



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO CARGADAS  
CON LISADO TUMORAL Y ACOPLADAS A ANTICUERPO ANTI-CLEC9A PARA POSIBLES  
APLICACIONES EN INMUNOTERAPIA CONTRA MELANOMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MÉD. CIR. IBAÑEZ RIOS MYRIAM ILIANA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., AGOSTO, 2020**



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/346/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramirez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de enero de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **IBÁÑEZ RÍOS MYRIAM ILIANA** con número de cuenta **518018407** con la tesis titulada **"CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO CARGADAS CON LISIDO TUMORAL Y ACOPLADAS A ANTICUERPOS ANTI-CLEC9A PARA POSIBLES APLICACIONES EN INMUNOTERAPIA CONTRA MELANOMA"**, realizada bajo la dirección del **DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA  
Vocal: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ  
Secretario: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ  
Suplente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS  
Suplente: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 18 de marzo de 2020

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos económicos recibidos para poder realizar mis estudios e investigación:

- Beca CONACYT CVU/ BECARIO 887877.

Finalmente a los miembros del comité tutorial por su apoyo académico:

- Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
- Dr. José Sullivan López González
- Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

- Agradezco al Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez por su orientación y coordinación en este trabajo.
- A la Dra. Gabriela Piñón Zárate por su apoyo y enseñanza durante todo este tiempo.
- A los miembros del laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Medicina, UNAM
  - Biol. Beatriz Hernández Téllez
- A la M. en C. Laura Bucio López que ha contribuido de forma importante a mi desarrollo académico y como docente.
- A los miembros del laboratorio de Nanofibras para Ingeniería de Tejidos en el Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM por su gran apoyo y paciencia, sin su ayuda esto no hubiera sido posible:
  - Dr. Alfredo Maciel Cerda
  - Ing. Erick Robles Hurtado
  - Quím. Karen Garduño Ximello
- Al Laboratorio Universitario de Nanotecnología Ambiental, LUNA CCADET UNAM y a la técnica académica Viridiana Maturano Rojas por la caracterización de las muestras mediante la técnica de dispersión de luz dinámica, Zetasizer Nano ZS-Malvern.
- Al Dr. Alberto Guevara Flores del depto. de bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM por su constante ayuda en este proyecto.
- Al Dr. David Mauricio Giraldo Gómez de la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina, UNAM por su ayuda en la obtención de micrografías en el equipo de microscopía SEM-FIB Crossbeam 550 de ZEISS.

- A la M. en C. Nelly López Váldez y a la Dra. Teresa Fortoul Van Der Goes del laboratorio de metales pesados en la Facultad de Medicina, UNAM por su apoyo en la planeación y elaboración de electroforesis.

## DEDICATORIA

A mis padres que sin su apoyo y amor no estaría en donde estoy. Siempre me han enseñado a luchar por lo que quiero y nunca rendirme. Los amo y agradezco infinitamente por tenerlos a mi lado.

A la mijita, la dueña de mi corazón y mi persona favorita... mi Andy. Eres la mujer más fuerte y sabía que conozco. Jamás acabaría de agradecerte todo lo haces por mí, pero lo más importante, gracias por hacerme feliz.

A mi familia enorme y querida, que a pesar de los años y de que cada uno ha ido formando su propio camino, seguimos más unidos que nunca. En especial a mis abuelos, Julieta, Laura, Gerardo y Javier, agradezco que sigan compartiendo conmigo toda su sabiduría y amor.

A Karen, Joss, Sam, Liz, Are, Sandy y Ely, que llenan de alegría y amor mi corazón y que a pesar de que ya andamos por los casi treinta, seguimos reuniéndonos y haciendo pijamadas como cuando teníamos 6.

A esas amistades que llegan cuando todavía eres ingenua y piensas que lo más difícil de tu vida será la secundaria. A esas personas que nunca se van y ahora forman parte de tu familia, tanto que tienen un lugar apartado en todos los eventos familiares. Los amo César y Ricardo.

A mi Fer y mi Pamelix, gracias por su amistad, consejos, risas y llantos... por continuar acompañandome en esta gran aventura que es la vida. Las amo y no sé que haría sin ustedes.

A Gaby, Alda y Lau porque simplemente no sé que hubiera sido de mí sin ellas (no habría terminado porque seguramente habría olvidado algún trámite). Gracias por haberme acogido desde el inicio y por haberme brindado su amistad, consejo y guía.

A mi pequeño Mario por ser un soñador y siempre invitarme a soñar con él. Porque a pesar de todo lo vivido, bueno y malo, sigues brindandome tu amistad y sigues estando para mí como cuando teníamos 18. Gracias por todo lo que hemos aprendido juntos.

A mi Sof, esa amiga que todos deben de tener en sus vidas. Lo logramos mamita, amigas en la vida real. Te amo con todo mi corazón, gracias por seguirme la corriente con todas mis locuras y por ser tan leal y hermosa como eres.

A Ma por ser la roomie más increíble, la compañera de viajes más aliviada y la persona con mejor gusto musical y que por lo tanto se ha convertido en mi compañera de festivales. Te amo Ma y cuando todo esto termine...Osheaga.

A Mirel por su amistad, por todas las risas y por todo el amor que siempre me da. Te amo y amo verte feliz y con esa sonrisa capaz de iluminar habitaciones enteras.

A Rafa por su amistad y por todas esas tardes de museos y largas caminatas. Aún no sé como lograste hacerme inception pero en pocos meses seremos vecinos. Te quiero.

A todos los del laboratorio de materiales, Eli, Andrés, Sergio, Emma, Josu, Linda, Dr. Maciel y sobre todo a Erick y Karen, me adoptaron cuando no tenían porque hacerlo y se volvieron mi segunda familia. Gracias por todas esas tardes de mojitos y de experimentos eternos. Sin ustedes esto no habría sido posible.

A mis amigos y colegas del laboratorio por todos su apoyo y por todas las risas que hicieron la vida más amena. Sobre todo a mi Doc. Castell y a Gaby, muchas gracias por haberme dado la oportunidad de aprender de ustedes.

A todas las personas dentro de la UNAM que me ayudaron y aportaron su granito de arena en este proyecto.

Finalmente, a todas las personas que me acompañaron en estos años y que ahora ya no están. La vida nos llevo por caminos diferentes pero sé que sin ustedes no estaría en donde hoy estoy. Gracias por ayudarme a tener esa confianza que tanto me faltaba y hacerme sentir que podía lograr todo lo que me propusiera.

## ÍNDICE

### LISTA DE FIGURA

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Nanotecnología.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Biomateriales utilizados en la fabricación de nanopartículas .....</b>	<b>6</b>
3.2.1 Clasificación de biomateriales.....	7
<b>3.3 Quitosano .....</b>	<b>9</b>
<b>3.4 Métodos de fabricación de nanopartículas de quitosano .....</b>	<b>12</b>
3.4.1 Gelación Ionotrópica.....	12
3.4.2 Entrecruzamiento por emulsión .....	13
3.4.3 Micelización inversa.....	13
3.4.4 Spray-drying .....	13
3.4.5 Nanoprecipitación .....	14
<b>3.5 Células Dendríticas .....</b>	<b>15</b>
3.5.1 Origen de las Células Dendríticas .....	15
3.5.2 Clasificación por fenotipo de CD.....	16
3.5.3 Procesamiento de Antígenos.....	18
3.5.4 Presentación de antígenos.....	20
3.5.5 Presentación cruzada de antígenos .....	22
3.5.6 Células Dendríticas CD8 $\alpha$ .....	24
<b>3.6 Respuesta inmune en cáncer .....</b>	<b>26</b>

3.7	Antígenos tumorales usados en Inmunoterapia .....	28
3.8	Inmunoterapia con nanopartículas .....	30
4.	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>34</b>
5.	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
5.1	Objetivo General.....	35
5.2.	Objetivos Particulares .....	35
6.	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>36</b>
7.	<b>MÉTODOLOGÍA</b> .....	<b>38</b>
7.1	Elaboración de micropartículas y nanopartículas de quitosano.....	38
7.1.1	Materiales .....	38
7.1.2	Método de emulsión simple .....	38
7.1.3	Método de gelificación ionotrópica .....	39
7.1.4	Caracterización de nanopartículas de quitosano .....	41
7.2	Nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral.....	41
7.2.1	Obtención del lisado tumoral.....	41
7.2.2	Nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral por método de gelación ionotrópica .....	42
7.2.3	Prueba de eficacia de cargado de lisado tumoral en nanopartículas de quitosano .....	42
7.3	Acoplamiento de nanopartículas de quitosano a anti-Clec9A PE y CpGs..	43
7.3.1	Materiales .....	43
7.3.2	Metodología .....	43
7.3.3	Prueba de acoplamiento a Nanopartículas de Quitosano .....	44
7.4	Prueba de citotoxicidad con Nanopartículas de Quitosano .....	45

7.4.1	Materiales .....	45
7.4.2	Metodología .....	45
<b>8</b>	<b> RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
8.1	Fabricación de nanopartículas de quitosano .....	46
8.1.1	Emulsión simple .....	46
8.1.2	Gelificación ionotrópica .....	47
8.2	Nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral .....	49
8.3	Acoplamiento de Nanopartículas de Quitosano a anti-Clec9A y CpGs .....	51
8.4	Pruebas de Viabilidad Celular .....	53
<b>9</b>	<b> DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
9.1	Proyecciones a futuro.....	59
<b>10</b>	<b> CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>11</b>	<b> REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

### **Introducción**

Figura 1. Estructura química del quitosano

Figura 2. Esquema de versatilidad del quitosano

Figura 3. Efectos del quitosano en la célula dendrítica

Figura 4. Procesamiento de antígenos por la célula dendrítica

Figura 5. Sinapsis inmunológica

Figura 6. Mecanismos alternos de presentación de antígenos.

Figura 7. Estructura Clec9A

Figura 8. Inmunoección del cáncer

Figura 9. Uso de nanopartículas en inmunoterapia

### **Materiales y métodos**

Figura 10. Método de Emulsión Simple

Figura 11. Método de Gelificación Ionotrópica

Figura 12. Esquema de fabricación de nanopartículas de quitosano acopladas a anti-Clec9A y CpGs

### **Resultados**

Figura 13. Partículas de quitosano creadas por método de emulsión simple

Figura 14. Estandarización de nanopartículas de quitosano por gelación ionotrópica

Figura 15. Nanopartículas de quitosano creadas por método gelificación ionotrópica

Figura 16. Tamaño de nanopartículas cargadas con lisado tumoral

Figura 17. Eficiencia de encapsulamiento de nanopartículas cargadas con lisado tumoral

Figura 18. Acoplamiento de albúmina en la superficie de nanopartículas de quitosano

Figura 19. Acoplamiento de moléculas en la superficie de nanopartículas de quitosano

Figura 20. Viabilidad en células de bazo

## **Discusión**

Figura 21. Ciclo de cáncer-inmunidad

Figura 22. Esquema de experimentos *in vitro* con NPQSLT anti-Clec9A PE/ CpGs

Figura 23. Esquema de experimentos *in vivo* con NPQSLT anti-Clec9A PE/ CpGs

## **Tablas**

Tabla 1. Combinaciones de concentraciones diferentes de Quitosano y TPP

Tabla 2. Combinaciones de diferentes concentraciones de quitosano, TPP y lisado tumoral

## 1. RESUMEN

**Introducción.** La inmunoterapia antitumoral consiste en estimular al sistema inmune para generar una respuesta que cause la destrucción del tumor. Actualmente una de las inmunoterapias existentes radica en la activación *in vivo* de las células dendríticas (CDs) con antígenos tumorales y adyuvantes inmunoestimuladores. Uno de los mayores retos es la pobre respuesta inmunológica que se suele obtener debido a la entrega inadecuada de antígenos hacia las CDs y a las condiciones fisiológicas adversas como la degradación enzimática. Es por ello que se ha propuesto la encapsulación de antígenos en biomateriales como una estrategia promisorio para incrementar la activación de CDs. La encapsulación con biomateriales presenta diversas ventajas como proteger a los antígenos de su degradación e inducir su liberación controlada; aunado a esto, la superficie de los biomateriales puede ser modificada con ligandos o anticuerpos para que sean reconocidos específicamente por las CDs y por lo tanto ser utilizados como blancos dirigidos. Entre los biomateriales que se han utilizado se encuentra el quitosano, que es un polímero utilizado ampliamente como vehículo para liberar fármacos ya que es altamente biocompatible, no tóxico, biodegradable y por si mismo genera respuestas de inmunomodulación. Por esta razón se decidió construir nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral (que provee de antígenos tumorales) y acopladas a anti-Clec9a (para mejorar el reconocimiento y presentación de antígenos) y CpGs (como inmunoestimulador) para su posible empleo en inmunoterapia contra cáncer.

**Materiales y métodos.** Se construyeron nanopartículas de quitosano (NPQS) por los métodos de emulsión simple y gelificación ionotrópica. Posteriormente, se caracterizaron por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y dispersión de luz dinámica (DLS) para seleccionar la técnica que generaba menor tamaño de nanopartículas. Para obtener nanopartículas cargadas con lisado tumoral (NPQS-LT), se añadió a la solución de quitosano, lisado tumoral (LT) proveniente de melanomas de ratones C57BL/6 inoculados con células tumorales B16-F10. Para mejorar la eficiencia de encapsulamiento se probaron dos pH diferentes (4 y 4.5) y 3 concentraciones distintas de LT (125, 250 y 500 $\mu$ g). A continuación, se demostró la eficiencia de la técnica de acoplamiento de moléculas en la superficie de las NPQS utilizando albúmina y por medio de una electroforesis se eligió la

concentración adecuada para acoplar anti-Clec9a unido a ficoeritrina (anti-Clec9a-PE) y CpGs a las NPQS; el acoplamiento fue corroborado por microscopía de fluorescencia detectando la PE del anticuerpo y utilizando DAPI para identificar las CpGs. Finalmente se midió la viabilidad de células de bazo de ratones C57BL/6 tratados con NPQS por 24 y 72 horas por medio de citometría de flujo utilizando el kit Anexina V/7AAD.

**Resultados.** Por medio de la técnica de emulsión simple se obtuvieron partículas con forma esférica y en un rango de tamaño de 250 a 4000nm. Por otro lado, la técnica de gelificación ionotrópica generó partículas con forma más irregular, pero con un tamaño menor; el 85% de las partículas se encontró por debajo de los 390nm, por lo que se decidió utilizar esta técnica. Al variar el pH, se observó que la eficiencia de encapsulamiento en ambos pH fue de más del 90%. Sin embargo, a pH 4.5 el promedio de tamaño de NPQS y los índices de polidispersión (PDI) en NPQS-LT fueron significativamente menores que a pH 4, aunado a esto, las NPQS-LT a cualquier pH tuvieron un incremento significativo de tamaño con respecto a las NPQS. Se demostró cualitativamente que la albúmina en cualquier concentración era capaz de acoplarse a las NPQS. Se comprobó que las NPQS si estaban acopladas a anti-Clec9a-PE y CpGs al observarse emisión de fluorescencia. La viabilidad de células de bazo tratadas con diferentes concentraciones de NPQS a 24 horas no tuvieron diferencia significativa con el control negativo, manteniéndose por arriba del 85%. A 72 horas, si se observó disminución significativa de la viabilidad, esta disminuyó a menos del 85%.

**Conclusiones.** Se demostró que la fabricación de nanopartículas por el método de gelificación ionotrópica genera partículas de menor diámetro.

Las NPQS-LT fabricadas a pH de 4 y 4.5 tuvieron una eficiencia de encapsulamiento mayor a 90%, no obstante a pH 4.5 mantuvieron un PDI menor a 0.3.

Las NPQS fueron acopladas eficientemente a anti-Clec9a-PE y CpGs.

Las NPQS no causaron citotoxicidad en células de bazo a 24 horas pero a 72 horas provocaron la disminución de la viabilidad celular.

## 2. ABSTRACT

**Introduction.** Cancer immunotherapy consists of stimulating the immune system to generate a response that destroys the tumor. Currently, one of the existing immunotherapies lies in the *in vivo* activation of dendritic cells (DCs) with tumor antigens and immunostimulatory adjuvants. One of the biggest challenges is the poor immunological response that is usually obtained due to inadequate delivery of antigens to DCs and adverse physiological conditions such as enzymatic degradation. That is the why encapsulation of antigens in biomaterials has been proposed as a promising strategy to increase the activation of DCs. Encapsulation with biomaterials has several advantages such as protecting antigens from degradation and inducing their controlled release; In addition to this, the surface of the biomaterials can be modified with ligands or antibodies so that they are specifically recognized by the DCs and therefore be used as targets. Among the biomaterials that have been used is the chitosan, which is a polymer widely used as a vehicle to release drugs since it is highly biocompatible, non-toxic, biodegradable and by itself generates immunomodulation responses. For this reason, it was decided to build chitosan nanoparticles loaded with tumor lysate (which provides tumor antigens) and coupled to anti-Clec9a (to improve recognition and cross-presentation of antigens) and CpGs (as immunostimulator) for possible use in cancer immunotherapy.

**Methods and materials.** Chitosan nanoparticles (CSNP) were constructed by simple emulsion and ionotropic gelation methods. Subsequently, they were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and dynamic light scattering (DLS) to select the technique that generated the smallest nanoparticle size. To obtain nanoparticles loaded with tumor lysate (CSNP-TL), tumor lysate (TL) from melanomas of C57BL / 6 mice inoculated with B16-F10 tumor cells was added to the chitosan solution. To improve the encapsulation efficiency, two different pH (4 and 4.5) and 3 different concentrations of TL (125, 250 and 500 $\mu$ g) were tested. Next, the efficiency of the technique of coupling molecules on the surface of the CSNP was demonstrated using albumin and through an electrophoresis the appropriate concentration was chosen to couple anti-Clec9a bound to phycoerythrin (anti-Clec9a-PE) and CpGs to the CSNP; The coupling was corroborated by fluorescence microscopy by detecting the PE of the antibody and using DAPI to identify CpGs. Finally,

the viability of spleen cells of C57BL / 6 mice treated with CSNP for 24 and 72 hours was measured by flow cytometry using the Annexin V/7AAD kit.

**Results.** Using the simple emulsion technique, particles with a spherical shape and in a size range of 250 to 4000 nm were obtained. On the other hand, the ionotropic gelation technique generated particles with a more irregular shape, but with smaller size; 85% of the particles were found below 390nm, so it was decided to use this technique. When varying the pH, it was observed that the encapsulation efficiency at both pH was more than 90%. However, at pH 4.5 the average NPQS size and polydispersion indexes (PDI) in NPQS-LT were significantly lower than at pH 4, coupled with this, the NPQS-LT at any pH had a significant increase in size with regarding the NPQS. It was qualitatively demonstrated that albumin at any concentration was capable of coupling to NPQS. It was found that NPQS were coupled to anti-Clec9a-PE and CpGs when fluorescence emission was observed. The viability of spleen cells treated with different concentrations of NPQS at 24 hours had no significant difference with the negative control, staying above 85%. At 72 hours, if a significant decrease in viability was observed, it decreased to less than 85%.

**Conclusions.** It was shown that the manufacture of nanoparticles by the ionotropic gelation method generates particles of smaller diameter.

NPQS-LT manufactured at pH 4 and 4.5 had an encapsulation efficiency greater than 90%, however at pH 4.5 they maintained a PDI less than 0.3.

The NPQS were efficiently coupled with anti-Clec9a-PE and CpGs.

The NPQS did not cause cytotoxicity in spleen cells at 24 hours but at 72 hours caused the decrease in cell viability.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Nanotecnología

En 1974 Norio Taniguchi introdujo el término nanotecnología, utilizando el prefijo “nano-” que deriva del griego *vávoç*-enano. Sin embargo fue en 1959 cuando el premio Nobel Richard Feynman introdujo el concepto de nanotecnología, que hoy en día se define como la creación y uso de estructuras, materiales, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones completamente novedosas obtenidas a partir de su tamaño que varía de 1 a 100nm, donde un nanómetro (nm) mide una billonésima parte de un metro [1].

En el 2017, la FDA implementó como definición de material nanométrico a todo aquel que presente propiedades químicas, físicas o biológicas atribuidas a su dimensión, sin importar que sea mayor a 100 nm pero que forzosamente sea menor a 1  $\mu\text{m}$  [2].

En los últimos años, la nanotecnología ha tenido diversas aplicaciones en el cuidado de la salud, dando lugar a una nueva rama llamada nanomedicina, que ha tenido un gran auge. Algunas de las aplicaciones de la nanomedicina tienen relación con el mejoramiento de los estudios de imagen, nuevos métodos diagnósticos y de manera importante en la liberación y entrega de fármacos [3].

Al respecto, los nanoacarreadores que son utilizados en nanomedicina para transportar y entregar fármacos de forma controlada pueden fabricarse en forma de nanotubos, nanofibras, nanogeles y nanopartículas [4]. El principal objetivo de los nanoacarreadores es tratar enfermedades causando los menores efectos tóxicos [5]. Esto es posible, ya que una de sus principales ventajas es que pueden ser funcionalizados al acoplarlos a diferentes ligandos para interactuar con las células y tejidos blanco y activar respuestas específicas. De esta manera se reduce la dosis utilizada, el número de dosis, disminuye la toxicidad de los fármacos y los efectos adversos y además se controla la liberación del fármaco [1].

El cuerpo humano presenta diversas barreras que el fármaco tiene que vencer para llegar a su sitio de acción, éstas incluyen la barrera inmunológica, el aclaramiento renal, la degradación mecánica y enzimática, el paso por los capilares y la matriz extracelular [4]. Las nanopartículas al ser modificadas en tamaño, geometría, elasticidad, rigidez, porosidad, composición y ligando blanco pueden vencer estos obstáculos y en la actualidad son las nanoestructuras más utilizadas en nanomedicina [5], [6]. Por ejemplo, se ha observado que menos del 0.01% de la dosis inyectada de anticuerpos para el tratamiento de enfermedades se acumula en la región deseada mientras que el 1 al 5% de la dosis llega al sitio deseado cuando se utilizan nanopartículas, por lo tanto estas últimas son capaces de aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad de los fármacos al mejorar la biodistribución [4]. Otra ventaja de las nanopartículas es la relación superficie/volumen que tienen, ya que se ha observado que una nanopartícula polimérica de 70 nm es capaz de contener 2,000 moléculas del fármaco, mientras que un compuesto de polímero/fármaco sólo es capaz de contener hasta 9 moléculas [7]. Esta eficacia de cargado es de suma importancia para lograr una terapia antitumoral efectiva.

### **3.2 Biomateriales utilizados en la fabricación de nanopartículas**

La Sociedad Europea de Biomateriales considera como biomaterial a todo material o combinación de materiales, con excepción de fármacos, que tengan un origen sintético o natural que por un período indeterminado se emplee como parte total o integral de un sistema para el tratamiento o reemplazo de cualquier tejido, órgano o función corporal. [8], [9].

Ya que forzosamente se encuentra en interacción con sistemas biológicos, se debe tener en cuenta que un biomaterial debe ser biocompatible, biofuncional, que mantenga la estabilidad mecánica y que pueda ser esterilizable [8], [9].

