A., Chen, E. Y., Zhang, Y., & An, H. S. (2014). Cytotoxicity of local anesthetics and nonionic contrast agents on bovine intervertebral disc cells cultured in a three-dimensional culture system. *The Spine Journal*, 14(3), 491-498.
- Cheung, A. S., & Mooney, D. J. (2015). Engineered materials for cancer immunotherapy. *Nano today*, 10(4), 511-531.
- Cho D. W., Lee J. S., Jang J., Jung J. W., Park J. H., & Pati F. (2015). Natural, synthetic and semi-synthetic polymers. *In Organ Printing*. Morgan & Claypool Publishers.
- dos Santos, V., Brandalise, R. N., & Savaris, M. (2017). Biomaterials: characteristics and properties. *In Engineering of Biomaterials* (pp. 5-15). Springer, Cham.
- Dos Santos, Z. M., Caroni, A. L. P. F., Pereira, M. R., Da Silva, D. R., & Fonseca, J. L. C. (2009). Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. *Carbohydrate Research*, 344(18), 2591-2595.
- Downey, J. S., Frank, R. S., Li, W. H., & Stöver, H. D. (1999). Growth mechanism of poly (divinylbenzene) microspheres in precipitation polymerization. *Macromolecules*, 32(9), 2838-2844.
- Dutta P. K., Dutta J., Chattopadhyaya M. C., & Tripathi V. S. (2004). Chitin and chitosan: novel biomaterials waiting for future developments. *Journal of Polymer Materials*, 21(3), 321-333.
- Eghbal N., Yarmand M. S., Mousavi M., Degraeve P., Oulahal N., & Gharsallaoui A. (2016). Complex coacervation for the development of composite edible films based on LM pectin and sodium caseinate. *Carbohydrate polymers*, 151, 947-956.

- El-Shafy, M. A., Kellaway, I. W., Taylor, G., & Dickinson, P. A. (1999). Improved nasal bioavailability of FITC-dextran (M w 4300) from mucoadhesive microspheres in rabbits. *Journal of drug targeting*, 7(5), 355-361.
- Engineer C., Parikh J., & Raval A. (2011). Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 25(2).
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21-27.
- Ferrucci P. F., Tosti G., di Pietro A., Passoni C., Pari C., Tedeschi I., Cataldo F., Martinoli C., Testori A. (2012). Newly identified tumor antigens as promising cancer vaccine targets for malignant melanoma treatment. *Current topics in medicinal chemistry*, 12(1), 11-31.
- Fontana F., Liu D., Hirvonen J., & Santos H. A. (2017). Delivery of therapeutics with nanoparticles: what's new in cancer immunotherapy?. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(1), e1421.
- Gammon, J. M., Dold, N. M., & Jewell, C. M. (2016). Improving the clinical impact of biomaterials in cancer immunotherapy. *Oncotarget*, 7(13), 15421.
- Godavitarne C., Robertson A., Peters J. & Rogers B. (2017). Biodegradable materials. *Orthopaedics and Trauma*, 31(5), 316-320.
- Gordan, J. D., & Vonderheide, R. H. (2002). Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. *Cytotherapy*, 4(4), 317-327.
- Gunatillake, P. A., & Adhikari, R. (2003). Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 5(1), 1-16.
- Gupta, K. C., & Jabrail, F. H. (2008). Effect of molecular weight and degree of deacetylation on controlled release of isoniazid from chitosan microspheres. *Polymers for Advanced Technologies*, 19(5), 432-441.
- Gupta, S., & Vyas, S. P. (2010). Carbopol/chitosan based pH triggered in situ gelling system for ocular delivery of timolol maleate. *Scientia pharmaceutica*, 78(4), 959-976.
- He, M., Wang, H., Dou, W., Chou, G., Wei, X., & Wang, Z. (2016). Preparation and drug release properties of norisoboldine-loaded chitosan microspheres. *International journal of biological macromolecules*, 91, 1101-1109.
- He, P., Davis, S. S., & Illum, L. (1999). Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International journal of pharmaceutics*, 187(1), 53-65.
- He, Q., Ao, Q., Wang, A., Gong, Y., Zhao, N., & Zhang, X. (2007). In vitro cytotoxicity and protein drug release properties of chitosan/heparin microspheres. *Tsinghua Science & Technology*, 12(4), 361-365.

