

Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Evaluación del efecto de nanopartículas de N-trimetil
quitosán en la endocitosis y activación lisosomal de
células J774”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. Brenda Iliana Magaña Trejo

Para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias

En la especialidad de:

Genética y Biología Molecular

Directores de tesis:

Dr. Efraín Garrido Guerrero

Dra. Claudia Oliva Mendoza Barrera

Ciudad de México

Julio, 2024

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer (Laboratorio 1) del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero mediante los fondos de los proyectos CONAHCYT CB-256514 y CF-2023-1-1178; y en el Laboratorio de Nanobiotecnología de la Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Edificio FM6-301) bajo la co-dirección de la Dra. Claudia Oliva Mendoza Barrera con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) mediante los fondos del proyecto 286652.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por la beca 2018-000068-02NACF-29222, apoyo que se agradece profundamente.

Al Dr. Efraín Garrido por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo, por aceptar un tema distinto y enseñarme a ser resiliente.

A la Dra. Claudia Mendoza, por toda la paciencia durante el proceso experimental, todas esas horas de asesoría sobre metodologías que no eran mi mayor fuerte, por la extensión de beca al final de mi trabajo experimental, y también por recordarme lo importante que la sororidad existe y es de suma importancia dentro de la ciencia.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega, al Dr. Jaime García Mena, al Dr. Rubén Ruiz y al Dr. Víctor Manuel Altúzar Aguilar por formar parte de mi comité tutorial, por el tiempo dedicado a la revisión y por las contribuciones a esta tesis.

Al Dr. Aldo Yair Tenorio Barajas de la Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas de la BUAP, por su apoyo técnico en la síntesis por microfluídica y su asesoría en cada paso de este proyecto. Además de por toda su paciencia y su apoyo incondicional durante el proyecto, por ayudarme a crecer y a llevar este proyecto a buen término.

Al auxiliar del laboratorio el Biol. Pedro Chávez Olmos por su asesoramiento y apoyo en todo momento, pero en especial durante los procesos relacionados a las microscopías electrónica de transmisión y confocal. Al auxiliar del laboratorio 12 del departamento de Genética y Biología Molecular el Biol. Jesús Pablo Gómez Islas, por todo su apoyo durante el uso del microscopio confocal.

Al Dr. Vicente Garibay Febles del Instituto Mexicano del Petróleo y la bióloga Lulú de la Unidad de Microscopía Electrónica de LANSE-CINVESTAV, por su apoyo para la observación de muestras en el microscopio electrónico de transmisión.

Al Dr. Sergio Tomas Velázquez del Departamento de Física del CINVESTAV y el Dr. Martín Guadalupe Zapata Torres del CICATA-IPN Unidad Legaria por permitirnos realizar las mediciones de XPS, al Dr. Jaime Santoyo Salazar del departamento de Física del CINVESTAV por permitirnos usar su liofilizadora siempre que era necesario.

Al Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde de la UAM-Azcapotzalco por su apoyo en la realización de las técnicas de caracterización y su asesoría incondicional.

A Gabriela Mora por su apoyo durante todos los trámites y procedimientos administrativos.

*In this quiet moment
I give myself
Permission to acknowledge my progress;
To focus less on the distance
I've still left to go,
And more on the mighty distance
I've come.*
Beau Taplin

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia, que siempre ha estado para mí, aun en los peores momentos. A mi mamá que me enseñó la importancia de la constancia y trabajo duro. A mis hermanos que no me soltaron nunca, que siempre me escucharon y me hicieron ver la luz al final del arduo camino que me esperaba. Gracias por ponerse en mi lugar y siempre desear lo mejor para mí, lo que sea que eso significara en el momento.

A mi compañero de vida, mi amigo, la luz de mis días, mi risa y mi lugar seguro, agradezco infinitamente el haber conocido lo que es el amor bonito e incondicional a través de ti. Por haber reencendido la llama interna de mi ser, y por cuidarla como la chispa preciada que es. Por estar a mi lado en cada momento, aun cuando me sentía menos merecedora de amor, por ayudarme a ver que mi valor va más allá de mis logros académicos. Gracias por ser mi hogar.

A Pris y a Mariana, por ser mis mejores amigas, porque hemos crecido juntas a lo largo de los años y no nos hemos alejado a pesar de la distancia. Porque cada logro es una victoria para nosotras; gracias por salvar mi vida y mi salud mental durante la pandemia, sin ustedes no sé qué hubiera hecho.