### **3.2.1 Clasificación de biomateriales**

#### **3.2.1.1 Biomateriales Inorgánicos**

##### ***Metales***

Los nanomateriales metálicos pueden ser fabricados de metales como oro, gadolinio y óxido de hierro. Una de las principales ventajas es que pueden convertir la luz en calor y por lo tanto pueden ser utilizados para la ablación de células blanco en el tratamiento contra tumores. También pueden ser utilizados para la entrega de fármacos, rastreo y detección de células y como agentes de contraste en resonancias magnéticas [10].

Las principales desventajas que se han reportado es que pueden llegar a ser tóxicos, carcinogénicos, y causar irritación de la piel, síndrome de argiria (producido por una exposición continua a la plata), nefrotoxicidad y neurotoxicidad [11].

##### ***Cerámicos***

Los nanomateriales cerámicos son materiales inorgánicos metálicos y no metálicos que se unen por medio de enlaces iónicos o covalentes y que necesitan de un tratamiento térmico para su fabricación. Incluyen la alúmina, zirconia, fosfato de calcio, carbonato de calcio, entre otros. Son frecuentemente utilizados en el campo ortopédico, odontológico y de cirugía plástica [12]. Son fáciles de fabricar y modificar con relación a su tamaño, forma y porosidad; no se ven afectados con los cambios de pH y temperatura, tienen alta resistencia mecánica y biocompatibilidad y su biodegradabilidad es baja o inexistente. Se ha buscado reducir su citotoxicidad en sistemas biológicos ya que se ha observado que causan daño en pulmones, hígado, corazón y cerebro [13].

#### **3.2.1.2 Biomateriales Orgánicos**

##### ***Lipoproteínas***

Las lipoproteínas son ensamblajes de proteínas y lípidos en nanoestructuras esféricas que se encargan del transporte de lípidos insolubles en la sangre. Contienen un núcleo apolar formado por colesterol y triglicéridos y una capa externa polar formada por fosfolípidos y apoproteínas. El principal objetivo de su uso como nanoacarreador es aprovecharlas como transportadores naturales en la circulación y entre sus principales ventajas incluye que son

totalmente biodegradables, biocompatibles y pueden permanecer de forma estable en la circulación sanguínea [14].

### ***Polímeros***

Los polímeros son macromoléculas formadas por cientos o miles de moléculas llamadas monómeros unidos por enlaces covalentes. Estos pueden estar formados por monómeros idénticos y ser llamados homopolímeros, o por 2 o más monómeros diferentes y ser llamados copolímeros. Al proceso por el cual se logra esto se le llama polimerización. Se pueden organizar de forma linear, cíclica, entrecruzada (red) o ramificada; y según su estructura pueden variar sus propiedades mecánicas y de biodegradabilidad [15], [16]. Son los materiales más usados en la fabricación de nanopartículas debido a que poseen las ventajas de tener una gran capacidad de penetrar los tejidos, la eficiencia de cargado es elevada, la liberación del fármaco es controlable y tienen una considerable protección contra la degradación enzimática [17].

Por su origen, se clasifican en sintéticos, semisintéticos y naturales. Los polímeros sintéticos son fabricados por el hombre en los laboratorios o en la industria. Tienen gran estabilidad química y mecánica, son altamente reproducibles, se pueden modificar fácilmente y sus propiedades pueden ser ajustadas según lo que se necesite. Su principal desventaja es que para su fabricación se usan condiciones extremas como temperaturas y pH no fisiológicos, solventes orgánicos potencialmente tóxicos para las células, aunado a que el mismo polímero puede ser tóxico, trombogénico y causar respuestas carcinogénicas [18]. Los principales polímeros sintéticos son la poliacrilamida, el poliuretano, el polimetilmetacrilato (PMMA), el polietilenglicol (PEG) y los poliésteres, los cuales incluyen el ácido poliláctico (PLA), el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y el ácido poliglicólico (PGA), de los cuales el más empleado en la fabricación de partículas es el PLGA debido a sus propiedades de liberación controlada y sostenida, alta biodegradabilidad, baja toxicidad y biocompatibilidad por lo que ha sido aprobado por la FDA y la EMA como acarreador de fármacos en humanos [19], [20].

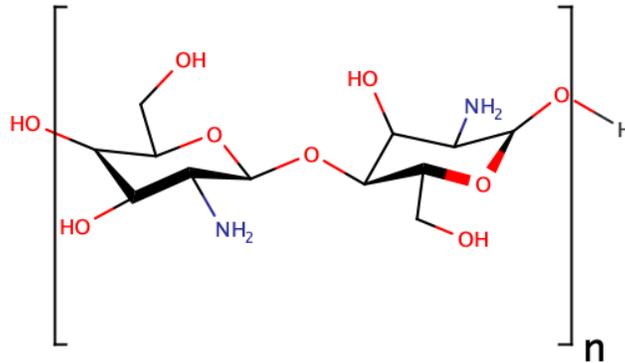
Los polímeros naturales son todos aquellos que provienen de la naturaleza, incluyen los polisacáridos como el almidón, el alginato, la quitina y derivados del ácido hialurónico; y las proteínas como el colágeno, la fibrina, la seda y la gelatina. En el ámbito médico sus

principales usos incluyen rellenos dérmicos, selladores de heridas, esponjas quirúrgicas y transportadores de fármacos. Sus principales ventajas son alta biocompatibilidad, mayor adhesión celular y regeneración de tejidos, entre otros [10], [21]. Se ha demostrado que cuentan con una gran eficacia terapéutica debido a que pueden permanecer en la circulación sanguínea por un tiempo prolongado y ser capturadas más fácilmente por las células blanco debido a los grupos funcionales reactivos de su superficie [22]. El colágeno y derivados de la membrana basal son altamente usados en el estudio del cáncer debido a que se encuentran de forma importante en el microambiente tumoral, aunado a esto, son capaces de proveer señales que promueven una citoarquitectura similar a la del tejido en el que son empleados. La principal desventaja de los polímeros naturales es que se tiene un control limitado sobre sus propiedades mecánicas como la rigidez y arquitectura del andamio, que muy frecuentemente es heterogénea [23].

Debido a que los polímeros sintéticos y naturales tienen sus limitaciones, se ha buscado fabricar polímeros que fusionen las propiedades de los polímeros naturales (como la biocompatibilidad) con la de los polímeros sintéticos (estabilidad mecánica y química, reproducibilidad). Esto se ha logrado por medio de la transformación de polímeros naturales a través de procesos químicos y se han llamado polímeros semisintéticos o híbridos, que han tenido gran éxito en la fabricación de partículas para entregar fármacos. Algunos ejemplos son el fibrinógeno pegilado, la nitrocelulosa, el quitosano y la etil-celulosa, entre otros [24].

### **3.3 Quitosano**

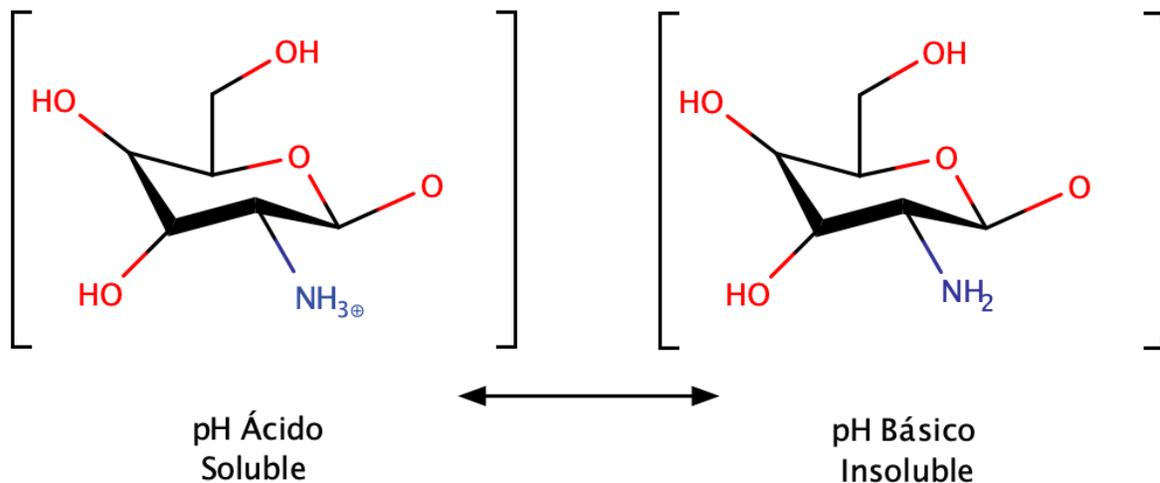
El quitosano es un copolímero lineal semisintético, no tóxico, biocompatible, biodegradable e hidrosoluble que puede encontrarse de forma natural en algunos hongos del género *Mucoraceae* [25] o puede ser derivado de la desacetilación de la quitina, que proviene de fuentes naturales como el exoesqueleto de los crustáceos e insectos y la pared celular de los hongos [26].



**Fig. 1. Estructura química del quitosano. Modificado de Li et al, 2013.**

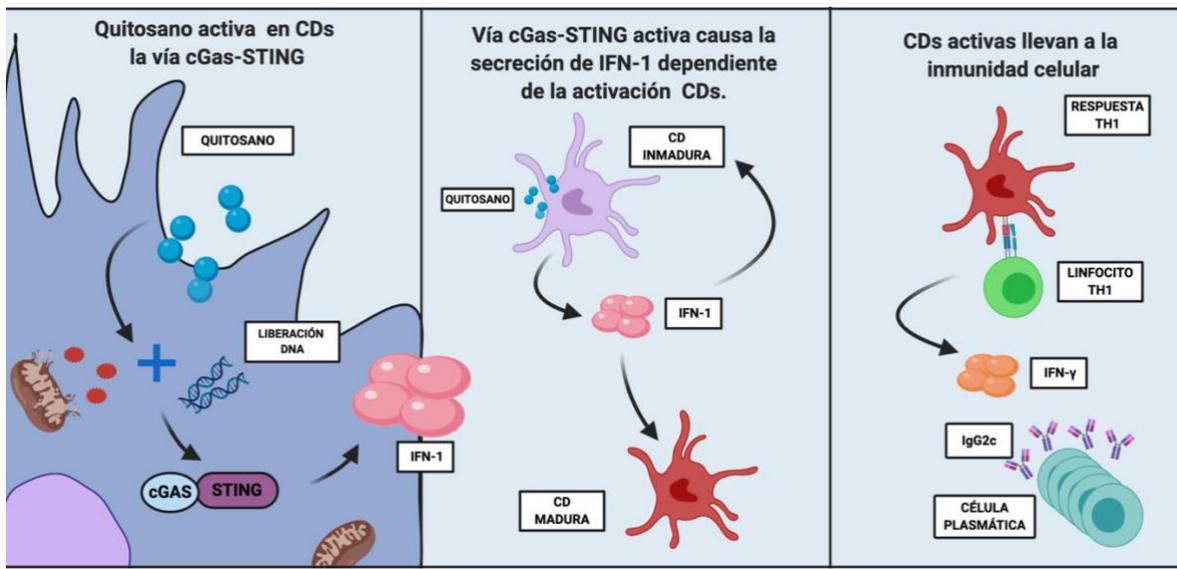
La quitina, después de la celulosa, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. Está compuesta por monómeros de N-acetil-D-glucosamina unidos entre sí por enlaces  $\beta$  (1,4). A pesar de que la quitina se encuentra de forma abundante y tiene propiedades como biocompatibilidad y biodegradabilidad, tiene como limitante que es altamente insoluble, por lo que se ha prestado más atención a su derivado el quitosano [27], [28].

La desacetilación termoquímica de la quitina consiste en el tratamiento de esta con álcalis a temperaturas por arriba de los 80°C obteniendo así el quitosano. Este último está compuesto por monómeros distribuidos de forma aleatoria unidos por enlaces  $\beta$ -(1-4) de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, los cuales están presentes en diferentes concentraciones según su nivel de desacetilación [29]. La presencia de monómeros de D-glucosamina es lo que le confiere solubilidad en medios acuosos ácidos ya que permite la protonación de la amina y por lo tanto convierte al polímero en catiónico, una propiedad poco común en los polímeros. Por lo general se alcanza la solubilidad cuando se tiene más del 50% de desacetilación [30]. Los usos del quitosano son directamente afectados por su grado de desacetilación y su peso molecular, ya que estos harán variar sus propiedades químicas y biológicas. Por ejemplo, con pH mayores a 6 las aminas del quitosano se desprotonan volviéndolo insoluble nuevamente [31].



**Fig. 2. Esquema de versatilidad del quitosano. A pH menor a 6 el quitosano es protonado por lo tanto se vuelve soluble. A pH mayor a 6, las aminas se desprotonan y el quitosano se vuelve insoluble. Modificado de M. Dash et al., 2011.**

Debido a sus características, el quitosano ha sido altamente utilizado en la industria alimenticia, agrícola, farmacéutica y ambiental [32]. Se ha demostrado que tiene propiedades antimicrobianas [33], hipocolesterolémicas [34] y mucoadhesivas [35] así como inmunoestimuladoras [36]. Bueter et al. en el 2011 demostraron que al ser fagocitado el quitosano es un potente activador del inflammasoma NLRP3, produciendo la liberación de IL-1 $\beta$  [37]. Posteriormente Carroll et al. (2016) demostraron que el quitosano es capaz de causar la maduración de las CD (células dendríticas) por medio de la vía cGAS-STING al inducir la secreción de IFN-I (interferón tipo I) y causar la polarización hacia una respuesta Th1 [38]. Ambos equipos comprobaron la capacidad del quitosano como adyuvante para la activación de la respuesta inmune y mostraron las ventajas de usarlo como nanoacarreador en inmunoterapia.



**Fig. 3. Efectos del quitosano en la célula dendrítica. Se observa el proceso por el cual se activa la vía cGas-STING y los efectos del quitosano en la célula dendrítica. Modificado de E. C. Carroll et al., 2016. Creado con BioRender.com**

### 3.4 Métodos de fabricación de nanopartículas de quitosano

#### 3.4.1 Gelación Ionotrópica

Esta técnica descrita por primera vez por Calvo et al, en 1997, se basa en aprovechar la interacción electrostática entre la carga positiva de las aminas protonadas del quitosano y la carga negativa de un polianión como el tripolifosfato de sodio (TPP). Consiste en disolver el quitosano en un medio acuoso ácido y posteriormente agregar el polianión bajo agitación magnética, causando así la formación de las nanopartículas. Las características como tamaño y superficie de carga pueden ser controladas al modificar el cociente molar del quitosano y el TPP [40], [41]. Sus principales ventajas son su bajo tiempo y costo de fabricación, ausencia de solventes orgánicos y uso de reactivos no tóxicos. Su principal y única desventaja es que tienen pobre fuerza mecánica [41].

### **3.4.2 Entrecruzamiento por emulsión**

Fue descrita por primera vez en 1994 por Ohya et al, y fue la primera técnica de fabricación de nanopartículas de quitosano. Consiste en utilizar la amina protonada del quitosano para entrecruzarse con los grupos aldehído del agente de reticulación que por lo general es glutaraldehído. Primero se prepara una emulsión de agua en aceite (W/O) donde el quitosano en una solución acuosa ácida es emulsionado en una solución oleosa. Para conseguir la estabilidad de la solución resultante, se agrega un surfactante y posteriormente se entrecruza con el glutaraldehído. Finalmente, las nanopartículas deben de ser lavadas múltiples veces con hexano para eliminar los restos de glutaraldehído [42], [43].

### **3.4.3 Micelización inversa**

Este método consiste en preparar microemulsiones de agua en aceite (W/O), para esto se usa un surfactante lipofílico como dioctil sulfosuccinato de sodio (AOT) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio disuelto en un solvente orgánico como el hexano. La fase acuosa está compuesta por el quitosano, el fármaco que se desea encapsular y un entrecruzante como el glutaraldehído. La solución acuosa se agregará a la solución orgánica en agitación constante para formar las nanopartículas. Finalmente se procederá a hacer la evaporación del solvente para quedarse sólo con las nanopartículas. Las principales ventajas son que se pueden obtener nanopartículas de 100 nm o menos y de forma más homogénea. Sin embargo, el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos y de glutaraldehído la hacen una técnica que puede causar toxicidad. Aunado a esto, el proceso de fabricación y de aislamiento de las nanopartículas puede ser complicado [44].

### **3.4.4 Spray-drying**

Llamada también técnica de atomización y secado, consiste en la atomización de la solución con el polímero y el fármaco que se desea encapsular en pequeñas gotas a través de un atomizador. Estas gotas serán llevadas por un gas de secado que ingresa al sistema a través de un calentador que al pasar por una cámara de secado se encargará de la evaporación del solvente para que finalmente sean recolectadas en el colector. Sus principales ventajas son que las nanopartículas pueden ser fácilmente fabricadas y con una

distribución de tamaño estrecha, también se puede escalar para obtener lotes grandes de nanopartículas [45].

### **3.4.5 Nanoprecipitación**

A este método también se le denomina “de desplazamiento del solvente”. Es una técnica rápida en donde las nanopartículas se forman espontáneamente. Consiste en disolver el polímero y el fármaco que se desea encapsular en acetona o etanol y verterlos en una solución acuosa que contenga el surfactante bajo agitación constante. Esto resultará en la precipitación de las nanopartículas. La principal desventaja es el proceso de separación de las fases [46]

### 3.5 Células Dendríticas

Las células dendríticas (CDs) son las principales células presentadoras de antígenos, se caracterizan por su morfología y expresión de marcadores específicos en su superficie celular [47] [48]. Son poblaciones de células encargadas de realizar el enlace entre la respuesta inmune innata y adaptativa, formando así una "red de respuesta inmunológica funcional". Es de notar que las células dendríticas son las únicas células que pueden activar a los linfocitos T naïve [49], [50].

#### 3.5.1 Origen de las Células Dendríticas

En la actualidad se sabe que las CDs se originan de precursores hematopoyéticos CD34+ que dan origen al progenitor mielóide común (CMP, common myeloid progenitor) y al progenitor linfóide común (CLP, common lymphoid progenitor) [51]. El CMP se diferencia en precursor de monocitos, macrófagos y CD (MDP, monocyte-dendritic cell progenitors) que a su vez da origen al precursor de CD (pre-CD), el cual puede diferenciarse en CD plasmocitoides (CDp) o en precursor de CD convencionales (pre-CDc), estas últimas terminarán de desarrollarse en la médula ósea para después salir al torrente sanguíneo y llegar a órganos blanco (órganos linfoides o tejido periférico) donde terminarán de desarrollarse y darán origen a las CDs convencionales (CDc) [52]. El CLP puede diferenciarse en CDp, aunque esta vía aún no es bien conocida. La diferenciación de CDp, ya sea proveniente de CMP o CLP, ocurre de manera completa en la médula ósea [53], [54].

Para que la diferenciación de las CD, su desarrollo y homeostasis se lleven a cabo, es necesario que diferentes citocinas de vital importancia estén presentes, principalmente FLT3-L (fms like tyrosine kinase 3 ligand), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) y linfotóxina beta [47], [48]. La más importante para este proceso es FLT3-L, la cual se expresa en la superficie celular y puede ser escindida proteolíticamente para que funcione como proteína soluble, ambas formas son biológicamente activas. Se ha observado que al aislar células troncales mieloides provenientes de médula ósea de ratón y cultivarlas *in vitro* con FLT3-L genera aumento del desarrollo de CD con mayor actividad y capacidad de presentación de

antígenos [55]. En ensayos *in vivo* se ha demostrado que su deficiencia causa disminución del número de CD derivadas de cualquiera de los 2 progenitores en bazo, ganglios y timo [56].

El GM-CSF es otra citocina de importancia, ya que se ha comprobado *in vitro* su capacidad de causar la diferenciación de células precursoras de médula ósea en CD, las cuales tienen gran capacidad de estimular a los linfocitos T [57].

### **3.5.2 Clasificación por fenotipo de CD**

Las CD se han clasificado de diversas formas, dependiendo su origen, localización y función. Antes las CD se diferenciaban por su morfología y adherencia a vidrio, pero con la innovación de nuevos anticuerpos se descubrió que las CD expresan elevados niveles de CD11c y MHCII, estableciéndose como los criterios para identificarlas. En la actualidad, con la descripción de nuevas moléculas por medio de anticuerpos y técnicas de secuenciación de ARN (scRNAseq, Single-cell RNA-seq) se han descubierto nuevos subtipos de CD [47].

Al salir de médula ósea y entrar al torrente sanguíneo, las CD pueden dirigirse a un tejido linfóide y permanecer ahí para terminar de desarrollarse y presentarle antígenos a los linfocitos T (CDs residentes) o pueden permanecer en torrente sanguíneo y vigilar en busca de antígenos para posteriormente migrar a órganos linfoides (ganglios linfáticos) y presentar los antígenos a linfocitos T (CDs migratorias). Ya sean CDs residentes o no residentes en órganos linfoides o no linfoides, cada tipo está compuesto por poblaciones de células dendríticas heterogéneas que pueden distinguirse por su perfil genético y la presencia de diferentes marcadores. La clasificación más utilizada las cataloga en 3 subtipos: clásicas o convencionales, plasmocitoides y derivadas de monocitos [54].

Las clásicas o convencionales (CDc) son CD que en su estado inmaduro tienen alta actividad fagocítica y al madurar son buenas presentadoras de antígenos y producen cantidades importantes de citocinas. Se subdividen en CDc1, las cuales pueden encontrarse en sangre, tejidos linfoides y tejidos no linfoides. Son una población muy rara de células que representa aproximadamente el 0.05% de las células mononucleares en

sangre periférica [55]. Son importantes debido a que son el principal tipo de células que pueden realizar la presentación cruzada de antígenos y por lo tanto activar linfocitos T CD8+. En ratones se caracterizan por presentar el fenotipo CD8 $\alpha$ + / CD103+, XCR1 y Clec9A y TLR9, mientras su contraparte en humano expresa BDCA-3 (CD141), Clec9A, XCR1 y la molécula de adhesión tipo 1 (CADM1), además de altos niveles de TLR3 y TLR10 [58].

El otro subtipo es CDc2 el cual se puede encontrar también en sangre, tejido linfoide y no linfoide. Es un subtipo con un fenotipo muy heterogéneo y recientemente se describió que se puede subdividir en CDc2A y CDc2B [51], [59]. Son el subtipo más abundante en sangre periférica y son potentes estimuladores de linfocitos T CD4+ naïves. Presentan en ratón CD11b, CD209a y SIRPa (CD172a); en humano son CD1c/BDCA-1, CD11c y SIRPa (CD172a); así como elevados niveles de TLR2, TLR4-6 y TLR9. Según su localización pueden presentar otros marcadores específicos [54], [60].