- Hejazi R., & Amiji M. (2002). Stomach-specific anti-H. pylori therapy. I: preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres. *International journal of pharmaceuticals*, 235(1-2), 87-94.
- Hirano, S. (1988). Bio-compatibility of chitosan by oral and intravenous administrations. *Polymeric Materials Engineering and Science*, 59, 897-901.
- Hirota, K., & Terada, H. (2012). Endocytosis of particle formulations by macrophages and its application to clinical treatment. In *Molecular Regulation of Endocytosis*. InTech.
- Howard D., BATTERY L., Shakesheff K., Roberts S. (2008) Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J. Anat.* 213, pp 66-72.
- Huang, M., Khor, E., & Lim, L. Y. (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical research*, 21(2), 344-353.
- Hutmacher, D. W., Goh, J. C. H., & Teoh, S. H. (2001). An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *ANNALS-ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE*, 30(2), 183-191.
- Illum, L., Jabbar-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N., & Davis, S. S. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Advanced drug delivery reviews*, 51(1-3), 81-96.
- Jan, S. S., Liu, D. C., Dong, X. Y., Hu, Y. M., & Chen, J. D. (2012). Effects of chitosan and its derivative added to water on immunological enhancement and disease control. *Immunotherapy*, 4(7), 697-701.
- Jayasuriya, A. C., & Mauch, K. J. (2011). In vitro degradation behavior of chitosan based hybrid microparticles. *Journal of biomedical science and engineering*, 4(5), 383.
- Jyoti, K., Pandey, R. S., Kush, P., Kaushik, D., Jain, U. K., & Madan, J. (2017). Inhalable bioresponsive chitosan microspheres of doxorubicin and soluble curcumin augmented drug delivery in lung cancer cells. *International journal of biological macromolecules*, 98, 50-58.
- Kariminia, S., Shamsipur, A., & Shamsipur, M. (2016). Analytical characteristics and application of novel chitosan coated magnetic nanoparticles as an efficient drug delivery system for ciprofloxacin. Enhanced drug release kinetics by low-frequency ultrasounds. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 129, 450-457.
- Kemala, T., Budianto, E., & Soegiyono, B. (2012). Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly (lactic acid) and poly (ϵ -caprolactone) with poly (vinyl alcohol) as emulsifier. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(1), 103-108.
- Kim J. C., Song M. E., Lee E. J., Park S. K., Rang M. J., & Ahn H. J. (2002). Preparation of Microspheres by an Emulsification-Complexation Method. *Journal of colloid and interface science*, 248(1), 1-4.

- Kim K. K., & Pack D. W. (2006). Microspheres for drug delivery. In *BioMEMS and biomedical nanotechnology* (pp. 19-50). Springer, Boston, MA.
- Koev, S. T., Powers, M. A., Park, J. J., Yi, H., Wu, L., Bentley, W. E., Payne G. F., Rubloff G. W. & Ghodssi, R. (2006, January). Chitosan as a functional interface between biology and microsystems. *In Bio Micro and Nanosystems Conference, 2006. BMN'06* (pp. 82-82). IEEE.
- Köll, P., Borchers, G., & Metzger, J. O. (1991). Thermal degradation of chitin and cellulose. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 19, 119-129.
- Komi, D. E. A., Sharma, L., & Cruz, C. S. D. (2018). Chitin and its effects on inflammatory and immune responses. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 54(2), 213-223.
- Koshy S. T., & Mooney D. J. (2016). Biomaterials for enhancing anti-cancer immunity. *Current opinion in biotechnology*, 40, 1-8.
- Kotadiya H., Patel V., Koradiya H. (2009). Effect of cross-linking on physicochemical properties of chitosan mucoadhesive microspheres: A factorial approach. *International Journal of Green Pharmacy*, pp. 58-62.
- Lakshmi S., Katti D. S., & Laurencin C. T. (2003). Biodegradable polyphosphazenes for drug delivery applications. *Advanced drug delivery reviews*, 55(4), 467-482.
- Lavi, G., Voronov, E., Dinarello, C. A., Apte, R. N., & Cohen, S. (2007). Sustained delivery of IL-1Ra from biodegradable microspheres reduces the number of murine B16 melanoma lung metastases. *Journal of Controlled Release*, 123(2), 123-130.
- Lee, D., & Weitz, D. A. (2009). Nonspherical colloidosomes with multiple compartments from double emulsions. *Small*, 5(17), 1932-1935.
- Lehr C. M., Bouwstra J. A., Schacht E. H., & Junginger H. E. (1992). In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *International journal of Pharmaceutics*, 78(1-3), 43-48.
- Li A. V., Moon J. J., Abraham W., Suh H., Elkhader J., Seidman M. A., Yen M, Im E., Foley M., Barouch D. & Irvine, D. J. (2013). Generation of effector memory T cell-based mucosal and systemic immunity with pulmonary nanoparticle vaccination. *Science translational medicine*, 5(204), 204ra130-204ra130.
- Li, W. A., & Mooney, D. J. (2013). Materials based tumor immunotherapy vaccines. *Current opinion in immunology*, 25(2), 238-245.
- Lim L. Y., Wan L. S., & Thai P. Y. (1997). Chitosan microspheres prepared by emulsification and ionotropic gelation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23(10), 981-985.
- Lin, Y. C., Lou, P. J., & Young, T. H. (2014). Chitosan as an adjuvant-like substrate for dendritic cell culture to enhance antitumor effects. *Biomaterials*, 35(31), 8867-8875.
- Lueßen, H. L., de Leeuw, B. J., Langemeijer, M. W., de Boer, A. B. G., Verhoef, J. C., & Junginger, H. E. (1996). Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan

improve the intestinal absorption of the peptide drug busserelin in vivo. *Pharmaceutical research*, 13(11), 1668-1672.

Malmö, J., Vårum, K. M., & Strand, S. P. (2011). Effect of chitosan chain architecture on gene delivery: comparison of self-branched and linear chitosans. *Biomacromolecules*, 12(3), 721-729.

Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European journal of immunology*, 38(5), 1404-1413.

McCarthy, E. F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal*, 26, 154.

Miglani, S. (2002). Preparation and evaluation of controlled release oral dosage forms of glipizide and nifedipine.

Mori, T., Murakami, M., Okumura, M., Kadosawa, T., Uede, T., & Fujinaga, T. (2005). Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives. *Journal of veterinary medical science*, 67(1), 51-56.

Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*, 32(8-9), 762-798.

Jafari-Nodoushan, M., Barzin, J., & Mobedi, H. (2015). Size and morphology controlling of PLGA microparticles produced by electro hydrodynamic atomization. *Polymers for Advanced Technologies*, 26(5), 502-513.

O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 14(3), 88-95.

Pantziarka, P., Sukhatme, V., Bouche, G., Meheus, L., & Sukhatme, V. P. (2016). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—diclofenac as an anti-cancer agent. *ecancermedicalscience*, 10.

Piñón G. (2015). Evaluación de la respuesta inmune después de la administración de células dendríticas cargadas con antígenos MAGE y activadas con el péptido GK-1 en ratones con melanoma (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina.

Polk, A., Amsden, B., De Yao, K., Peng, T., & Goosen, M. F. A. (1994). Controlled release of albumin from chitosan—alginate microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(2), 178-185.

Rajput S., Agrawal P., Pathak A., Shrivastava N., Baghel S., Baghel R. (2012). A review on microspheres: Methods of preparation and evaluation. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 1, Issue 1:422-438.

Reddy, S. T., Swartz, M. A., & Hubbell, J. A. (2006). Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends in immunology*, 27(12), 573-579.

Reis R. L., Neves N. M., Mano J. F., Gomes M. E., Marques A. P., & Azevedo H. S. (2008). Natural-based polymers for biomedical applications. *Elsevier*.

Ren, D., Yi, H., Wang, W., & Ma, X. (2005). The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Research*, 340(15), 2403-2410.

Rodrigues, S., Dionísio, M., López, C. R., & Grenha, A. (2012). Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. *Journal of functional biomaterials*, 3(3), 615-641.

Salatin, S., & Yari Khosroushahi, A. (2017). Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(9), 1668-1686.

Saleh T., Shojaosadati S. (2016). Multifunctional nanoparticles for cancer immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*. Vol. 12, No. 7, 1863-1875.

Schipper, N. G., Vårum, K. M., & Artursson, P. (1996). 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(11), 1686-1692.

Seydoux, E., Rothen-Rutishauser, B., Nita, I. M., Balog, S., Gazdhar, A., Stumbles, P. A., Petri-Fink A., Blank F. & Von Garnier, C. (2014). Size-dependent accumulation of particles in lysosomes modulates dendritic cell function through impaired antigen degradation. *International journal of nanomedicine*, 9, 3885.