Al equipo de Global Youth, porque a pesar del corto tiempo que llevo trabajando con ellos me han dado un nuevo propósito y un sentido de pertenencia increíble. Gracias por permitirme unirme al equipo y cambiar tantas vidas alrededor de nosotros. En especial gracias a Gio por ser el mejor jefe del mundo y un gran amigo, siempre agradeceré la oportunidad de trabajar contigo y el cómo has cambiado mi vida. Nuevamente agradezco a Pris, porque de no ser por ti no estaría en Globi. Gracias por confiar en mi talento, y siempre alentarme a seguir avanzando y tomar más responsabilidades.

A Dany y Adrián, por haber sido mis roomies durante la etapa más difícil de mi vida. Jamás olvidaré nuestros días de pandemia juntos y la increíble amistad que forjamos.

A SORECE A.C. por acompañar mi proceso terapéutico a lo largo de los años. Por ayudarme a consolidar mi conocimiento y conciencia alrededor del feminismo. Agradezco infinitamente la seguridad que me ha dado el sentirme acompañada de mujeres poderosas que, aunque no conozco, se encuentran en el mismo camino y resisten y sobreviven a problemas similares.

A la comunidad que he formado desde que inicié el camino del descubrimiento de mi neurodivergencia, por ayudarme a formar hábitos más saludables, disminuir el masking y priorizar mi autocuidado. Gracias a la información y a la comunidad he podido sobrellevar mi burnout.

A todos aquellos que estuvieron en mi camino, y más que apoyar mis pasos fueron un reto digno de sortear. Sin las lecciones que me enseñaron, sin los obstáculos que pusieron en mi camino no me encontraría aquí el día de hoy. El logro de este grado es a pesar de ustedes.

Abreviaturas

DENV	Dengue Virus
VLP	Virosomas
APCs	Células Presentadoras de Antígeno
nm	Nanómetro
µm	Micrómetro
PEG	Polietilen glicol
PLG	Copolímero de PLGA
PLGA	Ácido poliláctico co-glicólico
IgG	Inmunoglobulina G
NPs	Nanopartículas
VHC	Virus de Hepatitis C
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ISCOM	Complejos Inmunoestimuladores
MPS	Sistema fagocítico mononuclear
RES	Sistema reticuloendotelial
QN	Quitosán o quitosano
TPP	Tripolifosfato
TMQ	Trimetil quitosán o Trimetil quitosano
O ₂	Molécula de oxígeno
CO ₂	Dióxido de carbono
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
TGA	Análisis Termogravimétrico
XPS	Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X

CPP	Péptidos penetrantes de células
QD	Puntos cuánticos (<i>Quantum dots</i>)
DC	Células Dendríticas
IgM	Inmunoglobulina M
BSA	Albúmina de Suero Bovino
AuNPs	Nanopartículas de Oro
HA	Hemaglutinina
IFN- α	Interferón alfa
IFN- γ	Interferón gamma
HB	Virus de Hepatitis B
UVI-DENV	Virus de Dengue inactivado por UV
BCG-QN-NPs	Nanopartículas de quitosán con péptidos adyuvantes del bacilo de Calmette-Guérin
NaOH	Hidróxido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
CICATA	Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
SFB	Suero Fetal Bovino
OPTIMEM	Medio reducido en suero
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Contenido

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	2
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	5
Abreviaturas	6
Índice de figuras	10
Índice de tablas	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	15
1. Nanopartículas como acarreadores	16
2. Nanopartículas como adyuvantes	19
3. Biocompatibilidad	23
3.1 Tipos de materiales para nanopartículas biocompatibles	24
ANTECEDENTES	27
1. Efectos de las propiedades superficiales en las interacciones nanopartícula – célula	27
1.1 Propiedades inmunológicas de nanomateriales	28
1.2 Evaluación toxicológica de la seguridad de los materiales	33
1.1 Biodegradación de nanomateriales	37
2. Uso de nanopartículas como acarreadores y adyuvantes en infecciones virales	39
3. Nanopartículas poliméricas como acarreadores de fármacos	39
JUSTIFICACIÓN	41
HIPÓTESIS	42
OBJETIVO GENERAL	42
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
METODOLOGÍA	43
Síntesis de N-trimetil quitosán	43
Síntesis microfluídica de nanopartículas	43
METODOLOGÍAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	44
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	44
Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	44