Las células dendríticas plasmocitoides (CDp) presentan el fenotipo CD11c, CD123+ BDCA-2, Siglec-H, TLR7 y TLR9 en humano y CD11c, B220, LY6C, Siglec-H, BST2 (bone marrow stromal antigen 2), TLR7 y TLR9 en ratón. Se caracterizan por producir grandes cantidades de interferón tipo I (IFN-I) y por consecuencia, promover respuestas antivirales. Recientemente se ha observado que también están implicadas en la patogenia de los procesos autoinflamatorios y autoinmunes, incluyendo el cáncer y enfermedades crónicas virales [61]. En su estado inmaduro carecen de las proyecciones citoplasmáticas representativas de las CDs, producen grandes cantidades de IFN-I y no son muy eficaces en la endocitosis y presentación de antígenos. Sin embargo, se ha observado que al ser activadas, especialmente por TLR7 y 9, se convierten en excelentes presentadoras de antígenos y su secreción de IFN-I es todavía mayor. Son importantes ya que son capaces de intervenir durante la respuesta inmune innata y adaptativa [62].

Las CD derivadas de monocitos (CDmo), también llamadas CD inflamatorias, son CD que se pensaba no existían en estado de reposo (inmaduras) y que sólo eran formadas después de un estímulo inflamatorio [51], [63]. Recientemente, se ha demostrado que se encuentran también en mucosas como intestino y piel sin presencia de inflamación [64]. Cuando los monocitos entran a un tejido, pueden diferenciarse en macrófagos derivados de monocitos (moMacs) o CDmo, aún se desconoce los factores exactos que se encargan de esta

decisión, pero en 2017, Goudout demostró *in vitro* que la diferenciación de CDmo y moMacs dependían de los factores de transcripción IRF4 y MAFFB, respectivamente [65]. Comparten características fenotípicas con las CDc pero difieren en que se pueden generar sin la presencia de FLT-3 o GM-CSF [56], [66]. Presentan un fenotipo MHC II+, CD11b+, CD11c+, CD64+, F4/80+, Ly6C+ por lo que es un reto diferenciarlas de los macrófagos. Se ha descrito que la mejor manera de diferenciar entre CD y macrófagos es a través de la expresión de FcεRI y CD64+ y por su habilidad de migrar de tejidos periféricos a ganglios linfáticos y activar a linfocitos T [64], [67].

### **3.5.3 Procesamiento de Antígenos**

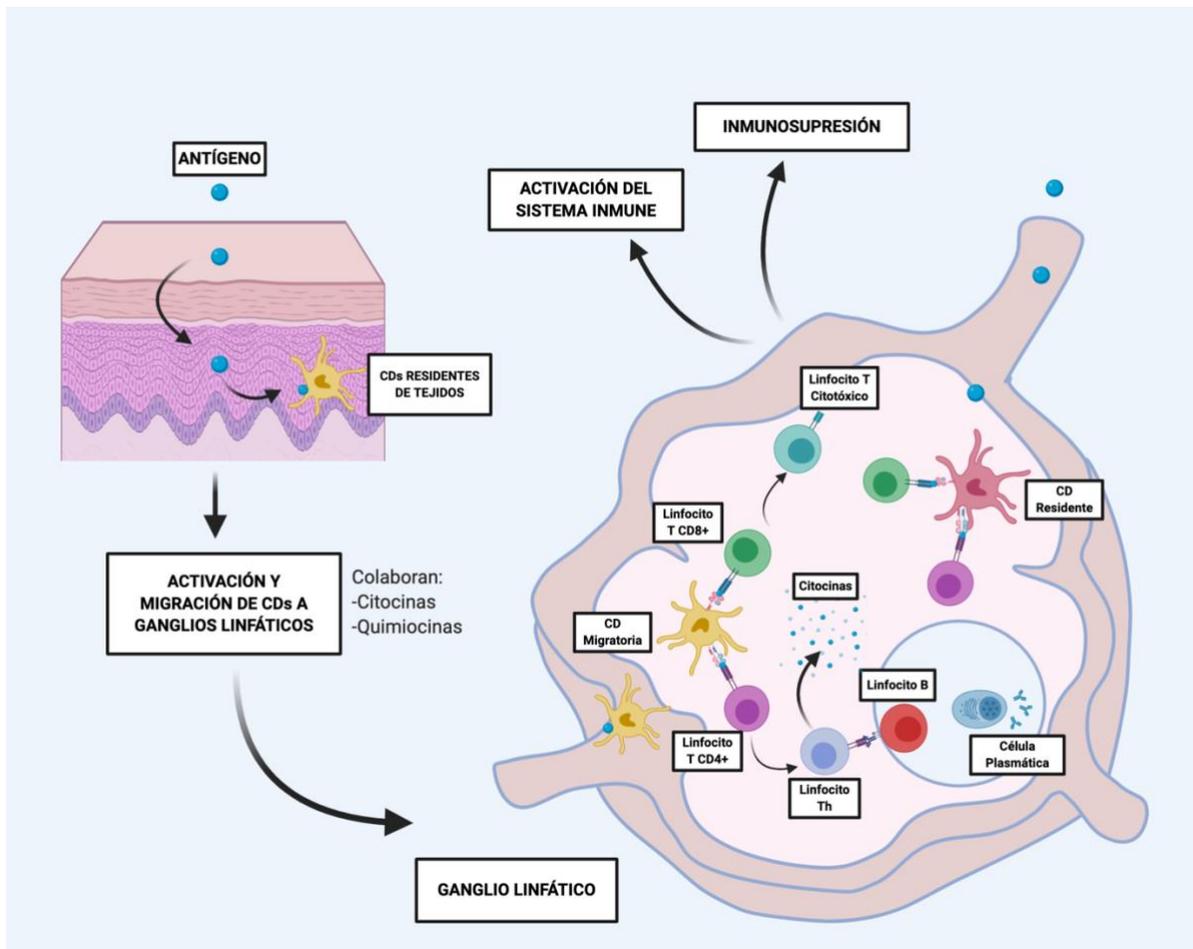
Las CDs son células especializadas en el procesamiento de antígenos y pueden presentarlos en un contexto de moléculas clase I y clase II (MHC-I y MHC-II), a diferencia de la mayoría de las células que sólo pueden presentar antígenos intracelulares generados en el citosol por medio de moléculas clase I (vía endógena) y activar específicamente a linfocitos T CD8+, razón por la cual a las CD, macrófagos y linfocitos B, se les conoce como células presentadoras de antígenos (APCs, antigen presenting cells). Las CDs son consideradas las APCs más importantes debido a que son capaces de activar a linfocitos T naïve [50], [68], [69].

El proceso de maduración de las CDs depende principalmente del ambiente en el que se encuentran, por lo que resultan subtipos de CDs con funciones diferentes y específicas [70]. En ausencia de un estímulo, las CDs se encuentran en un estado inactivo o inmaduro (CDi), que se caracteriza por la presencia de niveles bajos de moléculas clase II (MHC-II) y moléculas coestimuladoras, como CD80, CD86, CD40, gran capacidad de endocitar y procesar antígenos y baja capacidad de secretar citocinas [71]. Las CDi continuamente se encuentran endocitando antígenos y por lo tanto frecuentemente presentan antígenos propios, que junto con moléculas como CTLA4 (CD152), CD273 (PD-L1) y CD274 (PD-L2) y la falta de moléculas coestimuladoras, causan anergia o un fenotipo inmunosupresor en los linfocitos T, manteniendo así la inmunotolerancia y evitando una respuesta inmune contra el huésped [72].

Las CDi pueden detectar antígenos en el ambiente que las rodea por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, pattern recognition receptors), estos incluyen receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo Nod (NLRs), receptores tipo RIG (Retinoic acid-inducible gene), lectinas tipo C (CLRs), receptores scavenger, entre otros. Su principal función es reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, liberados por células “moribundas”) y posteriormente generar señales que activen al sistema inmune. Entre los más estudiados se encuentran los TLRs. En la actualidad se han descrito 10 tipos de TLRs y 3 pseudogenes (TLR-11, TLR-12 y TLR-13). Los TLRs pueden ser expresados en la membrana celular (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 y TLR-10) o en vesículas intracelulares como endosomas de las células inmunes y epiteliales (TLR-3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9) [73]. Cuando se unen PAMPs o DAMPs, a los TLRs se inicia una cascada de señalización que culmina con la secreción de IFN-I y diversas citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF $\alpha$  [74]. En particular, TLR-9 se ha encontrado principalmente en linfocitos B, DCc y CDp en ratón y en CDp en humano, reconoce CpGs (cytidine-phosphate-guanosine) que son regiones de DNA presentes frecuentemente en bacterias y virus, pero rara vez en mamíferos. La unión de TLR-9 con su ligando, induce una secreción inmediata de IFN-I y TNF $\alpha$  así como el aumento de la expresión de CD40 en las CD [75].

Una vez que los antígenos exógenos son reconocidos y endocitados, son procesados por una vía lisosomal y endosomal (vía exógena) en la que quedarán degradados a péptidos, los cuales serán capaces de asociarse a moléculas clase 2 (MHC-II) y migrar a la superficie celular para que puedan ser reconocidos por linfocitos T CD4+, a este proceso se le conoce como maduración o activación de la DC [68].

Durante el proceso de maduración, la CD migra a los ganglios linfáticos drenantes y al mismo tiempo, va sufriendo diferentes cambios como la disminución de su capacidad endocítica, el aumento importante de la expresión de moléculas clase I y II (MHC-I, MHC-II), moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40, moléculas de adhesión (ICAM1 y 2), quimiocinas como CCR7 (que dirige la migración a la paracorteza de los ganglios linfáticos) y la secreción de citocinas como IL-12, IL-6, IL-1 [72].



**Fig. 4. Procesamiento de antígenos por la célula dendrítica. Modificado de Chistiakov et al., 2015. Creado con BioRender.com.**

### 3.5.4 Presentación de antígenos

Una vez que las CDs arriban al ganglio linfático, éstas son capaces de activar a los linfocitos T naïve CD8+ o CD4+. Actualmente se sabe que para que la activación de los linfocitos T sea exitosa y estos se conviertan en linfocitos T efectores se necesita 3 señales, ayudando así a evitar la activación de linfocitos autorreactivos. La primera señal esta dada por la interacción del complejo antígeno/MHC I o II en las CDs con el complejo TCR/CD3 en el linfocito T naïve, a este proceso se le llama sinapsis inmunológica [76]. El linfocito T, por medio de su TCR, es capaz de reconocer antígenos extraños (no-propios) y al reconocerlos

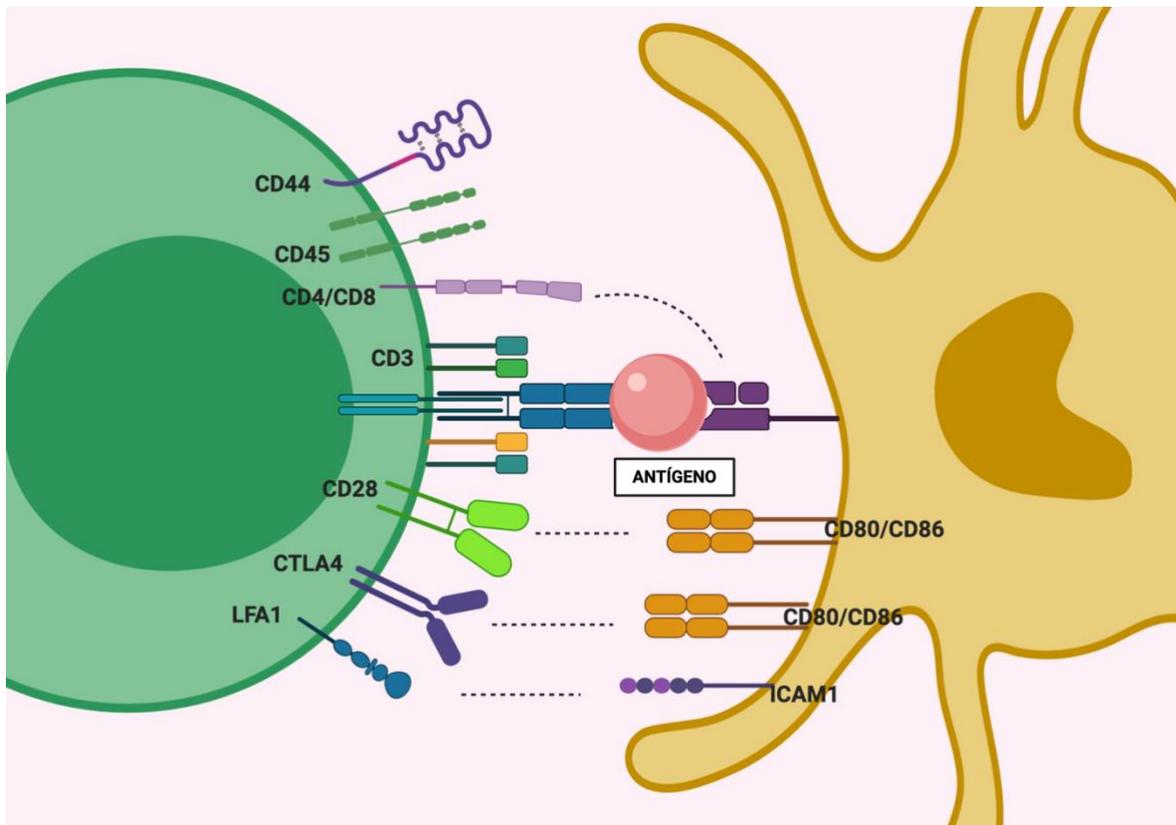
se inicia una cascada de señalización que termina con la activación de factores de transcripción involucrados en su activación [77]. Este paso es sumamente importante y necesario, sin embargo, sólo genera una respuesta de incompleta y corta duración que es insuficiente para que haya activación, proliferación y diferenciación celular. Si no está presente una segunda señal, el linfocito T puede entrar en anergia o muerte celular [78].

La segunda señal está dada por moléculas coestimuladoras que proveen de señales que fomentan la división celular, aumentan la supervivencia celular e inducen la secreción de citosinas. Las moléculas coestimuladoras CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) son las encargadas de la activación y proliferación de linfocitos y se expresan en la superficie de las APCs; mientras que su ligando CD28, está presente en los linfocitos T [78].

Existe otro ligando para CD80 y CD86 en los linfocitos T llamado CTLA-4, el cual tiene una afinidad 100 veces mayor que CD28 por CD80 y su principal función es la de restringir la activación de linfocitos T autorreactivos así como mantener la homeostasis post-activación, también se ha visto que tiene un efecto inhibitorio en las CDs [79].

Por su parte, CD40 es una proteína que pertenece a la súper familia TNFR (tumor necrosis factor receptor) y está presente en APCs, células epiteliales y endoteliales. Su ligando es CD40L (CD154) y se puede expresar transitoriamente en linfocitos T activados y otras células no inmunes durante eventos de inflamación [80]. La unión con su ligando induce una cascada de señalización en la DC que culmina con el aumento de la secreción de citocinas (IL-12p40, IL-8, IL-6 y TNF- $\alpha$ ), expresión de moléculas coestimuladoras y de proteínas anti-apoptóticas, así como otros marcadores de maduración; también promueve la presentación cruzada de antígenos y se ha demostrado que puede hacer sinergia con TLR-9 y aumentar la producción de IFN-I en las CDp [81], [82].

La tercera señal está dada por factores solubles o unidos a la membrana celular como citocinas (IL-1, IL-6, IL-12 IFN-I, entre otras) o quimiocinas (CCL2) y se encarga de estimular la expansión y diferenciación de los linfocitos T activados. La polarización de los linfocitos T dependerá del microambiente en el que se encuentra la célula al momento de su activación [83], [84].



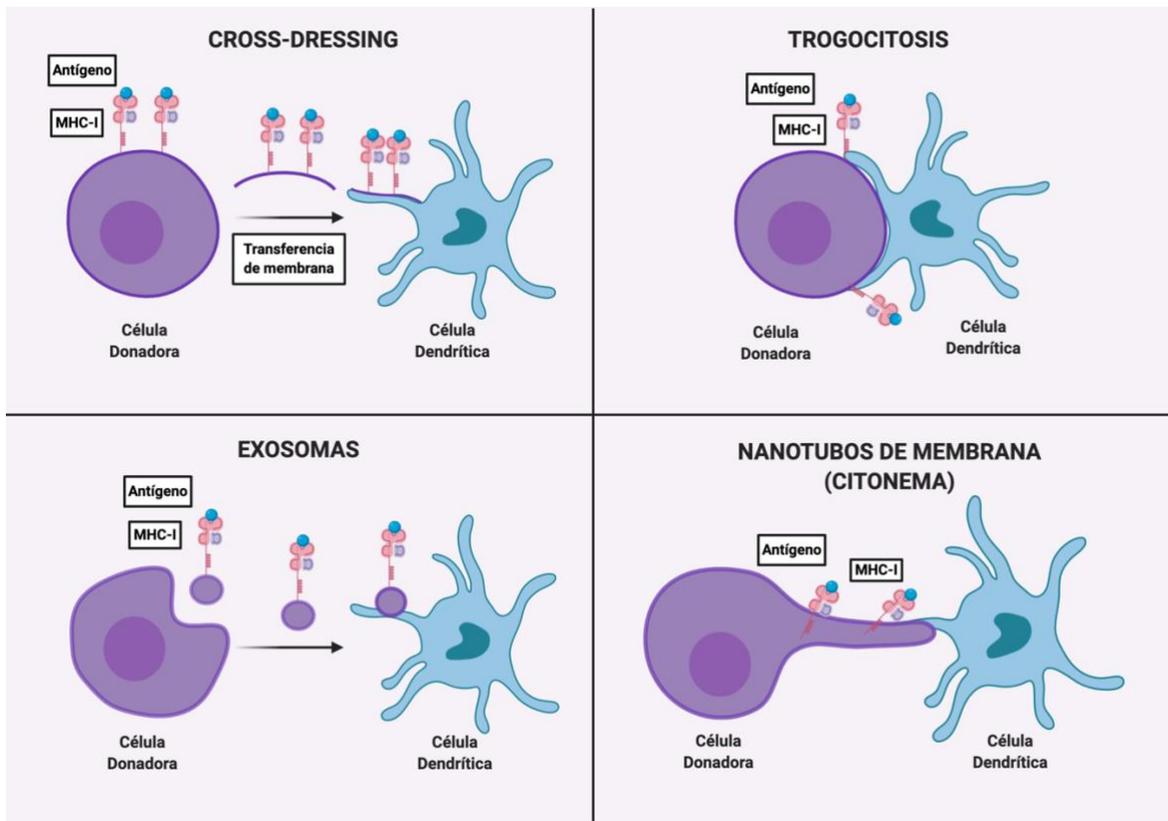
**Fig. 5. Sinapsis inmunológica. Modificada de Huppa et al., 2003. Creado con BioRender.com.**

### 3.5.5 Presentación cruzada de antígenos

Como se comentó anteriormente, se sabe que gran parte de las células nucleadas son capaces de presentar péptidos internos (generados por ellas mismas) asociados a moléculas clase I (MHC-I) para reportar daño intracelular y por lo tanto activar a las células NK (Natural Killers) o linfocitos T CD8<sup>+</sup> para que lleven a cabo su acción citotóxica contra éstas [85]. Las CDs (entre otras células) son capaces de llevar a cabo un proceso por el cual pueden presentar antígenos extracelulares en moléculas clase I (MHC-I). Este proceso es de suma importancia para la generación de una respuesta inmune contra virus y tumores y es llamado presentación cruzada de antígenos [86].

Se han aceptado diferentes mecanismos por los cuales la presentación cruzada se lleva a cabo, los más estudiados son la vía citosólica y la vía vacuolar. La vía citosólica se encarga de transportar antígenos extracelulares de endosomas al citosol para que posteriormente sean procesados en el proteasoma y continúen por la vía endógena para terminar cargados en moléculas clase I (MHC-I). La vía vacuolar es independiente del proteasoma y los antígenos extracelulares son degradados directamente en vacuolas o endosomas por proteasas lisosomales y ahí mismo son cargados en moléculas clase I (MHC-I) [87], [88].

Otro mecanismo por el cual se ha demostrado que se lleva a cabo la presentación cruzada de antígenos es el cross-dressing. Es un proceso uni o bidireccional por el cual una célula donadora es capaz de transferir complejos antígeno/MHC funcionales a una célula receptora. Éste a su vez incluye diferentes mecanismos de transferencia como la trogocitosis, que consiste en la transferencia de fragmentos de membrana a través de contacto célula-célula, lo cual permite a su vez transferir moléculas de superficie a otras células. Otro mecanismo es la captación de exosomas, que son pequeñas vesículas de membrana secretadas por una célula y que pueden contener diferentes proteínas. Una célula receptora puede capturarlos e internalizarlos o fundirlos con su membrana plasmática. Recientemente, se ha descrito un mecanismo que consiste en la formación de largas protrusiones de la membrana (se han observado longitudes de hasta 100 $\mu$ m) llamados nanotubos o citonemas, los cuales al conectar con otra célula, pueden hacer un intercambio de moléculas de superficie y contenido citoplasmático [89].



**Fig. 6. Mecanismos alternos de presentación de antígenos. Modificada de Campana et al., 2015. Creado con BioRender.com.**

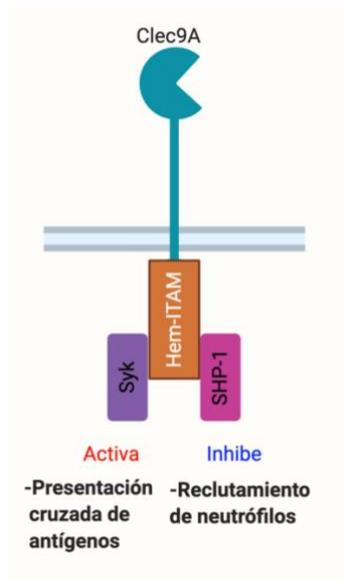
### 3.5.6 Células Dendríticas CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>

Las CDs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> de ratón y las BDCA3<sup>+</sup> presentes en humano, son el principal subtipo productor de IL-12, así como el principal encargado de realizar la presentación cruzada de antígenos y por lo tanto son capaces de activar una respuesta anti-tumoral en linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Se encuentran principalmente en órganos linfoides [90], [58].

Las CDs CD8 $\alpha$  son llamadas así debido a que expresan un homodímero CD8 $\alpha\alpha$ , (las células T CD8 expresan un heterodímero CD8 $\alpha\beta$ ). Sin embargo, actualmente no se considera tan adecuado identificar a este subtipo de células sólo por su marcador CD8 $\alpha\alpha$  debido a que este aparece de forma tardía en el desarrollo de las CDs, por lo que no todas

las CDs de este subtipo lo presentan y sólo está presente en CD de ratón y no en muchas otras especies, incluyendo al humano [91]. Recientemente se ha encontrado el marcador Clec9A o DNGR-1 de forma casi exclusiva en las CDs CD8 $\alpha$ , haciéndolo un probable blanco para la identificación de estas [92].

Clec9A es un receptor de lectina tipo C que se expresa en la superficie celular como un dímero y media la endocitosis. Su principal función es el reconocimiento de células muertas por medio de fragmentos de F-actina expuestas por estas. Recientemente ha habido un auge en su estudio debido a que se ha observado que si bien no tiene un efecto activador en la CD, al activarse Clec9A y por lo tanto activar sus vías de señalización, fomenta la presentación cruzada de antígenos de una forma pH-dependiente (mecanismo aún desconocido) [93]. Aunado a esto, en el 2018, del Fresno et al, demostraron que Clec9A limita el reclutamiento de neutrófilos en el sitio afectado, reduciendo así el daño por la inflamación [94].