Shen, H., Ackerman, A. L., Cody, V., Giodini, A., Hinson, E. R., Cresswell, P., Edelson R. L., Saltzman W. M. & Hanlon, D. J. (2006). Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles. *Immunology*, 117(1), 78-88.

Shi, G. N., Zhang, C. N., Xu, R., Niu, J. F., Song, H. J., Zhang, X. Y., Wang W. W., Wang Y. M., Li C., Wei X. Q., & Kong, D. L. (2017). Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine. *Biomaterials*, 113, 191-202.

Shiraishi, S., Imai, T., & Otagiri, M. (1993). Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation. *Journal of controlled release*, 25(3), 217-225.

Shu X. Z., & Zhu K. J. (2001). Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. *Journal of microencapsulation*, 18(2), 237-245.

Shu, X. Z., & Zhu, K. J. (2002). The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54(2), 235-243.

Silva, A. E., Barratt, G., Chéron, M., & Egito, E. S. T. (2013). Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. *International journal of pharmaceutics*, 454(2), 641-648.

- Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., & Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International journal of pharmaceutics*, 274(1-2), 1-33.
- Srinivasan, R., & Wolchok, J. D. (2004). Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines. *Journal of translational medicine*, 2(1), 12.
- Sun, W., Mao, S., Wang, Y., Junyaprasert, V. B., Zhang, T., Na, L., & Wang, J. (2010). Bioadhesion and oral absorption of enoxaparin nanocomplexes. *International journal of pharmaceutics*, 386(1-2), 275-281.
- Tamariz E., & Rios-Ramírez A. (2013). Biodegradation of medical purpose polymeric materials and their impact on biocompatibility. In *Biodegradation-Life of Science*. InTech.
- Taranejoo, S., Rafienia, M., Janmaleki, M., Kamali, M., & Sadeghzadeh, L. (2009). Effect of Polymer Molecular Weight on Morphology and Particle Size of Chitosan Microspheres Prepared via Spray Drying Method. In *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7-12, 2009, Munich, Germany* (pp. 251-252). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tharanathan, R. N., & Kittur, F. S. (2003). Chitin—the undisputed biomolecule of great potential. *Critical reviews in food sciences and nutrition*, 43(1):61-87.
- Velasco Peña, M. A., & Garzón Alvarado, D. A. (2010). Implantes Scaffolds para regeneración ósea.: Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 29(1), 0-0.
- Vert M., Doi Y., Hellwich K., Hess M., Hodge P., Kubisa P., Rinauldo M., Schue F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.*, Vol. 84, No.2, pp. 377-410.
- Vogler, E. A. (2004). Role of water in biomaterials. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine 2nd edition*. Ratner, BB, 59-65.
- Waeckerle-Men, Y., & Groettrup, M. (2005). PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Advanced drug delivery reviews*, 57(3), 475-482.
- Wong K., Li W., Mooney J., Dranoff G. (2016). Chapter 5. Advances in therapeutic cancer vaccines. *En Advances in Immunology* (191-249). London, UK. Elsevier.
- Wu, J., Ding, S., Chen, J., Zhou, S., & Ding, H. (2014). Preparation and drug release properties of chitosan/organomodified palygorskite microspheres. *International journal of biological macromolecules*, 68, 107-112.
- Xia, Y., Fan, Q., Hao, D., Wu, J., Ma, G., & Su, Z. (2015). Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the ocean. *Vaccine*, 33(44), 5997-6010.
- Yin X. & Stöver H. D. (2003). Hydrogel Microspheres Formed by Complex Coacervation of Partially MPEG-Grafted Poly (styrene-*a* It-maleic anhydride) with PDADMAC and Cross-Linking with Polyamines. *Macromolecules*, 36(23), 8773-8779.

Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Haggard, W. O., & Bumgardner, J. D. (2011). Deacetylation of chitosan: material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. *Materials*, 4(8), 1399-1416.

Zaharoff, D. A., Rogers, C. J., Hance, K. W., Schlom, J., & Greiner, J. W. (2007). Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*, 25(11), 2085-2094.

Zhang, C., Shi, G., Zhang, J., Song, H., Niu, J., Shi, S., Huang P., Wang Y., Li C., & Kong, D. (2017). Targeted antigen delivery to dendritic cell via functionalized alginate nanoparticles for cancer immunotherapy. *Journal of Controlled Release*, 256, 170-181.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., & Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature reviews immunology*, 8(1), 59.