Análisis termogravimétrico	45
Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X	45
CULTIVO CELULAR	46
Células J774	46
Células HaCaT	46
Ensayo de proliferación celular mediante azul alamar	46
Ensayo de activación lisosomal	46
Ensayos de inhibición de endocitosis mediante azida de sodio y dyngo-4	46
Microscopía confocal de células vivas.....	47
RESULTADOS	48
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	48
Nanopartículas de N- trimetil quitosán	48
Nanopartículas de N- trimetil quitosán cargadas con 12 µg de BSA.....	49
ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO.....	50
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	52
ESPECTROSCOPIA DE FOTOELECTRONES DE RAYOS X	54
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON AZUL ALAMAR.....	57
PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS HACAT.....	57
PROLIFERACIÓN CELULAR EN JJ74	58
MICROSCOPIA CONFOCAL DE CÉLULAS VIVAS	59
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES.....	71
Bibliografía	73
ANEXOS	81
ANEXO 1. Gráficos de distribución de tamaño de otros lotes de nanopartículas.....	81
ANEXO 2. Gráficos adicionales de análisis termogravimétrico.	82

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de tamaño de las nanopartículas usadas como adyuvantes (Zhao et al., 2013).	21
Figura 2. Tipos de asociación nanopartícula-antígeno (Zhao et al., 2013).	22
Figura 3. Efecto de las características fisicoquímicas de las nanopartículas en procesos celulares (Naahidi et al., 2013).	24
Figura 4. Procesos involucrados en la interacción de nanopartículas con la membrana celular (Dobrovolskaia & Neil, 2007).	32
Figura 5. Vías fagocíticas involucradas en la internalización de distintos tipos de nanopartículas (Dobrovolskaia & Neil, 2007).	33
Figura 6. Análisis de captación de nanopartículas en células mediante citometría de flujo: A esparcimiento de luz por una célula que no está asociada con ninguna nanopartícula; B nanopartículas se adhieren a la superficie celular, lo que conduce a un aumento en el esparcimiento hacia adelante (FSC) y el esparcimiento lateral (SSC); C internalización de nanopartículas por la célula, lo que aumenta sólo SSC; D internalización de nanopartículas fluorescentes lo que causa aumento en SSC e intensidad de fluorescencia (Dhawan & Sharma, 2010).	37
Figura 7. Propiedades de las nanopartículas que se usan como base para poder monitorear toxicidad a través de distintos ensayos previamente reportados por (Dhawan & Sharma, 2010).	38
Figura 8. Distintos enfoques para evaluar toxicidad durante el tratamiento con nanopartículas que tienen influencia en el sistema inmune (Dobrovolskaia et al., 2008).	38
Figura 9. a) Micrografía TEM de nanopartículas de N-trimetil quitosán "vacías" (NP-TMQ) y b) distribución de diámetro promedio, primera desviación estándar y coeficiente de variación.	48
Figura 10. a) Micrografía TEM de nanopartículas de N-trimetil quitosán con 12 µg de BSA a cargo y b) distribución de diámetro promedio, primera desviación estándar y coeficiente de variación.	49
Figura 11. a) Gráfico correspondiente a la degradación de la masa de nanopartículas de TMC control y b) con 12 µg de BSA a cargo.	50
Figura 12. Espectro FTIR de las muestras seleccionadas NP_TMQ, NP_TMQ/BSA12 y NP_TMQ/BSA12-FITC. Se incluyen QN y BSA liofilizado como controles.	53
Figura 13. Gráfico XPS survey de muestras de nanopartículas vacías, con 12 µg de BSA, 55 µg de BSA y BSA "desnuda".	54
Figura 14. Espectros a detalle de XPS de los orbitales a) Fósforo b) Nitrógeno c) Carbono d) Azufre.	56
Figura 15. Monitoreo de proliferación celular de células HaCaT que fueron tratadas con distintas dosis de nanopartículas con 12ug de BSA.	57
Figura 16. Monitoreo de proliferación celular de células J774 que fueron tratadas con distintas dosis de nanopartículas con 12ug de BSA.	58