**Fig. 7. Estructura Clec9A. Modificada de Tone et al., 2019. Creado con BioRender.com.**

Debido a todas las características antes mencionadas, las CD CD8  $\alpha^+$  se han vuelto un blanco importante en diversas terapias inmunes, especialmente en las creadas para combatir el cáncer. El mayor problema para evaluar este tipo de células *in vitro* es la falta de técnicas eficientes para su aislamiento, ya que es una población muy escasa en el organismo. Se ha intentado diferenciar directamente de CDs provenientes de médula ósea utilizando la citocina FLT3, pero se necesitan grandes cantidades de esta molécula para lograrlo en una pequeña población de células, por lo que la vuelve una técnica muy costosa [95].

### **3.6 Respuesta inmune en cáncer**

Aunque durante mucho tiempo fue un tema controversial y discutido, en las últimas décadas se ha establecido la participación del sistema inmune en el cáncer, y se ha planteado tanto el papel negativo como el positivo en el desarrollo del tumor. Con respecto al rol antitumoral, hay un proceso denominado “inmunoedición del cáncer” a través del cual el sistema inmune puede prevenir, controlar o promover el desarrollo del tumor. Se compone de 3 fases: eliminación, equilibrio y escape, esta última se considera como uno de los “Hallmarks del cáncer” [96].

#### ***Eliminación***

También conocida como inmunovigilancia del cáncer, es la fase en la cual las células del sistema inmune innato y adaptativo trabajan en conjunto para reconocer y eliminar a las células tumorales antes de que el tumor sea clínicamente detectable [97]. Las señales que estimulan a la respuesta inmune comprenden desde la presencia de DAMPs y citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  presente en el microambiente tumoral hasta el reconocimiento de ligandos inducidos por estrés en la superficie de las células tumorales. Esto causa el reclutamiento de células de la respuesta inmune innata como NKs, linfocitos NKTs, eosinófilos, macrófagos y células dendríticas, las cuales a su vez aumentarán la secreción de citocinas y la muerte de las células tumorales generando así una mayor respuesta proinflamatoria. El microambiente tumoral proinflamatorio junto con la endocitosis

de los restos de las células tumorales por las células dendríticas provocan que estas últimas se activen y migren a los ganglios regionales donde a su vez activan a los linfocitos T CD4+ y CD8+ que a continuación se desplazan al tumor para identificar a las células tumorales y eliminarlas. Al mismo tiempo, producen más citocinas que ayudan a mantener el microambiente tumoral proinflamatorio con el propósito de continuar amplificando la respuesta antitumoral. En muchas ocasiones esto será suficiente para eliminar al tumor, pero debido a que la tasa de proliferación de las células tumorales es muy elevada, puede rebasar la capacidad del sistema inmune de eliminarlas y el tumor se mantiene o crece [98], [99].

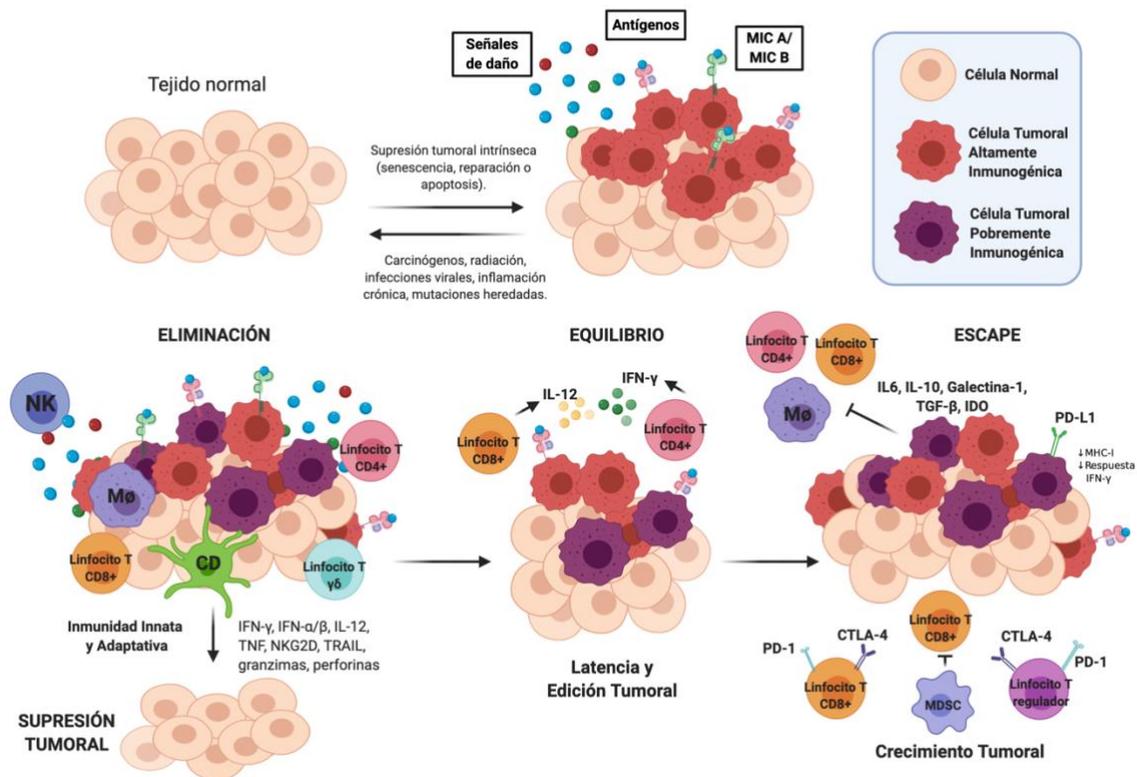
### ***Equilibrio***

El sistema inmune del individuo y las células tumorales se encuentran en un equilibrio dinámico, donde la respuesta inmune puede contener el desarrollo del tumor, sin embargo, no es una respuesta suficiente para eliminarlo por completo, por lo que el tumor permanece en un estado de latencia. Esto causa que el sistema inmune, más específicamente, los linfocitos T generen una presión selectiva sobre las células tumorales para eliminarlas, lo que puede producir dos respuestas diferentes: la erradicación de tumor o la selección de clonas tumorales con mayor cantidad de mutaciones inmunoevasivas que permitirán el desarrollo del tumor hacia una fase de escape. Esta fase es la más duradera ya que podrían pasar décadas antes de que se avance a la siguiente [100].

### ***Escape***

Esta fase puede iniciar por diferentes mecanismos, ya sea directamente a nivel de la célula tumoral o a través de su microambiente. A nivel celular, los antígenos y las moléculas de clase I (MHC-I) se pierden, ya sea por inestabilidad genética o por la presión selectiva generada por el sistema inmune. Esto permite la sobrevivencia de células pobremente inmunogénicas y provoca que no puedan ser reconocidas por los linfocitos. Por otro lado, el microambiente se torna inmunosupresor debido a que las células tumorales secretan citocinas como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), indolamina 2-3 deoxigenasa (IDO) y galectina; causando el reclutamiento y diferenciación de células reguladoras como linfocitos T reguladores (Treg)

y células mieloides supresoras (MDSCs). Los linfocitos Treg son capaces de inhibir la función de la respuesta antitumoral de los linfocitos T al secretar citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF $\beta$  y al expresar en su superficie moléculas como CTLA-4, PD-1 y PD-L1. Por su parte, las MDSCs inducen la diferenciación de linfocitos Treg, depletan de los aminoácidos necesarios para la función de linfocitos T, secretan TGF $\beta$ , entre otras cosas. En conjunto estos mecanismos permitirán el desarrollo y crecimiento del tumor, llevándolo a una fase clínica [101].



**Fig. 8. Inmunoección del cáncer. Modificada de Budde et al., 2017. Creado con BioRender.com.**

### 3.7 Antígenos tumorales usados en Inmunoterapia

Actualmente los antígenos tumorales son clasificados en 3 categorías, antígenos cáncer/testis (CTA), antígenos asociados a tumor (TAA) y antígenos tumorales específicos

(TSA). Los CTAs son antígenos que bajo circunstancias de normalidad son expresados en células germinales como testículos, ovarios fetales y trofoblastos; sin embargo, también se encuentran expresados en diferentes tipos de cáncer. Algunos ejemplos son MAGE, GAGE, BAGE, NY-ESO-1, CAGE, entre otros [102]. Los TAAs son antígenos propios expresados por las células tumorales, por lo que son considerados de baja especificidad tumoral. Se pueden clasificar en antígenos sobreexpresados, donde la expresión de estos en células tumorales es mayor que en células normales (p53 y el receptor del factor de crecimiento epidermal, EGFR); antígenos de diferenciación, los cuales son específicos de un linaje celular como los antígenos derivados de la diferenciación de melanocitos los cuales están presentes en la mayoría de los melanoma (gp100, tirosinasa, etc) [103].

Los TSAs son antígenos expresados exclusivamente en células tumorales por lo que son considerados de alta especificidad tumoral; estos pueden ser proteínas virales oncogénicas o proteínas nuevas que se originan a partir de mutaciones (neoantígenos). Al no ser expresados en tejidos normales, estos son altamente inmunogénicos, presentan mayor afinidad por las moléculas MHC, no se ven afectados por la tolerancia inmunológica central y el riesgo de autoinmunidad es mínimo. Actualmente mediante la secuenciación genómica y el uso de algoritmos bioinformáticos se ha buscado predecir, identificar y localizar los diferentes neoantígenos presentes en un tumor ya que al ser altamente específicos se vuelven un blanco atractivo para la creación de tratamientos personalizados con inmunoterapia [104], [105]. En el 2017, Sahin et al. secuenciaron tumores de pacientes con melanoma en estadio III o IV y desarrollaron vacunas a partir de la predicción e identificación de neo-epítomos, creando una vacuna individualizada para cada paciente. Demostraron que todos los pacientes desarrollaron respuestas de linfocitos T contra los neo-epítomos, que la tasa de eventos metastásicos disminuyó significativamente y aumentó la supervivencia libre de enfermedad [106].

A pesar de los grandes avances que se ha tenido en el estudio de antígenos tumorales en la última década, es de notar que algunos de los mayores retos es la inadecuada entrega de antígenos hacia las CD y la estimulación limitada de linfocitos T que puede causar una respuesta inmune antitumoral incompleta del tratamiento debido a la continua y rápida renovación de las moléculas clase I en las células tumorales y a que el tumor presenta una población heterogénea y solamente se eliminan algunos grupos de clones, reflejándose en

una pobre respuesta clínica que se detecta solamente en pocos pacientes. Recientemente, se ha mostrado que el utilizar lisados tumorales es una mejor estrategia experimental y clínica, ya que ofrece una fuente de antígenos tumorales conocidos y desconocidos más amplia que puede prevenir el escape inmunológico y es capaz de inducir la activación policlonal de linfocitos T helper CD4+ y CD8+ citotóxicos de forma simultánea al poder ser presentados por medio de moléculas clase I y clase II. La principal desventaja del uso de lisados tumorales es que contienen antígenos y citocinas que son inestables y pobremente internalizadas por las CDs por lo que se ha sugerido el encapsulamiento de estos para aumentar la inmunogenicidad y eficacia de estas terapias [107] [108].

### **3.8 Inmunoterapia con nanopartículas**

A pesar de los grandes avances que se han tenido en la investigación del papel que juega el sistema inmune en el cáncer y los diversos tratamientos que se han desarrollado a partir de esto, aún hay varios obstáculos a vencer. Uno de los principales inconvenientes es que presentan un limitado índice terapéutico (dosis tóxica/dosis efectiva), ya que frecuentemente se necesitan altas dosis del tratamiento para causar un efecto, lo cual puede llevar a efectos adversos como tormenta de citocinas, tolerancia inmunológica, neumonitis, colitis y alteraciones autoinmunes; aunado a esto, estos tratamientos pueden ser de muy alto costo. Para superar estos inconvenientes se ha propuesto mejorar la forma en la que se administran estas terapias, por ejemplo, encapsulando o acoplando fármacos citotóxicos, citocinas, antígenos tumorales, adyuvantes, etc. en la superficie de nanopartículas [109], [110].

Existen diversos tipos de nanopartículas, estas incluyen nanopartículas poliméricas, liposomas, nanopartículas metálicas, micelas, dendrímeros, nanopartículas termosensibles, etc. las cuales actúan mejorando la respuesta inmune debido a sus características especiales como tamaño, forma, carga y capacidad de funcionar como acarreador permitiendo el uso de menores dosis, una liberación más controlada de los agentes terapéuticos y una mejor biodistribución a sitios específicos. En ocasiones se puede acoplar un ligando a la superficie de las nanopartículas para dirigirlas selectivamente a un receptor específico de una célula blanco [111]. El principal objetivo del uso de nanopartículas en

inmunoterapia es mejorar la administración de antígenos y adyuvantes a CDs, de inmunomoduladores en el microambiente tumoral y de inhibidores de puntos de control [112].

Las nanopartículas presentan diversas propiedades fisicoquímicas que permiten la protección de los antígenos y adyuvantes contra la degradación enzimática y promueven una mejor captación e internalización celular de estos por las CDs, mejorando así la inmunogenicidad y modulando la actividad de las células inmunes. Se ha demostrado que el tamaño de nanopartícula influye en la dirección que tomará; nanopartículas con un tamaño  $<200\text{nm}$  son capaces de difundirse por los vasos linfáticos y llegar directamente a los ganglios linfáticos donde pueden activar a las CDs residentes, en cambio las nanopartículas con un tamaño  $>500\text{nm}$  generalmente permanecen en el sitio de inyección y tienen que esperar a ser internalizadas por las CDs de la periferia para poder ser transportadas a tejidos linfoides [113].

Junto con el tamaño, la forma también se ha demostrado que influye de forma importante y recientemente se han desarrollado nanopartículas con forma de cubos, prismas, estrellas y discos, demostrando mayor tiempo de circulación y mejor penetración en tumores y tejidos sólidos en comparación con las nanopartículas esféricas [114]. Otra característica importante es la carga superficial que presentan las nanopartículas, se ha observado que las nanopartículas catiónicas son endocitadas más rápidamente por las CDs y macrófagos y se encuentran en la zona perinuclear de la células, mientras que las nanopartículas con carga neutra o negativa, se alojan más comúnmente en los lisosomas. Sin embargo las nanopartículas catiónicas son propensas a unirse a proteínas presentes en el suero y componentes de la matriz extracelular con carga negativa lo cual las hace poco permeables a tejidos tumorales [115].

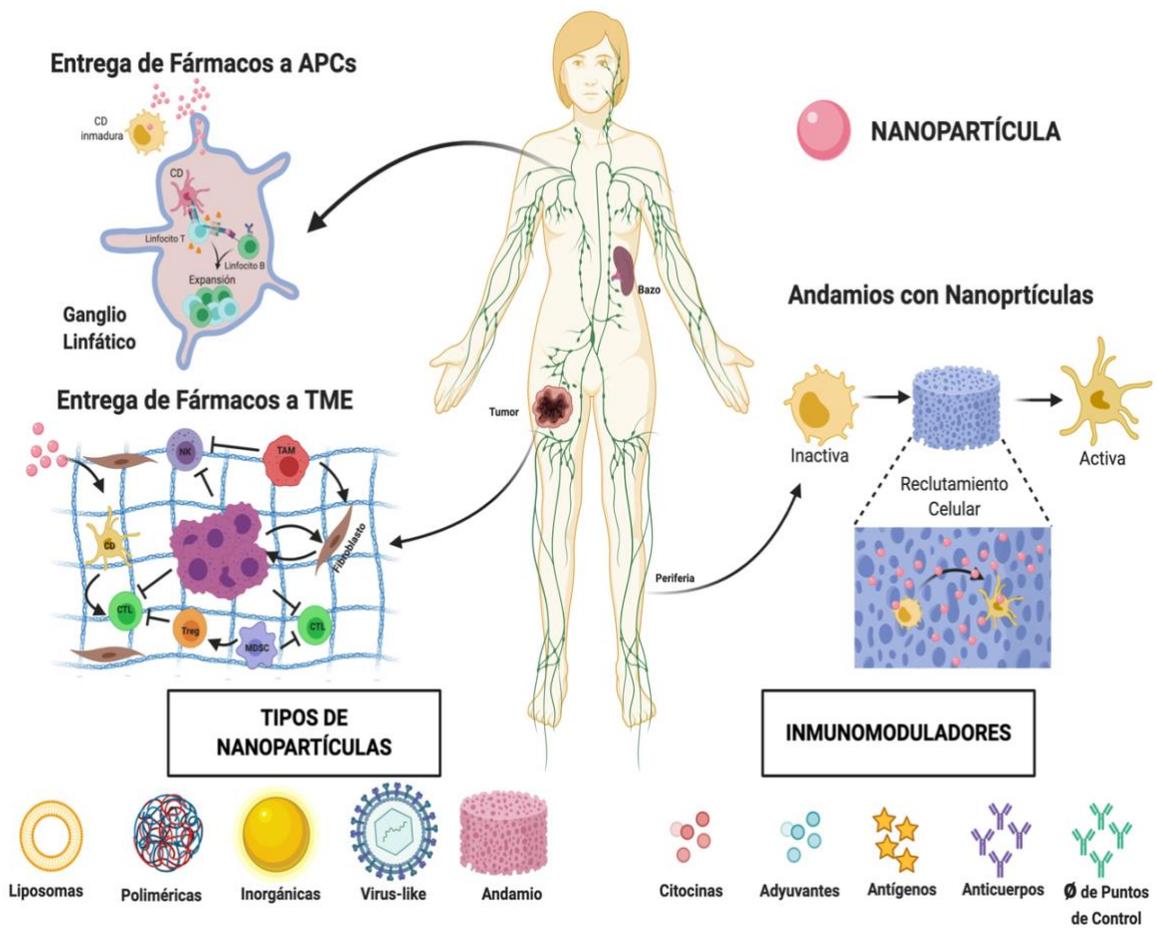
Recientemente se ha buscado modificar la superficie de nanopartículas para mejorar la orientación hacia las CDs y así aumentar la administración de antígenos al sitio deseado. Kwong et al. en el 2011 fabricaron liposomas pegilados de  $80\text{nm}$  de diámetro acoplados a anti-CD40 y CpGs, los cuales fueron administrados de forma intratumoral en ratones con melanoma B16-F10, observando una reducción significativa del tamaño del tumor y aumento en la supervivencia, así como una mayor concentración de las moléculas

administradas en el sitio del tumor comparado con el control, donde se observó gran porcentaje en circulación [116].

Como se explicó anteriormente, los tumores son capaces de crear un microambiente inmunosupresivo que promueva su desarrollo y metástasis, es por esto que es importante buscar estrategias que contrarresten y modulen el microambiente tumoral (TME). Aparte de las células tumorales, las principales células presentes en el TME son los macrófagos asociados a tumor (TAMs) y los linfocitos T reguladores, ambos son capaces de producir grandes cantidades de citocinas inmunorreguladoras como TGF- $\beta$  e IL-10, por lo que se han desarrollado tratamientos que buscan la inhibición de estas citocinas [117].

Evidencia de la participación de citocinas y de la acción efectiva al utilizarlas como blanco de nanopartículas es el trabajo de Xu et al., (2014), quienes desarrollaron nanopartículas de fosfato de calcio y lípidos cargadas con CpGs y el antígeno tumoral Trp2 y nanopartículas de ácido hialurónico y protamina cubiertas con liposomas catiónicos en donde encapsularon ARN pequeño de interferencia (siRNA) contra TGF- $\beta$ , las cuales administraron en conjunto en un modelo murino de melanoma B16-F10 en donde observaron inhibición significativa del crecimiento del tumor, un aumento del infiltrado de linfocitos T CD8+ citotóxico y disminución de los linfocitos T reguladores en el TME [117].

Actualmente se ha demostrado que el uso de inhibidores de puntos de control inmunitarios ha tenido importantes resultados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. La función de los linfocitos T puede estar inhibida por CTLA-4 o PD1/PD-L1 por lo que recientemente se han fabricado anticuerpos capaces de bloquearlos, aunque han sido efectivos en algunos casos, se continua explorando mejores formas de administración ya que se busca que los efectos puedan ser generados a nivel intratumoral y no a nivel sistémico, es por esto que en el 2016, Li et al. fabricaron nanopartículas cargadas con siRNA contra CTLA-4 y las probaron en un modelo murino de melanoma B16-F10 demostrando que las nanopartículas eran capaces de bloquear a CTLA-4 en linfocitos T CD4+ y CD8+ en el sitio tumoral, así como aumentar el infiltrado de linfocitos T CD8+ citotóxicos y disminuir los linfocitos T reguladores, resultando en una mejor activación del sistema inmune [118].



**Fig. 9. Uso de nanopartículas en inmunoterapia. Modificada de Wang et al., 2017. Creado con BioRender.com.**

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad el cáncer continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, causando más de 9.6 millones de muertes al año. Aunque los tratamientos existentes como la radioterapia, quimioterapia y cirugía, son altamente exitosos en etapas tempranas de la enfermedad, no se han logrado crear terapias efectivas para los pacientes en etapas avanzadas. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas médicas como la inmunoterapia, que se basa en la activación del sistema inmune para reconocer y eliminar al tumor. Con el fin de mejorar su efectividad, se han empleado estrategias basadas en el uso de biomateriales, entre las que destaca la construcción de nanopartículas, las cuales han sido funcionalizadas con distintas moléculas como factores de crecimiento, antígenos, ligandos de TLRs, anticuerpos, entre otras moléculas implicadas en la maduración de CDs y fagocitosis. Estas nanopartículas podrían ayudar a potencializar la respuesta inmune antitumoral y por esta razón, es importante el desarrollo de innovaciones terapéuticas para perfeccionarlas y posteriormente utilizarlas como tratamiento.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Diseñar y caracterizar nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral y acopladas a anticuerpos anti-Clec9a y CpGs.

### **5.2. Objetivos Particulares**

1. Diseñar nanopartículas de quitosano mediante los métodos de emulsión simple y de gelificación ionotrópica.
2. Caracterizar el tamaño y morfología de las nanopartículas de quitosano por medio de microscopía electrónica de barrido y dispersión de luz dinámica.
3. Analizar la eficiencia del cargado de las nanopartículas de quitosano con lisado tumoral mediante ensayos de cuantificación de proteínas.
4. Evaluar la eficiencia del acoplamiento de anticuerpos anti-Clec9a y CpGs a nanopartículas de quitosano mediante electroforesis.
5. Evaluar la viabilidad de células de bazo de ratones C57BL/6 al ser tratadas con nanopartículas de quitosano.

## 6. ANTECEDENTES

### **Antecedentes del uso de nanopartículas funcionalizadas como posible tratamiento antitumoral.**

Gao-Na Shi et al., en 2016 fabricaron nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral proveniente de cultivo celular de melanoma B16-F10 y acopladas en su superficie a fracciones de manosa (NPQS-LT-Man) para volverlas un blanco específico para las células dendríticas. Inicialmente las probaron co-cultivándolas in vitro con células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea (MOCDs) por 48 horas. Se caracterizaron las MOCDs y se observó que las NPQS-LT-Man aumentaban significativamente la expresión de moléculas de clase 1 y clase 2 (MHC-I y MHC-II), CCR7, CD-80, CD-86 y CD-40, indicando maduración de éstas. Posteriormente se realizaron estudios in vivo en ratones donde se observó que estas inhibían significativamente el crecimiento del tumor; aumentaba la concentración de IFN- $\gamma$  en suero y de linfocitos CD8+ en bazo. Finalmente se probaron como vacunas y se observó que retrasaban considerablemente el tamaño del tumor y aumentaron la cantidad de linfocitos CD8+ en bazo y ganglios linfáticos. Con este estudio demostraron que las NPQS-LT-Man podrían ser usadas como una potente vacuna y tratamiento antitumoral [119].

Hee Dong Han et al., en 2016 desarrollaron nanopartículas de quitosano por medio de gelificación ionotrópica cargadas con poly I:C (ligando de TLR-3) y ovoalbúmina (NPQS+polyI:C+OVA). Se demostró in vitro que causan una elevación significativa de moléculas de clase 1 y clase 2 (MHC-I y MHC-II), CCR7, CD-80, CD-86 y CD-40 y elevación de la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70 y TNF- $\alpha$ , lo cual habla de maduración de las MOCDs. In vivo se observó que en los ratones inoculados con células tumorales, la administración de NPQS+polyI:C+OVA retrasaba significativamente el crecimiento del tumor. En ensayos inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia realizados en el tumor, se observó una población aumentada de linfocitos T CD8+ citotóxicos y disminución de células mieloides supresoras. Con este estudio demostraron una potente terapia antitumoral donde aumentan eficazmente la infiltración tumoral por linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos mediada por la maduración de células dendríticas [120].

Schreibelt et al., en 2011 fabricaron nanopartículas de PLGA cargadas con el péptido de melanoma gp100 acopladas a anti-Clec9A (NP-anti-Clec9A). Se incubaron las nanopartículas con células dendríticas BDCA3+ (CD BDCA3) por 30-60 minutos y se observó que las CD BDCA3 son capaces de endocitar las NP-anti-Clec9A. Posteriormente, las CD BDCA3 fueron co-cultivadas por una noche en presencia de poly I:C y R848 con linfocitos T CD8+ que expresaban un TCR para gp100. Se observó activación significativa de los linfocitos T CD8+ al encontrarse con una expresión significativamente mayor de CD69 y secreción de IFN-  $\gamma$ . Con este estudio comprobaron que Clec9A efectivamente colabora de forma importante en la presentación cruzada de antígenos y que puede ser un buen blanco en la terapia antitumoral ya que es específico de las CD BDCA3, que son equivalentes a las CD CD8+ [121].

## **7. MÉTODOLÓGÍA**

### **7.1 Elaboración de micropartículas y nanopartículas de quitosano**

#### **7.1.1 Materiales**

##### **Método de emusión simple**

Quitosano de caparazón de camarones con  $\geq 75\%$  de desacetilación (quitina desacetilada, poli (D-glucosamina)), hexano 86.18g/mol y glutaraldehído grado I, 25% w/w adquiridos en Sigma-Aldrich, USA. Aceite mineral de MW variable (205 y 500 g/mol) adquirido en Farmacia París, México. Span 80 adquirido en Sigma-Aldrich, USA. Ácido Acético glacial adquirido en J.T. Baker,USA.

##### **Método de gelificación ionotrópica**

Quitosano de caparazón de camarones,  $\geq 75\%$  de desacetilación (quitina desacetilada, poli (D-glucosamina)) y Tripolifosfato de Sodio (TPP) adquiridos en Sigma-Aldrich, USA. Ácido Acético glacial adquirido en J.T. Baker,USA.

#### **7.1.2 Método de emusión simple**

Elaboración de solución acuosa:

Se agregaron 500 mg de quitosano 75% desacetilación en un vaso de precipitados con 38 ml de ácido acético glacial al 2%. Se dejó disolviendo en agitación por 1 hora. Se agregaron 235  $\mu$ l de glutaraldehído y se dejaron en agitación por 1 min. Posteriormente, se agregó 1ml de Span 80 y se dejó en agitación constante por 1 min más.

Elaboración de solución oleosa:

Se colocó un matraz de bola de 3 bocas en agitación con el rotor en nivel 8. El matraz se colocó en el sonicador (baño) y se le agregaron 75 ml de aceite mineral, se encendió el rotor y el sonicador. Se vertió la solución acuosa en la solución oleosa y se dejó agitando por 3 horas. Se coloca enfriador y constantemente se monitorea la temperatura del agua del sonicador para mantenerla en 30°C.

## Lavados

Después de que la emulsión estuvo lista, se realizaron lavados para retirar los residuos de aceite mineral y glutaraldehído. Se agregaron 15 ml de hexano a la emulsión y se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Se retiró el sobrenadante y se repitió el paso anterior. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 15 ml de agua destilada, se centrifugó por 10 min a 4000 rpm a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Se retiró el sobrenadante y se repitió el paso con agua destilada 2 veces más. El botón con las micropartículas de quitosano se resuspendió en 1 ml de agua destilada y se colocó en un tubo Eppendorf. Se procedió a centrifugarlas en una minicentrífuga por 30 min. Finalmente, se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada y se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

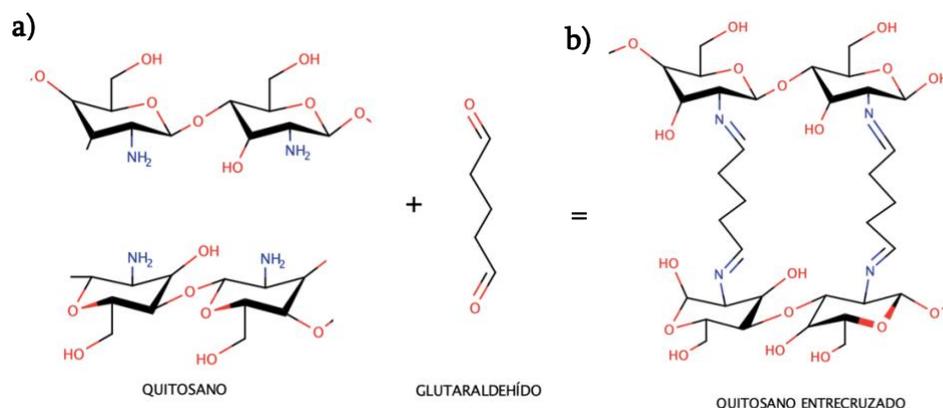


Fig. 10. Método de Emulsión Simple a) Estructura del quitosano y glutaraldehído antes de entrecruzarse. b) Quitosano entrecruzado con glutaraldehído. Modificado de Öztop et al., 2002.

### 7.1.3 Método de gelificación ionotrópica

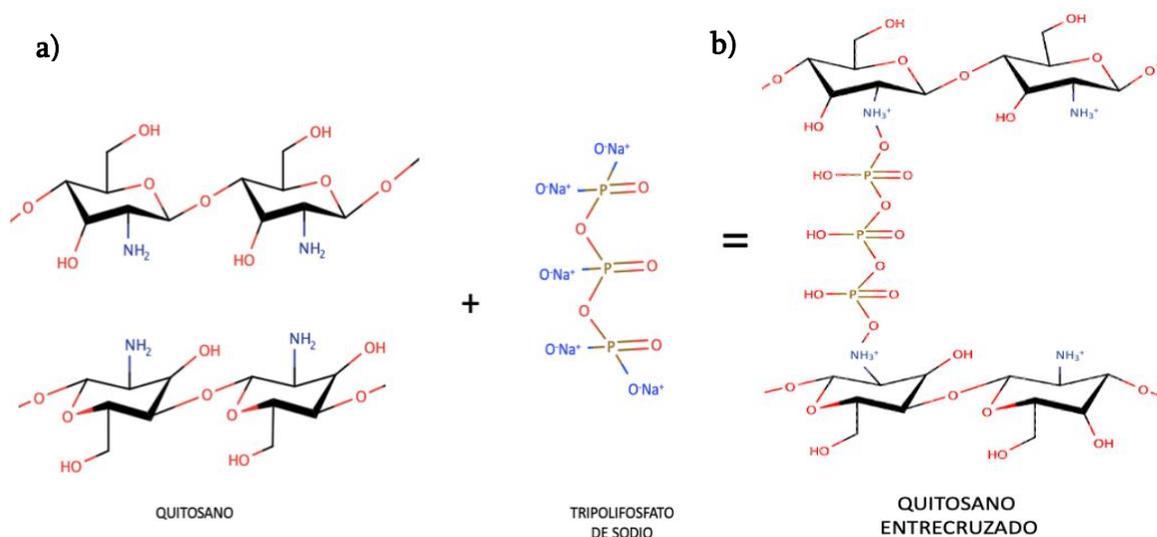
Se realizó diseño factorial  $2_2$  basado en el protocolo de Calvo et al. (1997) para determinar la zona de producción de la formación de nanopartículas, donde se busca menor tamaño de partícula y menor formación de agregados. Los niveles fueron la cantidad de quitosano 75% desacetilación (1 mg/ml y 3 mg/ml de ácido acético glacial al 1%) y los factores fueron la cantidad de tripolifosfato de sodio (2.5 mg/ml y 1.66 mg/ml de ácido acético glacial al 1%). Se controló el tiempo de goteo y la agitación para que en todos los experimentos fueran iguales.

Se agregaron diferentes concentraciones de quitosano 75% desacetilación: 1 mg/ml y 3 mg/ml de ácido acético glacial al 1%. Se dejó en agitación continua en una agitadora magnética durante toda la noche o hasta que el quitosano quedara disuelto. Al mismo tiempo se disolvieron por separado diferentes concentraciones de TPP, 2.5 mg/ml y 1.66 mg/ml de ácido acético glacial al 1%. Finalmente las diferentes concentraciones de TPP fueron añadidas por goteo lento a la solución de quitosano bajo agitación magnética a temperatura ambiente. Posterior al goteo, se dejó en agitación por 1 hora más y finalmente se centrifugaron las muestras a 10,600 rpm por 50 min y se resuspendieron en 3 ml de agua desionizada. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

La siguiente tabla indica las combinaciones realizadas:

Quitosano (mg/ml AA1%)	Ácido Acético 1% (ml)	TPP (mg/ml AA1%)	Ácido Acético 1% (ml)	Tiempo goteo (minutos)	Velocidad de Agitación (IKA c)
1	20	2.5	10	4	Nivel 3
3	20	2.5	10	4	Nivel 3
1	20	1.66	10	4	Nivel 3
3	20	1.66	10	4	Nivel 3

**Tabla 1. Combinaciones de concentraciones diferentes de Quitosano y TPP.**



**Fig. 11. Método de Gelificación Ionotrópica a) Estructura del quitosano y TPP. b) Quitosano entrecruzado con TPP. Modificado de Kumar et al., 2008.**

#### 7.1.4 Caracterización de nanopartículas de quitosano

La caracterización de la morfología y tamaño de la nanopartícula se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en el Instituto de Investigación en Materiales, la cual se base en utilizar un haz de electrones que al interactuar con la muestra forma una imagen. También se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZS-Malvern, prestado por el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), el cual consiste en la dispersión dinámica de la luz para la medición del tamaño de nanopartículas.

#### 7.2 Nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral

##### 7.2.1 Obtención del lisado tumoral

Se inyectaron ratones macho C57BL/6 con 60,000 células tumorales de melanoma B16-F10 suspendidas en 100  $\mu$ l de PBS. Se monitoreó el crecimiento del tumor por 20 días, cuidando que los ratones no presentaran signos y síntomas de deterioro. En el día 20, se sacrificaron y se extirpó el tumor en cada uno de los ratones. Se retiró el tejido conjuntivo circundante, se pesaron y se midieron. Posteriormente se colocó cada tumor entre 2 mallas con poro de 200  $\mu$ m en una caja de Petri, se les agregó buffer de lisis a una concentración

de 1 ml de buffer por 0.1 gr de tumor + 10  $\mu$ l de inhibidor de proteasas por ml de buffer de lisis. Con un émbolo de jeringa se procedió a macerar el tumor. Se retiraron las mallas con la cápsula del tumor y se recolectó el sobrenadante con una micropipeta. Se dejó el lisado tumoral a 4°C por 20 min para dejar actuar al buffer de lisis. Finalmente, se ultracentrifugó a 45,000 rpm por 30 min para adquirir solamente la parte proteica. Se cuantificó el lisado tumoral por método de Lowry. Se hicieron alicuotas de 500  $\mu$ l y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### 7.2.2 Nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral por método de gelación ionotrópica

Quitosano (mg/ml AA1%)	Ácido Acético 1% (ml)	pH	Lisado tumoral ( $\mu$ g/mg quitosano)	TPP mg	Ácido Acético 1%	pH	Tiempo goteo (segundos)	Velocidad de Agitación (IKA c)
1.66	3	4	125	0.5	3	4	90	Nivel 3
1.66	3	4	250	0.5	3	4	90	Nivel 3
1.66	3	4	500	0.5	3	4	90	Nivel 3
1.66	3	4.5	125	0.5	3	4.5	90	Nivel 3
1.66	3	4.5	250	0.5	3	4.5	90	Nivel 3
1.66	3	4.5	500	0.5	3	4.5	90	Nivel 3

**Tabla 2. Combinaciones de diferentes concentraciones de quitosano, TPP y lisado tumoral.**

### 7.2.3 Prueba de eficacia de cargado de lisado tumoral en nanopartículas de quitosano.

Se cuantificó el sobrenadante adquirido posterior al primer lavado de las nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral por medio del kit de ensayo de proteínas micro BCA.

## 7.3 Acoplamiento de nanopartículas de quitosano a anti-Clec9A PE y CpGs

### 7.3.1 Materiales

Buffer de MES pH 5.8 (Thermo Scientific™ BupH™ MES Buffered Saline Packs) y Sulfo-NHS (N- N-hidroxisuccinimida) fueron adquiridos en ThermoFisher Scientific, USA. Anti-Clec9A PE clona 10B4 adquirido en BD Biosciences, USA. CpG ODN clase C adquiridos en InvivoGen, USA. Albúmina de suero bovino liofilizada y EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidrocioruro) adquiridos en Sigma, USA.

### 7.3.2 Metodología

Se prepararon nanopartículas de quitosano por metodología de gelificación ionotrópica previamente detallada. Se siguió el protocolo descrito por Kulin et al. en el 2002 para el acoplamiento de moléculas a las superficie de nanopartículas con algunas modificaciones a continuación descritas [122].

#### Activación

Para elegir cual era la concentración de proteína adecuada para obtener un acoplamiento eficiente a la superficie de las nanopartículas, se realizó curva con albúmina utilizando diluciones seriadas de albúmina que fueron de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{gNPCS}$  hasta  $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{gNPCS}$ . Se añadió la cantidad de albúmina antes mencionada a 1.5 ml de Buffer de MES, se colocó en agitadora magnética nivel 3 y posteriormente se agregaron  $500 \mu\text{l}$  de Buffer de MES a los que previamente se les añadió 3 mg de EDC y 3.6 mg de Sulfo-NHS. Se dejó agitando por 30 min.

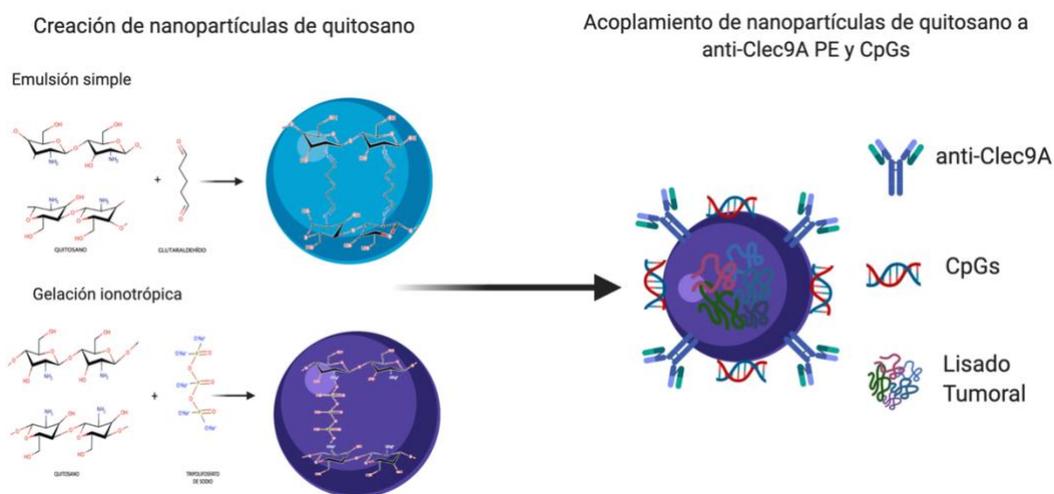
#### Acoplamiento

Se lavaron 3 mg de nanopartículas de quitosano en Buffer de MES y se centrifugaron por 30 min a 10,600 rpm. Se decantaron, se resuspendieron en  $500 \mu\text{l}$  de buffer de MES y se colocaron en agitadora magnética. Posteriormente se les añadió por goteo lento la solución previamente preparada con albúmina, EDC y Sulfo-NHS. Se dejó agitando a temperatura ambiente por 12 horas. Finalmente las nanopartículas fueron centrifugadas a 10,600 rpm

por 30 min, se recolectó el sobrenadante para su uso posterior y las nanopartículas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

### 7.3.3 Prueba de acoplamiento a Nanopartículas de Quitosano

Para evaluar la unión de la albúmina a la superficie de las nanopartículas de quitosano, se fabricaron geles de poliacrilamida al 7.5%. Se elaboró un gel control utilizando diluciones seriadas de albúmina que fueron de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{gNPCS}$  hasta  $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{gNPCS}$ . En otro gel se cargaron los sobrenadantes obtenidos después del acoplamiento. Finalmente, ambos geles se tiñeron con azul de Coomasie. Una vez seleccionada la concentración de proteína ideal, se acopló el anticuerpo anti-Clec9a-PE y CpGs a la superficie de las NPQS. A continuación, el acoplamiento fue corroborado por microscopía de fluorescencia detectando la PE del anticuerpo y utilizando DAPI para identificar las CpGs.



**Fig. 12. Esquema de fabricación de nanopartículas de quitosano acopladas a anti-Clec9A y CpGs. Creado con BioRender.com**

## **7.4 Prueba de citotoxicidad con Nanopartículas de Quitosano**

### **7.4.1 Materiales**

Se obtuvieron células de bazo de ratones macho C57BL/6. Nanopartículas de quitosano obtenidas por el método de gelificación ionotrópica. Kit de anexina V/ 7AAD adquirido en BioLegend, USA.

### **7.4.2 Metodología**

Se comprobó el efecto citotóxico de diferentes concentraciones de nanopartículas de quitosano en células de bazo a 24 y 72 horas. Se extirpó el bazo de ratones macho C57BL/6. Inmediatamente se colocó en PBS y se le realizaron 3 lavados con recambios de PBS. Posteriormente se colocó entre 2 mallas con poro de 200  $\mu\text{m}$  en una caja de Petri y se agregaron 2 ml de RPMI. Se maceró el bazo para lograr disgregar las células, se retiraron las mallas con la cápsula del bazo y se recolectó el sobrenadante. Se contó el número de células obtenidas y se colocó en placa de 24 pozos, a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml de RPMI en cada pozo. El control positivo, células muertas, se obtuvo aplicando alcohol 96%.

Se crearon los siguientes grupos experimentales por triplicado:

1. Células vivas (control negativo).
2. Células muertas (control positivo).
3. Células con ácido acético 1%.
4. Células + 3 mg de Nanopartículas de quitosano resuspendidas en ácido acético 1%.
5. Células + 1.5 mg de Nanopartículas de quitosano resuspendidas en ácido acético 1%.
6. Células + 0.75 mg de Nanopartículas de quitosano resuspendidas en ácido acético 1%.

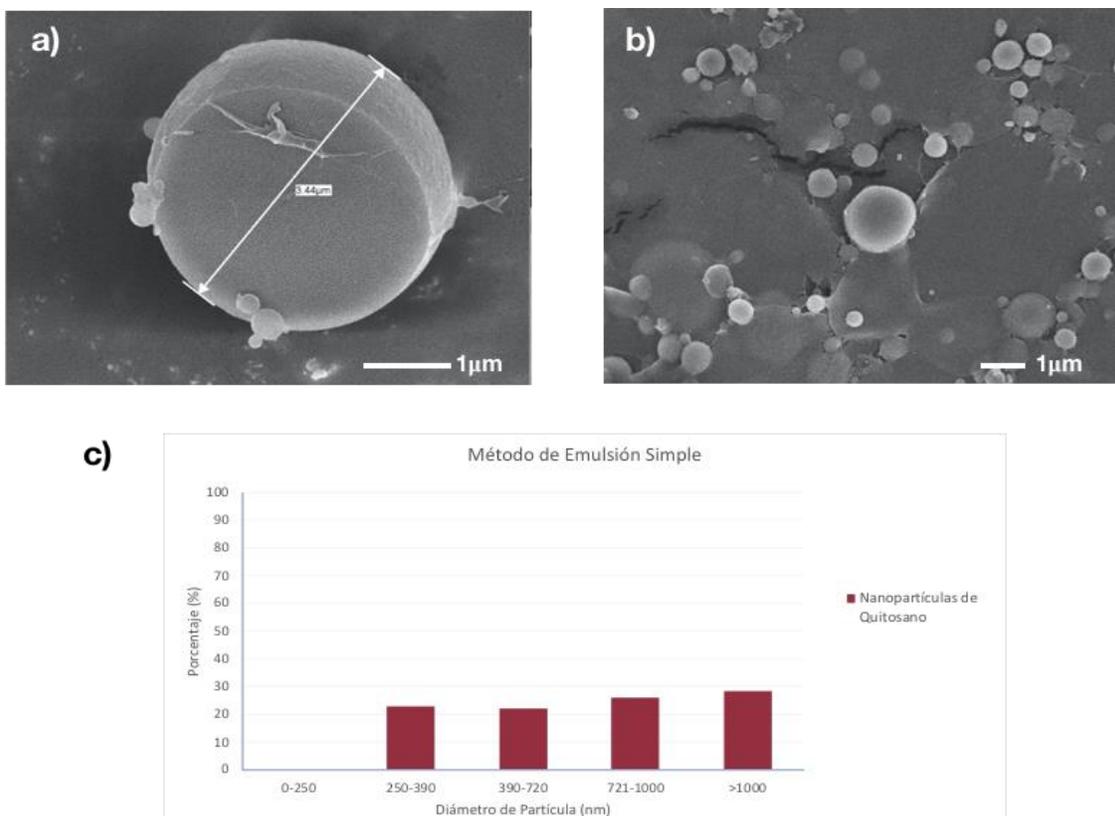
Se dejaron incubando a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 y 72 horas. Una vez cumplido el periodo de incubación, fueron teñidas con anexina V/ 7AAD y adquiridas por citometría de flujo en BD Bioscience FACScalibur y analizadas en el programa Flow Jo.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Fabricación de nanopartículas de quitosano

#### 8.1.1 Emulsión simple

Se observó que las partículas generadas por este método de fabricación tienen una forma esférica y uniforme (Fig. 13 a y b). Por medio del programa ImageJ se midió el tamaño de las partículas en múltiples micrografías, observando que el tamaño es heterogéneo y que va de los 250 nm a los 4  $\mu\text{m}$ , sin tener un pico de tamaño sobresaliente. Es importante mencionar que la mayoría de las partículas (76.53%) tienen un diámetro mayor a 390 nm y solamente el 22.83% presentan un rango de 250 a 390 nm. Por otro lado, no se detectaron partículas de diámetro menor a 250 nm (Fig. 13 c).