Figura 17. Imagen obtenida a través de microscopía confocal con la localización de nanopartículas con BSA-FITC (muestra NP_TMQBASA12-FITC) en células J774. a) 3 h y b) 26 h, post-exposición (Barra de escala = 25 nm).	59
Figura 18. Células J774 tratadas con lysobrite para evaluar activación lisosomal a distintos tiempos post-exposición a) control, 3 h; b) nanopartículas BSA-FITC (muestras NP_TMQ/BSA12-FITC), 3 h; c) control, 26 h y d) nanopartículas BSA-FITC (muestras NP_TMQ/BSA12-FITC), 26 h (Barra de escala = 25nm).....	60
Figura 19. Representación de los datos semicuantitativos de fluorescencia de lisosomas de las células J774 tratadas con nanopartículas. Dichos datos fueron analizados por la prueba de U de Mann Whitney para datos no paramétricos.	61
Figura 20. Co-localización de marcas verdes provenientes de las nanopartículas de BSA-FITC en células J774 a distintos tiempos post-exposición. a), b) y c) 3 h; d), e) y f) 26 h....	62
Figura 21. Células J774 tratadas con nanopartículas y azida de sodio para evaluar la inhibición de la endocitosis. a) y b) Control; c) y d) células tratadas con nanopartículas BSA-FITC y sin inhibidor; e) y f) células tratadas con azida de sodio y nanopartículas BSA-FITC y sin inhibidor.	62
Figura 22. Proceso de nucleación en la síntesis de nanopartículas reportado por (Sakrani et al., 2014).	65
Figura 23. Proceso de maduración de lisosomas a partir de la endocitosis. Reportado por Elsabahy & Wooley, 2013.	70
Figura 24. Cronología idónea para seguir durante la evaluación de nanomateriales en sistemas biológicos (Kettiger, et. al, 2013).	70
Figura 25. Distribución de tamaño de nanopartículas cargadas con 12 µg de BSA-FITC observadas mediante TEM.....	81
Figura 26. Distribución de tamaño de nanopartículas cargadas con 55 µg de BSA observadas mediante TEM.	81
Figura 27. Gráfico de TGA con patrón de degradación de quitosán en polvo (liofilizado). ..	82
Figura 28. Gráfico de TGA con patrón de degradación de TMQ en polvo (liofilizado).....	82
Figura 29. Gráfico de TGA correspondiente al patrón de degradación de nanopartículas cargadas con 55 µg de BSA.....	83

Índice de tablas

Tabla 1. Datos morfométricos correspondientes a las distintas síntesis de nanopartículas por microfluídica.	49
Tabla 2. Etapas de degradación y pérdida de masa de muestras fabricadas. Las temperaturas corresponden a la primera derivada (Dm) de la etapa de degradación. Se incluyeron muestras de QN y TMQ liofilizadas.....	51
Tabla 3. Contenido atómico porcentual de cada uno de los elementos porcentuales detectados en los espectros XPS survey de las muestras fabricadas.	55
Tabla 4. Valores de p resultado de pruebas de T múltiples realizadas en comparación de los tratamientos de nanopartículas vs el control sin tratamiento tanto en células HaCaT como en J774.....	58

RESUMEN

Este trabajo se centra en la investigación de nanopartículas de N-trimetil quitosán y su interacción con células J774, con el fin de comprender mejor los procesos celulares implicados en la absorción y el destino de estas partículas en el sistema inmunitario. Se destaca la relevancia de los macrófagos en la respuesta inmune y la importancia de desarrollar nanoterapias seguras y efectivas.

La hipótesis consiste en que las nanopartículas de N-trimetil quitosán serán internalizadas por las células J774 principalmente a través de procesos de endocitosis, activando lisosomas y provocando la degradación intracelular. Dentro del trabajo realizado se incluyen las características fisicoquímicas del quitosán y su potencial para mejorar la permeabilidad celular, así como el uso de nanoacarreadores en formulaciones de vacunas, resaltando la importancia del tamaño de las nanopartículas y la técnica microfluídica para controlar su tamaño.

Se aborda la estabilidad térmica de las nanopartículas y la encapsulación de proteína, destacando el uso de técnicas como XPS para verificar la posición de la proteína dentro de la estructura de las nanopartículas. Se analiza la toxicidad de las nanopartículas en células HaCaT y J774, así como la importancia de evaluar el estado de diferenciación de las células J774. Se discuten las posibles vías de endocitosis y el impacto en la respuesta inmune. Finalmente, se concluye que las nanopartículas de N-trimetil quitosán muestran potencial como acarreadores para el sistema inmunitario, pero se necesitan más estudios para comprender completamente su efecto y su posible uso en terapias.

ABSTRACT

One of the fundamental objectives of nanomedicine is the development of safe and effective nanotherapies. Then, it is essential to understand the biological interactions between nanoparticles and immune cells. This work focuses on the manufacture by the microfluidic technique of N-trimethyl chitosan nanoparticles and their interaction with J774 cells to elucidate the cellular processes involved in absorption and their impact on the immune system, mainly through endocytosis processes, activating lysosomes and causing intracellular degradation. The manufactured N-trimethyl chitosan nanoparticles were characterized in their morphology, dispersion, and chemical and thermal composition. Likewise, the encapsulation of the cargo protein used was demonstrated. Their potential to improve cell permeability and use as nanocarriers in future vaccine formulations was demonstrated. The toxicity of the nanoparticles in HaCaT and J774 cells was studied, as well as the importance of evaluating the differentiation status of J774 cells. Thus, the possible endocytosis pathways and the impact on the immune response were discussed. This allowed us to conclude that N-trimethyl chitosan nanoparticles show potential as carriers for the immune system. Still, more studies are required to understand their effectiveness and possible use in therapies.