**Fig. 13. Partículas de quitosano creadas por método de emulsión simple. a) y b) Micrografía tomada en SEM a 20,000 y 10,000 aumentos respectivamente. Se observa morfología esférica en ambas figuras. c) Porcentaje de partículas agrupadas por rango de tamaño.**

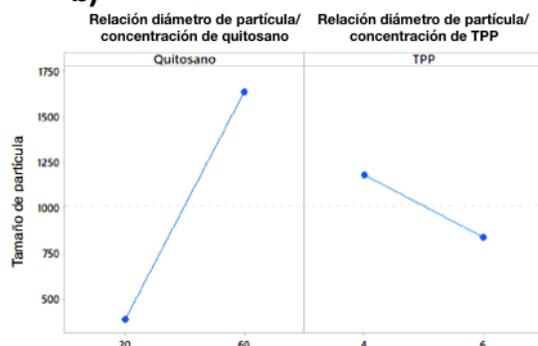
### 8.1.2 Gelificación ionotrópica

Al probar diferentes combinaciones de concentraciones de quitosano y TPP, se observó que se generaron diferentes tamaños promedio de partículas (Fig 14 a). Así mismo se observó que la concentración de quitosano afectó de manera importante el tamaño de partícula ya que a mayor concentración se formaron partículas de mayor tamaño. En cuanto a la concentración de TPP se probó que ésta no ejerce un efecto significativo sobre el tamaño de partícula (Fig. 14 b). Al comparar entre estos reactivos la influencia de la variación en la concentración con respecto al tamaño, se encontró que la concentración de quitosano afecta el tamaño de partícula independientemente de la concentración de TPP (Fig 14 c).

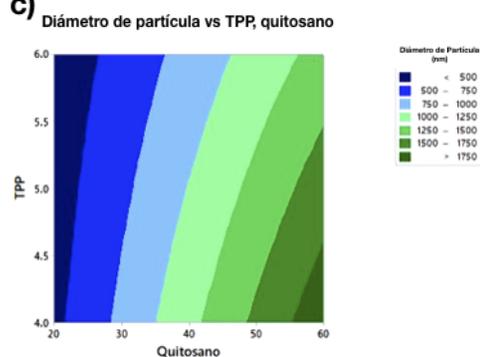
a)

Quitosano (mg/ml AA1%)	Agua (ml)	TPP (mg/ml AA1%)	Agua (ml)	Promedio tamaño partícula (nm)
1	20	2.5	10	440
3	20	2.5	10	1924
1	20	1.66	10	336
3	20	1.66	10	1347

b)

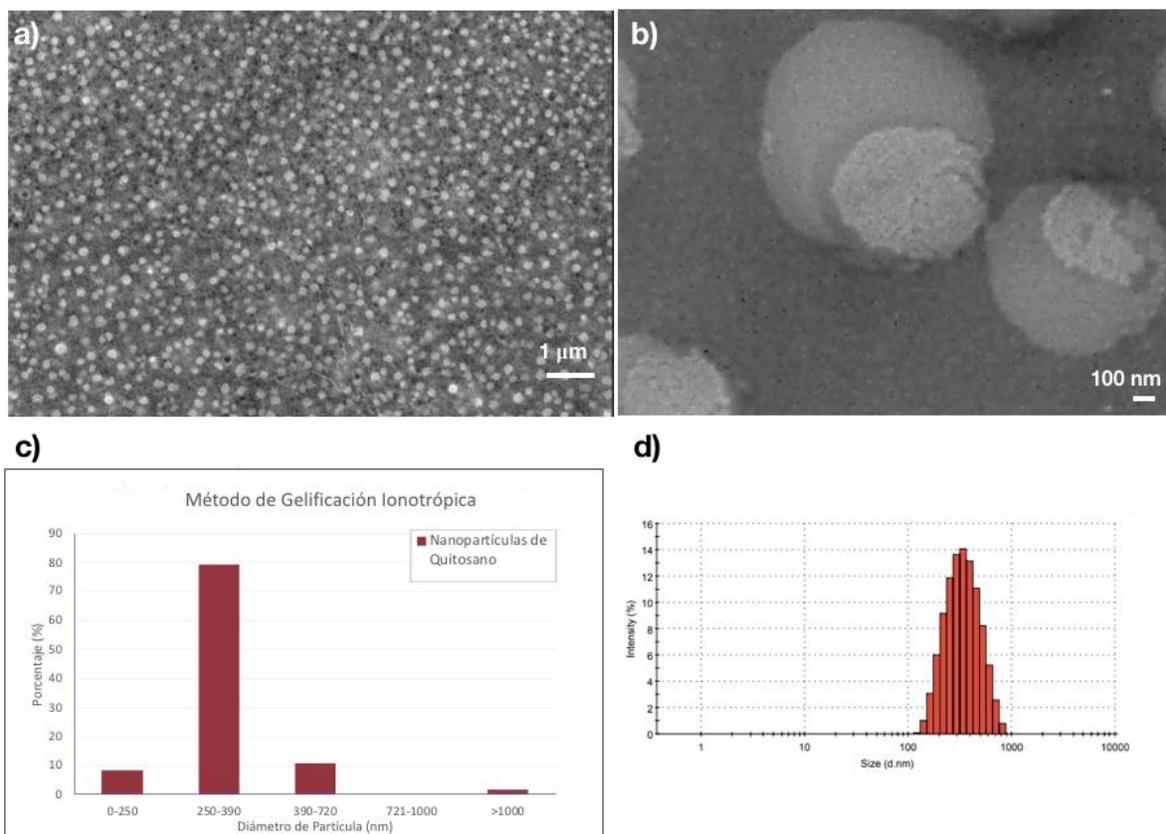


c)



**Fig. 14. Estandarización de nanopartículas de quitosano por gelación ionotrópica. a) Cantidades de quitosano y TPP utilizadas en la fabricación de partículas de quitosano por el método de gelación ionotrópica. b) Relación entre el diámetro de partícula y la concentración de quitosano y TPP. c) Relación entre concentración de quitosano y TPP.**

Posteriormente solo se utilizó la concentración de 1 mg/ml de quitosano en AA 1% y 2.5 mg/ml de TPP en AA 1% y por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) se analizó la morfología y tamaño de las partículas producidas (Fig. 15 a y b). Aunque las nanopartículas sintetizadas por método de gelificación ionotrópica no presentan forma esférica ni uniforme, su tamaño es menor comparado con la técnica anterior. En este caso, debido a que las dimensiones son menores, fue posible analizarlas por dispersión de luz dinámica, observando que la mayoría de las partículas (87.54%) se encuentran en un rango de tamaño de 0-390 nm y solamente un pequeño porcentaje mide > 390 nm (Fig. 15 c y d).



**Fig. 15. Nanopartículas de quitosano creadas por método gelificación ionotrópica. a) y b) Micrografía tomada en SEM a 10,000 y 20,00 aumentos respectivamente. Se observa morfología esférica en ambas figuras. c) Porcentaje de partículas agrupadas por rango de tamaño. d) Distribución de tamaño de las Nanopartículas de Quitosano. n=3.**

## 8.2 Nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral

La fabricación de NPQS utilizando diferentes pH resultó en la modificación del tamaño de nanopartícula, obteniendo un diámetro menor con un pH 4.5. En cuanto a las NPQS-LT se observó que hubo cambios en su tamaño al variar la concentración de LT (Fig. 16 a). La carga de LT en las NPQS se evidenció visualmente al centrifugar la solución ya que el botón con NPQS es translúcido, mientras que el botón de las NPQS-LT se aprecia de color marrón. Es relevante destacar que al centrifugar el LT a las mismas revoluciones por minuto, en ausencia de NPQS, éste no precipita formando botón (Fig. 16 b, c y d).

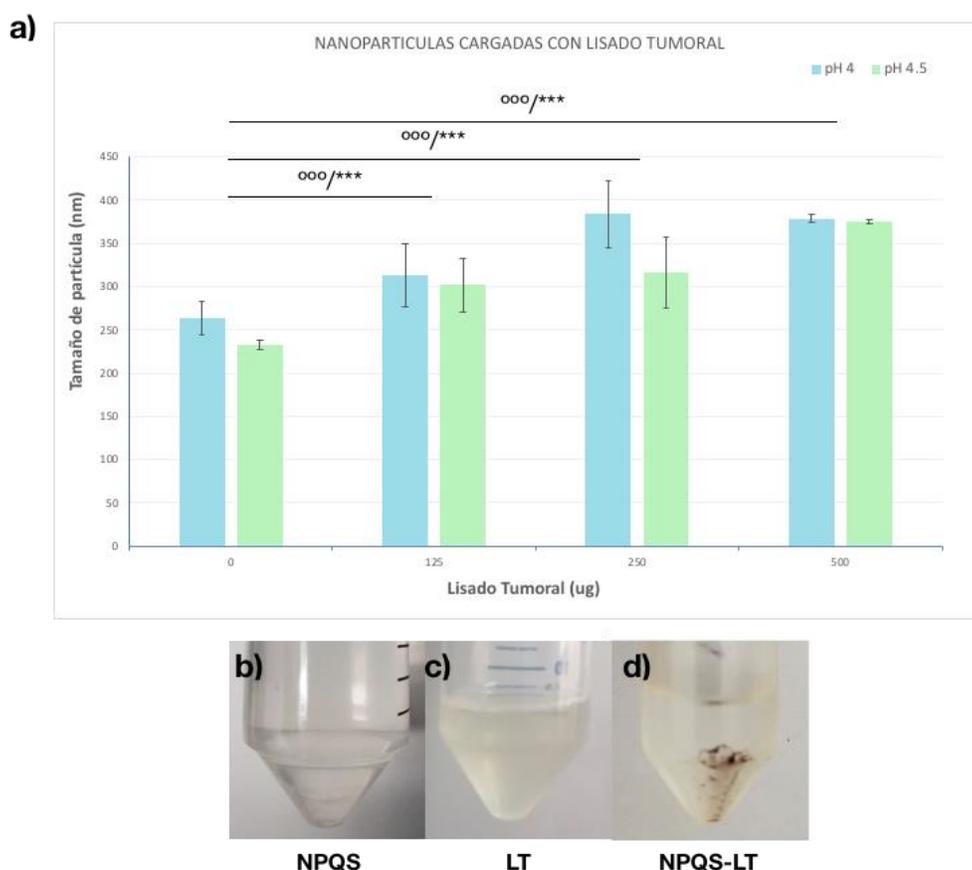
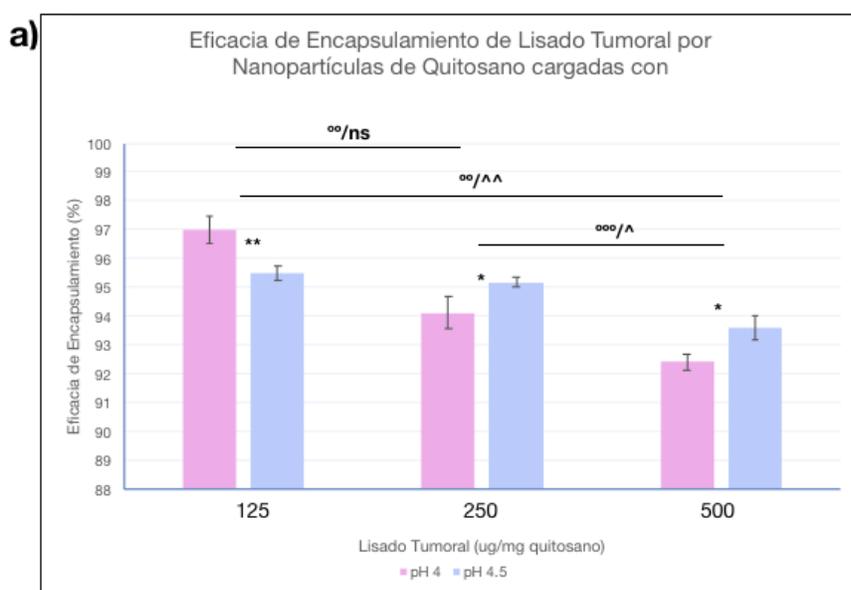


Fig. 16. Tamaño de Nanopartículas cargadas con Lisado Tumoral. a) Tamaño de nanopartículas de quitosano con 3 diferentes concentraciones de lisado tumoral (125, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{mg}$  quitosano) en 2 diferentes pH (4 y 4.5).  $ooo=P<.001$  NPQS pH4  $***=P<.001$  NPQS pH4.5 b) Botón de nanopartícula NPQS posterior a centrifugación. c) LT posterior a centrifugación. d) Botón de NPQS-LT posterior a centrifugación. n=3.

En cuanto a la eficiencia de encapsulamiento, se demostró que ambos pH generan un encapsulamiento mayor al 90%, con un máximo del 96.99% al utilizar una concentración de 125  $\mu\text{g}$  de LT por mg de quitosano en un pH de 4. Sin embargo, al aumentar la concentración de LT, el porcentaje de encapsulamiento fue disminuyendo, especialmente en la fabricación de NPQS-LT con pH 4, obteniendo hasta 92.4% de encapsulamiento, mientras que a pH 4.5 fue de 93.6% (Fig. 17 a). Se encontró que a pH 4.5, el PDI de las NPQS-LT fue considerablemente menor en todas las concentraciones de LT ( $<0.296$ ), en comparación del PDI encontrado en las NPQS-LT fabricadas con un pH de 4 donde se mantuvo por arriba de 0.374 (Fig. 17 b).



b)

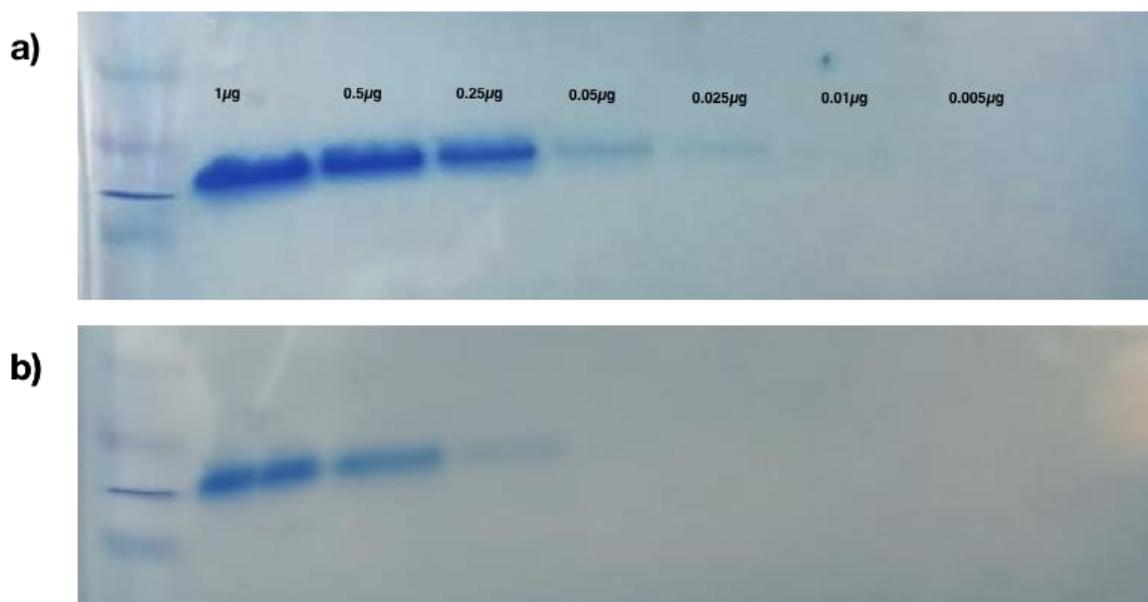
Lisado tumoral ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de quitosano)	pH	PDI
125	4	0.457
250	4	0.442
500	4	0.374
125	4.5	0.288
250	4.5	0.296
500	4.5	0.287

Fig. 17. Eficiencia de encapsulamiento de nanopartículas cargadas con Lisado Tumoral. a) Porcentaje de encapsulamiento. \* Comparación entre pH. ° Comparación entre concentración de LT pH 4. ^ Comparación entre concentración LT pH4.5. \*\*\*/°°°/^^^= $P < .001$ , \*\*/°°/^^= $P .002$ , \*/°/= $P 0.33$ , ns. b) Índice de Polidispersión (PDI) de NPQS-LT. n=5.

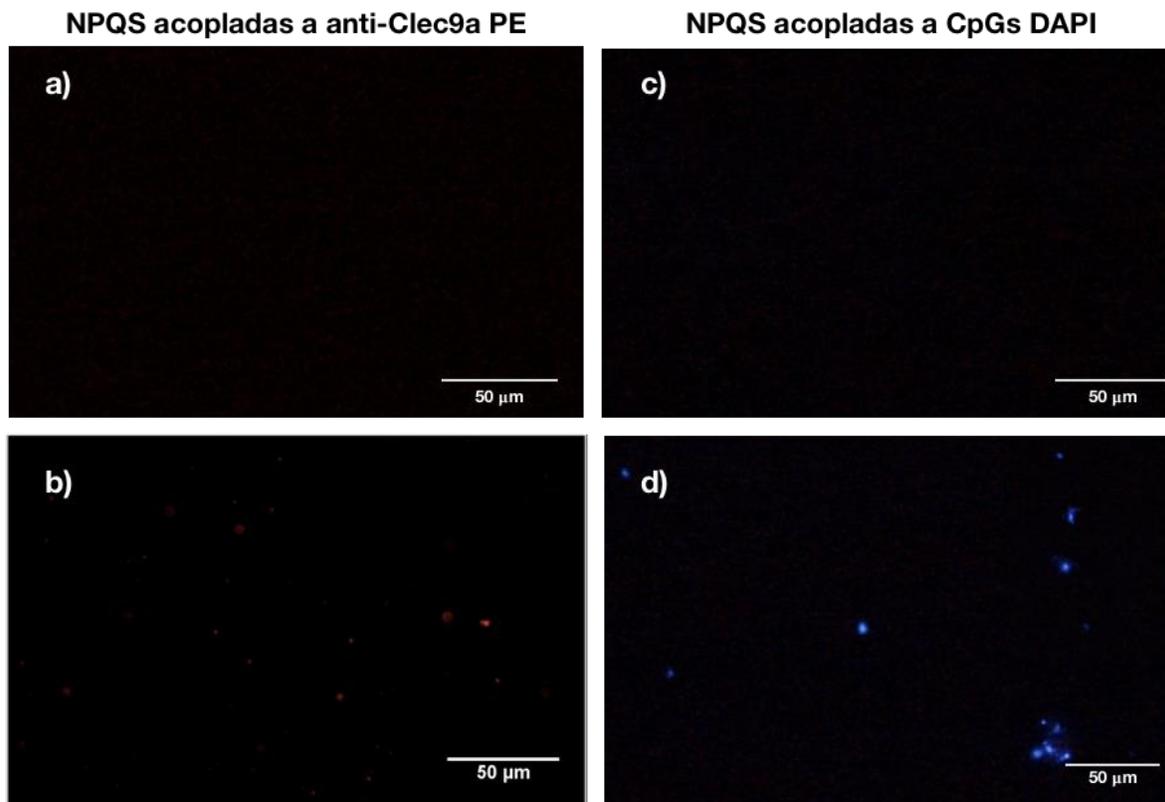
### 8.3 Acoplamiento de Nanopartículas de Quitosano a anti-Clec9A y CpGs

Para seleccionar la concentración adecuada de proteína que se acoplaría a las NPQS, se hizo una curva de estandarización con albúmina. Se puede observar en la Fig. 18 a el gel de poliacrilamida donde se distinguen las diferentes bandas correspondientes a las diferentes concentraciones de albúmina. En la Fig. 18 b se muestra el gel cargado con los sobrenantes de las NPQS acoplada a albúmina, en el cual disminuyen la intensidad y el grosor de las bandas, llegando incluso a desaparecer, lo que indica que hay menor concentración de proteína en el sobrenadante con respecto al control. Se determinó que la concentración ideal fue de  $0.01 \mu\text{g}$  de proteína por mg de quitosano ya que toda la proteína fue acoplada a las NPQS sin observarse aglomerados de NPQS o de albúmina.

Finalmente, se acopló  $0.01 \mu\text{g}$  de anti-Clec9a-PE o CpGS por mg de quitosano a la superficie de las NPQS y se verificó la emisión de fluorescencia. Se observó la presencia de nanopartículas fluorescían únicamente cuando tenían la presencia de las moléculas antes mencionadas (Fig. 18 a-d).



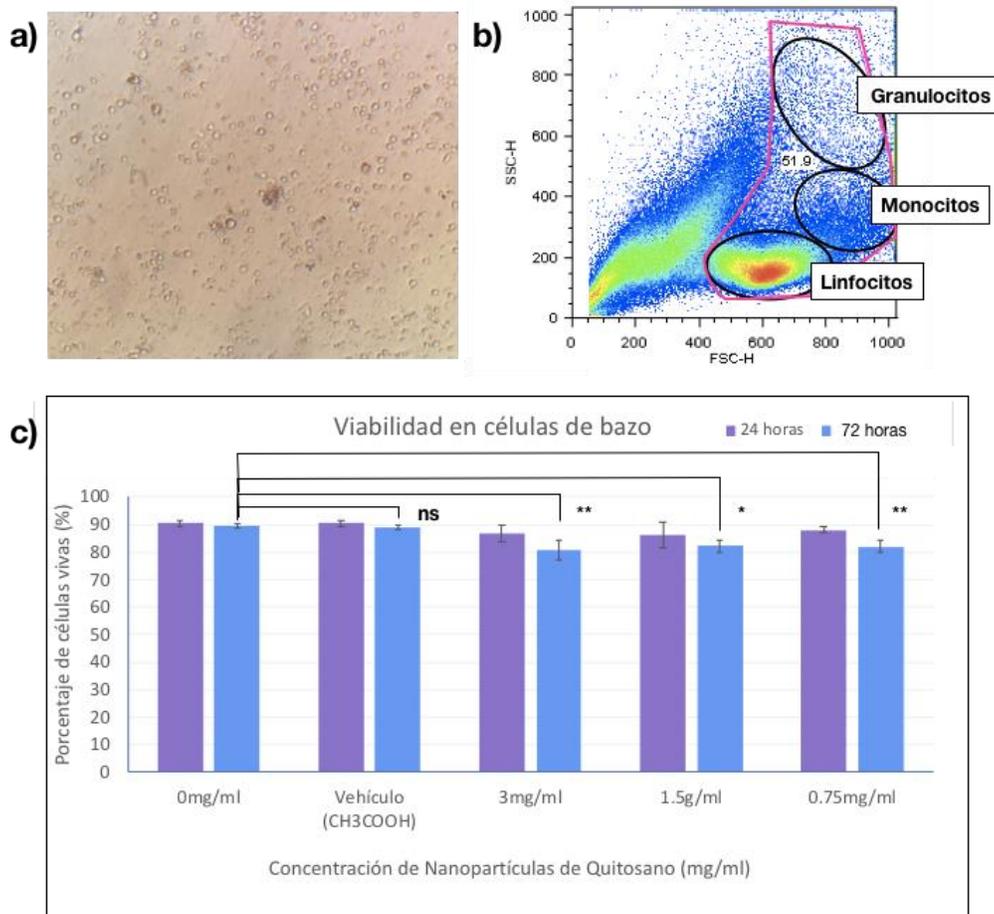
**Fig. 18. Acoplamiento de albúmina en la superficie de nanopartículas de quitosano. a) Concentración de albúmina ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  de nanopartículas de quitosano) previo a acoplamiento. b) Concentración de albúmina ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  de nanopartículas de quitosano) en sobrenadante posterior a acoplamiento.  $n=3$ .**



**Fig. 19. Acoplamiento de moléculas en la superficie de nanopartículas de quitosano. a) NPQS observadas a una longitud de onda de 505-545. b) NPQS anti-Clec9A PE observadas a una longitud de onda de 505-545. C) NPQS observadas a una longitud de onda de 420-470. d) NPQS CpGs observadas a una longitud de onda de 420-470. Moléculas acopladas en una concentración de 0.01μg/μg de nanopartículas de quitosano en su superficie observadas por microscopía de fluorescencia. n=3.**

## 8.4 Pruebas de Viabilidad Celular

Para probar si las nanopartículas no causaban citotoxicidad, se hicieron ensayos con Anexina V/7AAD en cultivos de células de bazo a 24 y 72 horas. Se observó que a 24 horas no hay diferencia significativa entre las células sin tratamiento y las células con diferentes concentraciones de NPQS, manteniendo una sobrevivencia mayor al 85%. A 72 horas la viabilidad comenzó a disminuir de forma dependiente a la concentración de NPQS, siendo la concentración mayor (3 mg/ml) la que causaba menor viabilidad,  $80.6\% \pm 3.48$  (Fig. 20 c).

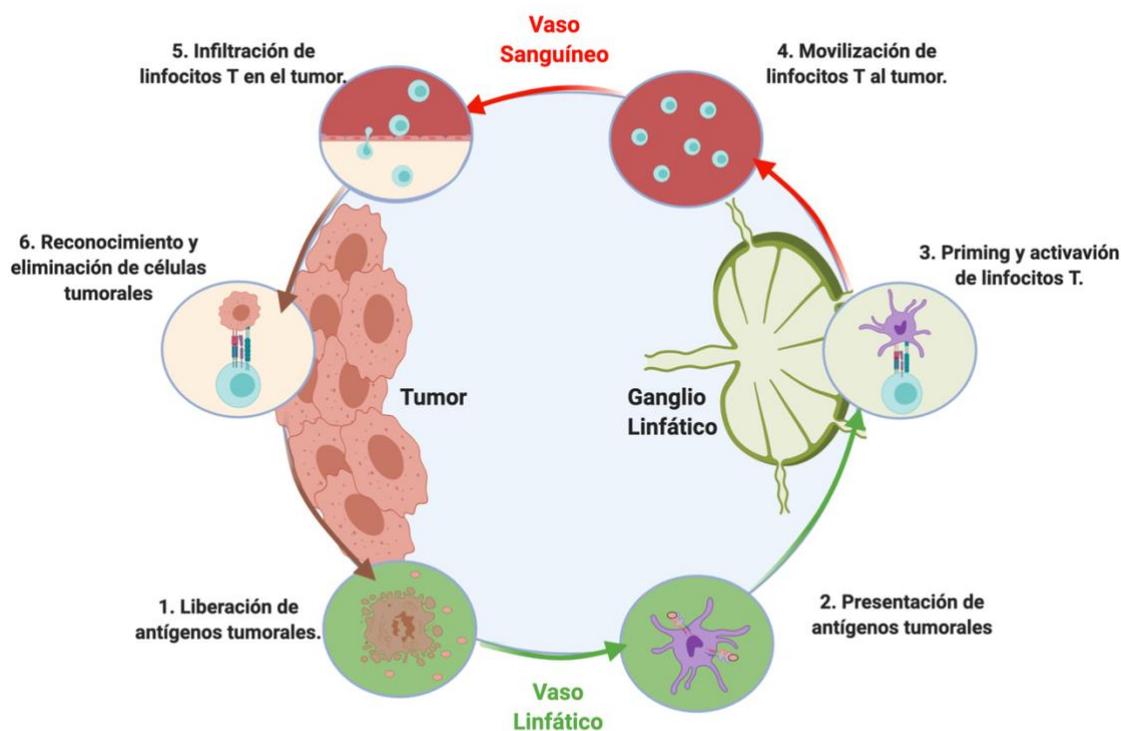


**Fig. 20. Viabilidad en células de bazo. a) Micrografía de cultivo primario de células de bazo de ratón. b) Dot Plot de poblaciones de bazo seleccionadas para el análisis de viabilidad. c) Porcentaje de viabilidad celular de cultivo primario de bazo de ratón expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de quitosano durante 24 y 72 horas. n=3.**

## 9. DISCUSIÓN

Por muchos años el cáncer ha sido una enfermedad con alta tasa de mortalidad, tan solo en el 2018 se calcularon 9.6 millones de muertes a nivel mundial por esta causa [123]. Esto ha hecho que la búsqueda de una cura o tratamiento sea una de las principales preocupaciones y retos a nivel global en la actualidad.

Recientemente el uso nanopartículas en inmunoterapia ha incrementado debido a que son capaces de superar las limitaciones del tratamiento con inmunoterapia basada en la administración de moléculas como citocinas, antígenos y fármacos. Las principales ventajas de su uso son su capacidad de proteger a las moléculas de la degradación por enzimas del organismo así como el incremento de su especificidad y direccionamiento al ser acopladas a ligandos, pudiendo intervenir en cualquier punto del ciclo de inmunidad en cáncer (Fig.17) [114].



**Fig. 21. Ciclo de cáncer-inmunidad. Modificado de Park et al., 2018. Creado con BioRender.com.**

La entrega adecuada a los sitios de interés dependerá del biomaterial, tamaño, carga, forma e hidrofobicidad de la partícula; siendo el tamaño la característica más importante [124]. En el presente trabajo, el material de elección para la fabricación de las nanopartículas fue el quitosano, debido a las propiedades que presenta como biocompatibilidad, biodegradabilidad, abundancia que lo hace de fácil acceso, y la carga positiva facilita su internalización por las células e incrementa su actividad inmunoestimuladora [125][126].

Uno de los objetivos de este trabajo fue conseguir un tamaño de nanopartícula menor a 500nm, debido a que en la literatura se ha reportado que es el óptimo para la internalización rápida y eficiente de las nanopartículas por las células dendríticas [127][128]. Por lo que se eligieron y compararon 2 técnicas de fabricación: emulsión simple y gelificación ionotrópica, considerando además del tamaño, su estabilidad y citotoxicidad. También se consideraron otros factores como el tiempo y costo de fabricación.

A pesar de que el método de emulsión simple generaba nanopartículas con una forma más esférica y de textura uniforme, el rango de tamaños era muy amplio de acuerdo a las medidas tomadas por SEM, estas iban de los 250 a los 4000 nm y solo un pequeño porcentaje de las partículas presentaron un tamaño óptimo. Aunado a esto, la fabricación de un lote de partículas tarda aproximadamente 6 horas y el costo de producción es alto debido al uso considerable de glutaraldehído. Otra de las principales desventajas de esta técnica es el uso de solventes orgánicos para los lavados ya que la eliminación total de los residuos de glutaraldehído no siempre se logra. Esto significa que es una técnica con alto riesgo de citotoxicidad [129].

Con la técnica gelación ionotrópica se obtuvo un tamaño más homogéneo de partícula, ya que alrededor del 85% se encontró por debajo de los 390 nm según las medidas tomadas por dispersión de luz dinámica (DLS, Zetasizer Nano). Otra ventaja es que su tiempo de producción es de 2 horas y media y se pueden fabricar varios lotes simultáneamente, también su costo es menor comparado con la técnica de emulsión simple. Aunado a esto, es relevante destacar que en esta técnica no se usan solventes orgánicos ni agentes tóxicos,

por lo que es menos probable afectar la viabilidad de las células. Debido a esto, se decidió continuar con esta técnica para los demás experimentos.

Posteriormente se evaluaron las variables que pudieran influir más en el tamaño de nanopartícula, las cuales son concentración de quitosano y de TPP. Se observó que la concentración de quitosano influye de manera importante en el tamaño, ya que a mayor concentración se formaron nanopartículas de mayor tamaño, mientras que el cambio de concentración de TPP no influyó de forma importante. Esto coincide con lo reportado por Sreekumar et al. en el 2018, quienes demostraron que la principal condición que influye en el tamaño de nanopartícula es la concentración del quitosano, por lo que para controlarlo, se mantiene siempre la misma relación quitosano/TPP. También reportaron que el grado de desacetilación es la segunda variable de importancia para modificarr las dimensiones de las nanopartículas [130].

Una vez que se seleccionó la concentración de quitosano y TPP que producían menor tamaño de nanopartícula, se decidió probar 2 diferentes pH (4 y 4.5) para el encapsulamiento del lisado tumoral. La literatura refiere que es necesario conocer el punto isoeléctrico (PI) de la proteína a encapsular y a partir de ahí aumentar el pH de la solución para que la proteína gané carga superficial negativa. De esta manera interactúa por medio de fuerzas electrostáticas más fácilmente con el quitosano y la eficacia de encapsulamiento es mayor [131]. Sin embargo, es imposible conocer el punto isoeléctrico exacto del lisado tumoral proteico, por lo que se tomaron los pH más comunes usados en trabajos previos para el encapsulamiento.

En esta prueba se procuró no exceder un pH 5, ya que se ha documentado que el quitosano comienza a desprotonarse y perder solubilidad, por lo que se corre el riesgo de formar aglomerados y disminuir la eficacia de encapsulamiento [132]. En el presente trabajo se observó que el tamaño de la nanopartícula sin encapsular también cambia significativamente debido a la variación de pH, por lo tanto, aunque los resultados de las dimensiones de las nanopartículas al agregar el lisado tumoral en ambos pH son similares, se puede observar que el aumento del tamaño de la partícula con pH 4.5 es mayor. Se sugiere que a un pH 4.5 las nanopartículas tienen mayor capacidad de encapsulamiento del lisado tumoral.

En cuanto a la eficacia de encapsulación se observó que las nanopartículas fabricadas en ambos pH y a cualquier concentración de lisado tumoral son capaces de encapsular más del 90% de la proteína. Siendo la concentración más alta, 500 $\mu$ g/mg de quitosano, la que presenta menor eficacia (92%  $\pm$  0.28 en pH 4 y 93%  $\pm$  0.42 en pH 4.5). Se asume que esto es debido a que a elevada concentración de lisado tumoral, las nanopartículas no son capaces de encapsularlo por completo, por lo que, al aumentar la concentración del lisado, continuaría disminuyendo la eficacia de encapsulado.

Por otro lado, se obtuvo el índice de polidispersión (PDI) de las nanopartículas fabricadas en los diferentes pH, este indica la heterogeneidad de tamaños de moléculas o partículas en una mezcla. Las nanopartículas fabricadas con un pH de 4.5 tuvieron un menor PDI, lo cual nos indica un sistema monodisperso, con mayor estabilidad. Una manera de confirmar estos datos podría ser obteniendo el potencial zeta. Debido a esto y a que se obtiene una encapsulación del 93%  $\pm$  0.42 con una concentración de 500 $\mu$ g/mg de quitosano, se decidió continuar trabajando con este pH y a esta concentración. Estos resultados demuestran que nuestra técnica es altamente eficiente debido a que según lo reportado en la literatura, comunmente se alcanza una eficacia de cargado de entre 50 y 88% [120][133].

El objetivo principal de este trabajo fue fabricar nanopartículas de quitosano cargadas con lisado tumoral acopladas a anti-Clec9A PE y CpGs para su uso como inmunoterapia antitumoral.

Según el protocolo seguido del libro "Bioconjugate Techniques", la cantidad del anticuerpo que se desea acoplar en la superficie de las nanopartículas debe de ser suficiente para generar un exceso molar de 1 a 10 veces del ligando sobre la concentración de nanopartículas. Debido a esto y a que los anticuerpos usados son sumamente costosos y en cantidades pequeñas, se decidió hacer la optimización de la técnica con albúmina [122]. Se observó por medio del desvanecimiento o desaparición de las bandas en los geles de poliacrilamida que hay menor concentración de albúmina en el sobrenadante de los grupos experimentales con respecto al control, lo cual indica de forma indirecta que las nanopartículas de quitosano están siendo acopladas a la proteína. Debido a que no contamos con un método cuantitativo para evaluar cual de las concentraciones es la más adecuada. Cualitativamente se eligió la concentración de 0.01  $\mu$ g/ $\mu$ g de nanopartículas de

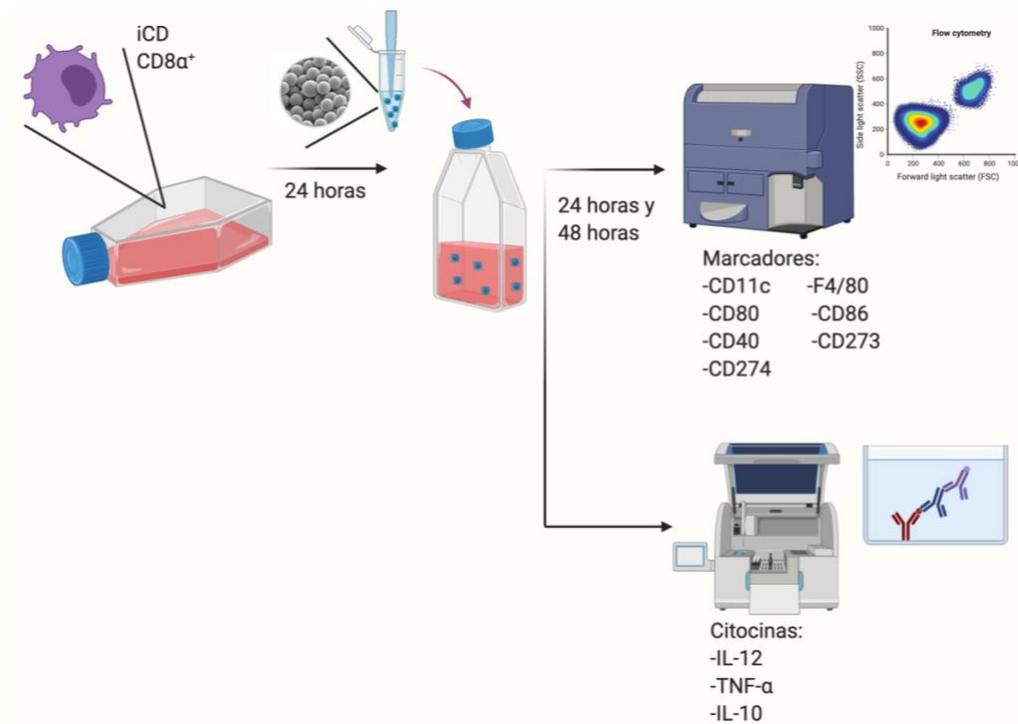
quitosano debido a que la banda prácticamente desaparece, indicándonos que se está cargando toda la proteína, por otro lado, al observar la muestra por microscopía óptica no se observa que formen aglomerados, en comparación con las otras concentraciones. Se infiere que las concentraciones más altas forman aglomerados debido al exceso de proteína que termina por unirse entre ella y que la concentración más baja hace lo mismo debido a que hay un exceso de NPQS en comparación con la proteína a acoplar por lo que las NPQS comienzan a unirse entre ellas.

Es importante destacar que se logró acoplar anti-Clec9a y CpGs a la superficie de las NPQS como se observa en las micrografías tomadas por microscopía de fluorescencia. La activación de Clec9a ayudará a dirigir el tratamiento de forma específica a las CD8  $\alpha^+$  y a su vez colaborará en la endocitosis de las nanopartículas y aumentará la presentación cruzada de los antígenos presentes en el LT. Sin embargo el Clec9a por si solo no puede producir la activación de las células dendríticas, por lo que necesita de la coadministración de adyuvantes adicionales como agonistas de TLRs [134]. En este caso se decidió usar CpGs debido a que se ha demostrado en estudios pre-clínicos y clínicos que pueden estimular una respuesta inmune Th1 efectiva. Se eligió usar CpGs tipo C ya que son capaces de estimular a las CDp para que secreten IFN- $\gamma$  e inducir la maduración y secreción de citocinas como IL-12p70, IL-6 y TNF- $\alpha$  por los linfocitos B y las CDs volviéndolo un adyuvante perfecto en este tratamiento [135].

Para medir si las nanopartículas de quitosano usadas a diferentes concentraciones y por diferente tiempo eran citotóxicas, se realizó un ensayo de detección de apoptosis con Anexina V/ 7AAD. La anexina V es una proteína que se une específicamente a fosfatidilserina, esta última se encuentra presente en la membrana celular externa solamente cuando existen procesos de apoptosis temprana. El 7AAD es una tinción que solamente se vuelve permeable cuando la membrana de la célula está comprometida, ayudando a identificar procesos de apoptosis tardía o necrosis celular. La combinación de ambos hace que se vuelva una prueba adecuada para la identificación de muerte celular. Se observó que las NPQS en 24 horas no causan citotoxicidad con respecto al control, en cambio posterior a 72 horas, la viabilidad comienza a disminuir.

## 9.1 Proyecciones a futuro

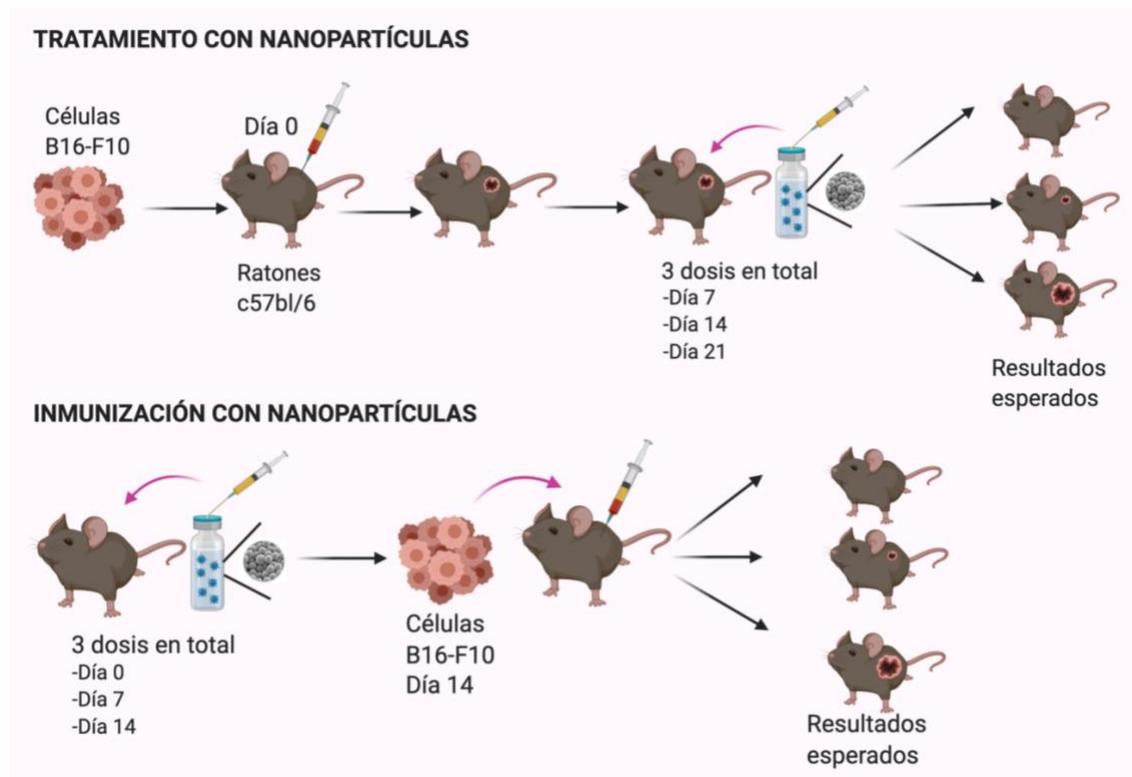
La siguiente fase de este proyecto es evaluar la activación de las CD8 $\alpha^+$  de forma *in vitro* con NPQS anti-Clec9A PE/ CpGs. Se planea cultivarlas con diferentes concentraciones de NPQSLT anti-Clec9A PE/ CpGs, NPQSLT anti-Clec9A PE, NPQSLT CpGs y los grupos control. Posteriormente se seleccionará la mejor concentración y combinación de nanopartículas por medio de la evaluación de marcadores como CD11c, CD80, CD86, CD40, entre otros por medio de citometría de flujo y la liberación de IL-12 y TNF- $\alpha$  por medio de ELISA.



**Fig. 22. Esquema de experimentos *in vitro* con NPQSLT anti-Clec9A PE/ CpGs.**  
Creado con BioRender.com.

Se probará la efectividad de las nanopartículas cargadas con lisado tumoral acopladas a anti-Clec9A y CpGs en ratones c57bl/6. Primero se evaluará el uso de las nanopartículas como tratamiento. Inocularemos a los ratones con células de melanoma B16-F10 (día 0) y

se le aplicarán 3 dosis (en los días 7, 14 y 21) con diferentes concentraciones de NPQSLT anti-Clec9A PE/ CpGs, NPQSLT anti-Clec9A PE, NPQSLT CpGs y los grupos control. Los ratones serán monitoreados cada 2 días para vigilar el crecimiento tumoral, así como su estado de salud. Serán sacrificados cuando el tumor alcance una medida de 2 cm y se evaluará por medio de inmunohistoquímicas la presencia de linfocitos T CD4, CD8, CD45 y macrófagos, la presencia de marcadores de activación como CD40, CD80 y CD86 e IL-12, IL-10, IL-4 e IFN $\gamma$ . Finalmente, se evaluará el uso de nanopartículas como inmunización. Se utilizarán ratones c57bl/6, los cuales serán inoculados con 3 dosis (en los días 7, 14 y 21) con diferentes concentraciones de NPQSLT anti-Clec9A PE/ CpGs, NPQSLT anti-Clec9A PE, NPQSLT CpGs y los grupos control. Se les dará el mismo seguimiento y se realizarán los mismos experimentos que con el grupo donde las nanopartículas se utilizaron con tratamiento.



**Fig. 23. Esquema de experimentos *in vivo* con NPQSLT anti-Clec9A PE/ CpGs.**

Creado con BioRender.com.

## 10. CONCLUSIONES

1. Se demostró que la fabricación de partículas por el método de gelificación ionotrópica genera partículas de menor diámetro en comparación con las partículas generadas por el método de emulsión simple, lo cual es más adecuado para la entrega de fármacos.
2. Las nanopartículas de quitosano fabricadas con pH de 4.5 presentaron menor diámetro en comparación a las nanopartículas de quitosano fabricadas con pH 4.
3. La eficiencia de encapsulamiento por las nanopartículas de quitosano fabricadas a pH de 4 y 4.5 fue similar, siendo mayor a 90% independientemente de la concentración del lisado tumoral.
4. La concentración de proteína adecuada para el acoplamiento en la superficie de las nanopartículas de quitosano fue de  $0.01\mu\text{g}$  por mg de quitosano.
5. Las nanopartículas de quitosano no causaron citotoxicidad en células de bazo a 24 horas pero a 72 horas provocaron disminución de la viabilidad celular.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Samir, B. M. Elgamal, H. Gabr, and H. E. Sabaawy, "Nanotechnology applications in hematological malignancies (Review)," *Oncol. Rep.*, vol. 34, no. 3, pp. 1097–1105, 2015.
- [2] Food and Drug Administration, "Guidance for industry on drug products, including biological products, that contain nanomaterials," *Draft*, no. December, 2017.
- [3] N. Sanvicens and M. P. Marco, "Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 8, pp. 425–433, 2008.
- [4] J. Wolfram *et al.*, "Safety of Nanoparticles in Medicine," *Curr. Drug Targets*, vol. 16, no. 14, pp. 1671–1681, 2015.
- [5] D. Silva Adaya, L. Aguirre-Cruz, J. Guevara, and E. Ortiz-Islas, "Nanobiomaterials' applications in neurodegenerative diseases," *J. Biomater. Appl.*, vol. 31, no. 7, pp. 953–984, 2017.
- [6] J. Shi, P. W. Kantoff, R. Wooster, and O. C. Farokhzad, "Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 1, pp. 20–37, 2017.
- [7] K. H. Bae, H. J. Chung, and T. G. Park, "Nanomaterials for cancer therapy and imaging," *Mol. Cells*, vol. 31, no. 4, pp. 295–302, 2011.
- [8] V. dos Santos, R. Nichele, and M. Savaris, *Engineering of Biomaterials*, vol. X, no. 69. 2007.
- [9] A. Bhatia and Y. Kumar, "Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: A comprehensive review," *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 10, no. 1, pp. 41–62, 2014.
- [10] B. Sitharaman, "Nanobiomaterials Handbook," *Nanobiomaterials Handb.*, pp. 1–732, 2016.
- [11] N. Venkatesh, "Metallic Nanoparticle: A Review," *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 3765–3775, 2018.
- [12] D. Singh, S. Singh, J. Sahu, S. Srivastava, and M. R. Singh, "Ceramic nanoparticles: Recompense, cellular uptake and toxicity concerns," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 1, pp. 401–409, 2016.
- [13] S. Thomas, B. S. P. Harshita, P. Mishra, and S. Talegaonkar, "Ceramic

- Nanoparticles: Fabrication Methods and Applications in Drug Delivery,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 21, no. 42, pp. 6165–6188, 2015.
- [14] R. Kuai, D. Li, Y. E. Chen, J. J. Moon, and A. Schwendeman, “High-Density Lipoproteins: Nature’s Multifunctional Nanoparticles,” *ACS Nano*, 2016.
- [15] J. Brady, T. Drig, P. I. Lee, and J. X. Li, *Polymer properties and characterization*. 2017.
- [16] M. Poliskie, “Introduction to Polymers,” in *Solar Module Packaging*, 2011.
- [17] N. S. Koseva, J. Rydz, E. V. Stoyanova, and V. A. Mitova, *Hybrid protein-synthetic polymer nanoparticles for drug delivery*, 1st ed., vol. 98. Elsevier Inc., 2015.
- [18] R. M. Olabisi, “Cell microencapsulation with synthetic polymers,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 2, pp. 846–859, 2015.
- [19] F. S. T. Mirakabad *et al.*, “PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems,” *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 15, no. 2, pp. 517–535, 2014.
- [20] E. Tamariz and A. Rios-Ramrez, “Biodegradation of Medical Purpose Polymeric Materials and Their Impact on Biocompatibility,” in *Biodegradation - Life of Science*, 2013.
- [21] S. Bhat and A. Kumar, “Biomaterials and bioengineering tomorrow’s healthcare,” *Biomatter*. 2013.
- [22] I. Dmour and M. O. Taha, *Natural and semisynthetic polymers in pharmaceutical nanotechnology*, no. January. 2018.
- [23] N. Peela *et al.*, “Advanced biomaterials and microengineering technologies to recapitulate the stepwise process of cancer metastasis,” *Biomaterials*, vol. 133, pp. 176–207, 2017.
- [24] M. N. Sithole, Y. E. Choonara, L. C. du Toit, P. Kumar, and V. Pillay, “A review of semi-synthetic biopolymer complexes: modified polysaccharide nano-carriers for enhancement of oral drug bioavailability,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 22, no. 2, pp. 283–295, 2017.
- [25] R. A. A. MUZZARELLI, “CHITIN CHEMISTRY,” in *Chitin*, 1977.
- [26] X. Li *et al.*, “Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: The novel adjuvants for cancer vaccine,” *Clinical and Developmental Immunology*. 2013.
- [27] Z. Mármol, G. Páez, M. Rincón, K. Araujo, and C. Aiello, “Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones Chitin and Chitosan friendly

- polymer . A review of their applications,” *Rev. Tecnocientifica URU*, no. August 2016, pp. 53–58, 2011.
- [28] A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, and K. de la Caba, “Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 105, pp. 1358–1368, 2017.
- [29] M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, and E. Chiellini, “Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 8, pp. 981–1014, 2011.
- [30] I. Aranaz *et al.*, “Role of Physicochemical Properties of Chitin and Chitosan on their Functionality,” *Curr. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 27–42, 2014.
- [31] J. Lizardi-Mendoza, W. M. Argüelles Monal, and F. M. Goycoolea Valencia, *Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan*. Elsevier Inc., 2016.
- [32] W. Xia, P. Liu, J. Zhang, and J. Chen, “Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 2, pp. 170–179, 2011.
- [33] D. Raafat and H. G. Sahl, “Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey,” *Microbial Biotechnology*. 2009.
- [34] M. Sugano, T. Fujikawa, Y. Hiratsuji, K. Nakashima, N. Fukuda, and Y. Hasegawa, “A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats,” *Am. J. Clin. Nutr.*, 1980.
- [35] T. M. M. Ways, W. M. Lau, and V. V. Khutoryanskiy, “Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems,” *Polymers*. 2018.
- [36] A. Babu and R. Ramesh, “Multifaceted applications of chitosan in cancer drug delivery and therapy,” *Marine Drugs*. 2017.
- [37] C. L. Bueter *et al.*, “Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis,” *J. Biol. Chem.*, 2011.
- [38] E. C. Carroll *et al.*, “The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons,” *Immunity*, 2016.
- [39] E. N. Koukaras, S. A. Papadimitriou, D. N. Bikiaris, and G. E. Froudakis, “Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate,” *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 10, pp. 2856–2862, 2012.
- [40] H. Jonassen, A. L. Kjøniksen, and M. Hiorth, “Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate,” *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 11, pp. 3747–

3756, 2012.

- [41] K. G. H. Desai, "Chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation: An overview of recent advances," *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2016.
- [42] S. Naskar, K. Koutsu, and S. Sharma, "Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research," *J. Drug Target.*, vol. 27, no. 4, pp. 379–393, 2019.
- [43] F. J. Caro-León *et al.*, "Preparation methods of chitosan nanoparticles: a review," *Rev. Ciencias Biológicas y la Salud*, vol. XXI, pp. 13–25, 2019.
- [44] A. Grenha, "Chitosan nanoparticles: A survey of preparation methods," *J. Drug Target.*, vol. 20, no. 4, pp. 291–300, 2012.
- [45] G. M. Demir and I. T. Degim, "Preparation of chitosan nanoparticles by nano spray drying technology," *Fabad J. Pharm. Sci.*, vol. 38, no. 3, pp. 127–133, 2013.
- [46] A. G. Luque-Alcaraz, J. Lizardi-Mendoza, F. M. Goycoolea, I. Higuera-Ciapara, and W. Argüelles-Monal, "Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier," *RSC Adv.*, 2016.
- [47] S. Pühr, J. Lee, E. Zvezdova, Y. J. Zhou, and K. Liu, "Dendritic cell development- History, advances, and open questions," *Semin. Immunol.*, vol. 27, no. 6, pp. 388–396, 2015.
- [48] A. Castell Rodríguez, G. Piñón Zarate, M. Herrera Enríquez, and I. Medina Solares, "Dendritic Cells: Location, Function, and Clinical Implications," in *Biology of Myelomonocytic Cells*, vol. i, 2017, pp. 21–50.
- [49] R. M. Steinman, "Some interfaces of dendritic cell biology," *Apmis*, vol. 111, no. 7–8, pp. 675–697, 2003.
- [50] Q. Zhou *et al.*, "Mature dendritic cell derived from cryopreserved immature dendritic cell shows impaired homing ability and reduced anti-viral therapeutic effects," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. November, pp. 1–12, 2016.
- [51] D. Y. Tesfaye, A. Gudjonsson, B. Bogen, and E. Fossum, "Targeting Conventional Dendritic Cells to Fine-Tune Antibody Responses," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. July, pp. 1–8, 2019.
- [52] C. Qian and X. Cao, "Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation," *Semin. Immunol.*, vol. 35, no. August, pp. 3–11, 2018.
- [53] F. Geissmann, M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley,

- “Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells,” *Science*. 2010.
- [54] T. A. Patente, M. P. Pinho, A. A. Oliveira, G. C. M. Evangelista, P. C. Bergami-Santos, and J. A. M. Barbuto, “Human dendritic cells: Their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. JAN, pp. 1–18, 2019.
- [55] K. Brasel, T. De Smedt, J. L. Smith, and C. R. Maliszewski, “Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures,” *Blood*, vol. 96, no. 9, pp. 3029–3039, 2000.
- [56] H. J. McKenna *et al.*, “Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells,” *Blood*, 2000.
- [57] M. Greter *et al.*, “GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells,” *Immunity*, 2012.
- [58] E. van der Aa, N. van Montfoort, and A. M. Woltman, “BDCA3 + CLEC9A + human dendritic cell function and development,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 41, pp. 39–48, 2015.
- [59] F. Issa, “Single-cell RNA-Seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors,” *Transplantation*, vol. 101, no. 9, pp. 1955–1956, 2017.
- [60] C. Macri, E. S. Pang, T. Patton, and M. O’Keeffe, “Dendritic cell subsets,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 84, pp. 11–21, 2018.
- [61] M. Swiecki and M. Colonna, “The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 8, pp. 471–485, 2015.
- [62] F. J. Barrat and L. Su, “A pathogenic role of plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity and chronic viral infection,” *J. Exp. Med.*, vol. 216, no. 9, pp. 1974–1985, 2019.
- [63] C. Shi and E. G. Pamer, “Monocyte recruitment during infection and inflammation,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 11, pp. 762–774, 2011.
- [64] E. Segura and S. Amigorena, “Inflammatory dendritic cells in mice and humans,” *Trends Immunol.*, vol. 34, no. 9, pp. 440–445, 2013.
- [65] C. Goudot *et al.*, “Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages,” *Immunity*, 2017.
- [66] M. Plantinga *et al.*, “Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite

- Allergen,” *Immunity*, vol. 38, no. 2, pp. 322–335, 2013.
- [67] A. Schlitzer, N. McGovern, and F. Ginhoux, “Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 41, pp. 9–22, 2015.
- [68] C. V. Harding, “Pathways of antigen processing,” *Curr. Opin. Immunol.*, 1991.
- [69] T. Brocker, “The role of dendritic cells in T cell selection and survival,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 66, no. 2, pp. 331–335, 1999.
- [70] A. Tanne, N. Bhardwaj, D. Bruce, and J. Hofmann, “Cells involved in Autoimmune Diseases and Inflammation Chapter 9 Dendritic Cells : General Overview and Role in Autoimmunity,” in *Kelley and Firestein’s Textbook of Rheumatology, 2-Volume Set*, Tenth Edit., Elsevier Inc., 2011, pp. 126-144.e6.
- [71] G. M. Zaki Al-Ashmawy, “Dendritic Cell Subsets, Maturation and Function,” in *Dendritic Cells*, vol. i, 2018, pp. 11–24.
- [72] A. M. Dudek, S. Martin, A. D. Garg, and P. Agostinis, “Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: Toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity,” *Front. Immunol.*, vol. 4, no. DEC, pp. 1–14, 2013.
- [73] T. Kawai and S. Akira, “TLR signaling,” *Cell Death and Differentiation*. 2006.
- [74] D. Melisi *et al.*, “Toll-like receptor 9 agonists for cancer therapy,” *Biomedicines*, vol. 2, no. 3, pp. 211–228, 2014.
- [75] D. Y. Ma and E. A. Clark, “The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells,” *Seminars in Immunology*. 2009.
- [76] M. L. Dustin, “The immunological synapse,” *Cancer immunology research*. 2014.
- [77] A. K. Chakraborty and A. Weiss, “Insights into the initiation of TCR signaling,” *Nature Immunology*. 2014.
- [78] K. S. Peggs and J. P. Allison, “Co-stimulatory pathways in lymphocyte regulation: The immunoglobulin superfamily,” *Br. J. Haematol.*, vol. 130, no. 6, pp. 809–824, 2005.
- [79] D. M. Sansom, C. N. Manzotti, and Y. Zheng, “What’s the difference between CD80 and CD86?,” *Trends Immunol.*, vol. 24, no. 6, pp. 313–318, 2003.
- [80] R. Elgueta, M. J. Benson, V. C. De Vries, R. J. Noelle, and R. J. Noelle, “CD40L Immu Rev, 2009.pdf,” vol. 229, pp. 152–172, 2009.
- [81] G. Lee *et al.*, “The Role of CD40 Expression in Dendritic Cells in Cancer Biology; A Systematic Review,” *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 14, no. 7, pp. 610–620, 2014.

- [82] J. Banchereau *et al.*, "The CD40 Antigen and its Ligand," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 881–926, 1994.
- [83] C. A. Thaiss, V. Semmling, L. Franken, H. Wagner, and C. Kurts, "Chemokines: A new dendritic cell signal for cell activation," *Front. Immunol.*, vol. 2, no. AUG, pp. 1–9, 2011.
- [84] M. L. Kapsenberg, "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 12, pp. 984–993, 2003.
- [85] F. Romero-Palomo *et al.*, "Funciones y clasificación de las células dendríticas," *An. la Real Acad. Ciencias Vet. Andalucía Orient.*, vol. 24, no. 1, pp. 167–192, 2011.
- [86] M. Embgenbroich and S. Burgdorf, "Current concepts of antigen cross-presentation," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. JUL, 2018.
- [87] E. Segura and S. Amigorena, *Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells*, 1st ed., vol. 127. Elsevier Inc., 2015.
- [88] O. P. Joffre, E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena, "Cross-presentation by dendritic cells," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 8, pp. 557–569, 2012.
- [89] S. Campana, C. De Pasquale, P. Carrega, G. Ferlazzo, and I. Bonaccorsi, "Cross-dressing: An alternative mechanism for antigen presentation," *Immunol. Lett.*, vol. 168, no. 2, pp. 349–354, 2015.
- [90] Z. Yan *et al.*, "A novel peptide targeting Clec9a on dendritic cell for cancer immunotherapy," *Oncotarget*, vol. 7, no. 26, pp. 40437–40450, 2016.
- [91] K. Shortman and W. R. Heath, "The CD8+ dendritic cell subset," *Immunol. Rev.*, vol. 234, no. 1, pp. 18–31, 2010.
- [92] L. F. Poulin *et al.*, "Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 $\alpha$ + dendritic cells," *J. Exp. Med.*, 2010.
- [93] K. Tone, M. H. T. Stappers, J. A. Willment, and G. D. Brown, "C-type lectin receptors of the Dectin-1 cluster: Physiological roles and involvement in disease," *European Journal of Immunology*. 2019.
- [94] C. Del Fresno *et al.*, "DNGR-1 in dendritic cells limits tissue damage by dampening neutrophil recruitment," *Science (80-. )*, 2018.
- [95] T. Iyoda *et al.*, "The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo," *J. Exp. Med.*, 2002.
- [96] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.

- [97] V. Aragon-Sanabria, G. B. Kim, and C. Dong, "From cancer immunoediting to new strategies in cancer immunotherapy: The roles of immune cells and mechanics in oncology," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1092, pp. 113–138, 2018.
- [98] D. Mittal, M. M. Gubin, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth, "Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. Current opinion in immunology. 2014 Apr 1;27:16-25.," *Curr Opin Immunol*, vol. 27, pp. 16–25, 2014.
- [99] V. Shankaran *et al.*, "IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity," *Nature*, vol. 410, no. 6832, pp. 1107–1111, 2001.
- [100] M. D. Vesely, M. H. Kershaw, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth, "Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer," *Annu. Rev. Immunol.*, 2011.
- [101] R. D. Schreiber, L. J. Old, and M. J. Smyth, "Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion," *Science (80-. )*, vol. 331, no. 6024, pp. 1565–1570, 2011.
- [102] M. J. Scanlan, A. O. Gure, A. A. Jungbluth, L. J. Old, and Y. T. Chen, "Cancer/testis antigens: An expanding family of targets for cancer immunotherapy," *Immunol. Rev.*, vol. 188, no. 3, pp. 22–32, 2002.
- [103] S. F. Valilou and N. Rezaei, *Chapter 4 - Tumor Antigens*. Nima Rezaei and Mahsa Keshavarz-Fathi, 2019.
- [104] M. Peng *et al.*, "Neoantigen vaccine: An emerging tumor immunotherapy," *Molecular Cancer*. 2019.
- [105] T. N. Schumacher and R. D. Schreiber, "Neoantigens in cancer immunotherapy," *Science*. 2015.
- [106] U. Sahin *et al.*, "Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer," *Nature*, vol. 547, no. 7662, pp. 222–226, 2017.
- [107] M. Schnurr *et al.*, "Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: An in vitro model for the assessment of tumor vaccines," *Cancer Res.*, 2001.
- [108] F. E. González, A. Gleisner, F. Falcón-Beas, F. Osorio, M. N. López, and F. Salazar-Onfray, "Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design," *Hum. Vaccines Immunother.*, 2014.

- [109] Y. Jia, A. Omri, L. Krishnan, and M. J. McCluskie, "Potential applications of nanoparticles in cancer immunotherapy," *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 13, no. 1, pp. 63–74, 2017.
- [110] C. T. Cheng, G. Castro, C. H. Liu, and P. Lau, "Advanced nanotechnology: An arsenal to enhance immunotherapy in fighting cancer," *Clin. Chim. Acta*, vol. 492, no. January, pp. 12–19, 2019.
- [111] S. P. Surendran, M. J. Moon, R. Park, and Y. Y. Jeong, "Bioactive nanoparticles for cancer immunotherapy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 12, pp. 1–18, 2018.
- [112] C. Wang, Y. Ye, Q. Hu, A. Bellotti, and Z. Gu, "Tailoring Biomaterials for Cancer Immunotherapy: Emerging Trends and Future Outlook," *Adv. Mater.*, vol. 29, no. 29, pp. 1–24, 2017.
- [113] T. H. Tran *et al.*, "Nanoparticles for dendritic cell-based immunotherapy," *Int. J. Pharm.*, vol. 542, no. 1–2, pp. 253–265, 2018.
- [114] W. Park, Y.-J. Heo, and D. K. Han, "New opportunities for nanoparticles in cancer immunotherapy," *Biomater. Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–10, 2018.
- [115] S. Gao *et al.*, "Engineering nanoparticles for targeted remodeling of the tumor microenvironment to improve cancer immunotherapy," *Theranostics*, vol. 9, no. 1, pp. 126–151, 2019.
- [116] B. Kwong, H. Liu, and D. J. Irvine, "Induction of potent anti-tumor responses while eliminating systemic side effects via liposome-anchored combinatorial immunotherapy," *Biomaterials*, 2011.
- [117] Z. Xu, Y. Wang, L. Zhang, and L. Huang, "Nanoparticle-delivered transforming growth factor- $\beta$  siRNA enhances vaccination against advanced melanoma by modifying tumor microenvironment," *ACS Nano*, 2014.
- [118] S. Y. Li *et al.*, "Restoring anti-tumor functions of T cells via nanoparticle-mediated immune checkpoint modulation," *J. Control. Release*, 2016.
- [119] G. N. Shi *et al.*, "Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine," *Biomaterials*, 2017.
- [120] H. D. Han *et al.*, "In vivo stepwise immunomodulation using chitosan nanoparticles as a platform nanotechnology for cancer immunotherapy," *Sci. Rep.*, 2016.
- [121] G. Schreibelt *et al.*, "The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells," *Blood*, 2012.

- [122] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. 2008.
- [123] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, 2018.
- [124] K. Yin Win and S. S. Feng, "Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs," *Biomaterials*, vol. 26, no. 15, pp. 2713–2722, 2005.
- [125] P. Foroozandeh and A. A. Aziz, "Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 13, 2018.
- [126] D. Fong and C. D. Hoemann, "Chitosan immunomodulatory properties: Perspectives on the impact of structural properties and dosage," *Futur. Sci. OA*, vol. 4, no. 1, 2018.
- [127] C. Foged, B. Brodin, S. Frokjaer, and A. Sundblad, "Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model," *Int. J. Pharm.*, vol. 298, no. 2, pp. 315–322, 2005.
- [128] M. O. Oyewumi, A. Kumar, and Z. Cui, "Nano-microparticles as immune adjuvants: Correlating particle sizes and the resultant immune responses," *Expert Review of Vaccines*. 2010.
- [129] M. A. Mohammed, J. T. M. Syeda, K. M. Wasan, and E. K. Wasan, "An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery," *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 4, 2017.
- [130] S. Sreekumar, F. M. Goycoolea, B. M. Moerschbacher, and G. R. Rivera-Rodriguez, "Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles," *Sci. Rep.*, 2018.
- [131] C. Mattu, R. Li, and G. Ciardelli, "Chitosan nanoparticles as therapeutic protein nanocarriers: The effect of pH on particle formation and encapsulation efficiency," *Polym. Compos.*, 2013.
- [132] P. Calvo, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, "Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers," *J. Appl. Polym. Sci.*, 1997.
- [133] S. Prasad *et al.*, "Polymer nanoparticles containing tumor lysates as antigen delivery vehicles for dendritic cell-based antitumor immunotherapy," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2011.

- [134] B. Zeng *et al.*, “Self-adjuvanting nanoemulsion targeting dendritic cell receptor Clec9A enables antigen-specific immunotherapy,” *J. Clin. Invest.*, 2018.
- [135] A. De Titta *et al.*, “Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 49, pp. 19902–19907, 2013.