INTRODUCCIÓN

Los acarreadores o sistemas de administración de medicamentos, fármacos o biomoléculas se consideran como una alternativa para controlar con precisión las tasas de su liberación o dirección a un sitio específico del cuerpo. La tecnología de acarreadores ofrece un enfoque “inteligente” para la administración de fármacos o biomoléculas acoplados (dentro o sobre su superficie), a una partícula portadora como microesferas, nanopartículas, liposomas, etc., que modulan las características de liberación, absorción o adsorción de éstos. Los vehículos acarreadores constituyen una parte importante de este sistema de suministro en virtud de su pequeño tamaño y características de transporte eficientes. Ofrecen numerosas ventajas en comparación con las formas de dosificación convencionales, como una mejor eficiencia, baja o nula toxicidad, especificidad y modelos personalizados para el paciente (Kumar, Chandiran, Bhavya, & Sindhuri, 2011).

Hay varias razones por las cuales el uso de nanoacarreadores, como agentes terapéuticos, de diagnóstico, así como de suministro de medicamentos, es importante. Una de ellas es que los medicamentos tradicionales disponibles para administración oral o inyectable no siempre se fabrican como la formulación óptima para cada producto. Aquellos que contienen proteínas o ácidos nucleicos requieren algún tipo de sistema portador innovador para mejorar su eficacia y protegerlos de la degradación no deseada. En segundo lugar, el desarrollo de nuevos sistemas de suministro de medicamentos proporciona otra ventaja para que las ventas farmacéuticas se ramifiquen. La entrega específica de fármacos está impulsando a las compañías farmacéuticas a desarrollar nuevas formulaciones de medicamentos existentes con el objetivo de beneficiar al paciente (Rizvi & Saleh, 2018).

El término "adyuvante" se deriva de la palabra latina *adjuvare* que significa ayudar, la cual aplica para cualquier material que auxilie a los antígenos a aumentar la respuesta inmune humoral y/o celular. Su empleo se remonta a los años cincuenta del siglo pasado, cuando se demostró que había una mayor respuesta de la antitoxina a los toxoides tetánicos y diftéricos si se empleaban mezclados con compuestos como agar, lecitina, aceite de almidón o saponina, entre muchos otros. Desde entonces se han desarrollado múltiples formulaciones adyuvantes, y algunas de ellas han sido evaluadas en ensayos clínicos. Sin embargo, su toxicidad y efectos secundarios fueron las razones por las cuales la mayoría de estos nunca fueron aceptados para vacunación humana (Gupta & Siber, 1995). Sus efectos secundarios adversos de dichas formulaciones se atribuyen a los mecanismos involucrados en el potencial adyuvante. Por ejemplo, adyuvantes como las emulsiones de aceite, compuestos minerales, liposomas o microesferas de polímeros biodegradables generan reacciones locales por la formación de depósitos en el sitio de inyección. Por ello, se evalúa un equilibrio entre la toxicidad y el potencial adyuvante en función del análisis de riesgo-beneficio. En el caso particular de las vacunas infantiles de rutina, el potencial adyuvante puede estar restringido a los antígenos dado que la seguridad es el objetivo principal considerado dado que es destinado a bebés normales y sanos. Entonces, en general, un adyuvante vacunal de

todos los grupos etarios saludables, debe generar una tasa muy baja de efectos secundarios adversos (Gupta & Siber, 1995).

Actualmente, los adyuvantes han probado ser componentes clave en las vacunas. Los avances en el área biotecnológica han permitido el diseño de nuevos diseños de vacunas con antígenos recombinantes y componentes altamente purificados que dan como resultado perfiles de seguridad bastante robustos. Sin embargo, la inmunización con proteínas antigénicas purificadas resulta en una estimulación débil o nula de respuesta de células T, además de que suelen necesitarse múltiples dosis para estimular una respuesta de anticuerpos adecuada. Por ello, se considera que dichos antígenos tienen un potencial inmunogénico mucho menor comparado con las formulaciones que incluyen patógenos atenuados o inactivados debido a que éstos poseen adyuvantes de manera inherente que se pueden presentar como proteínas, lípidos u oligonucleótidos. Por otro lado, es importante mencionar que los adyuvantes juegan un papel crucial en cuestión de ampliar la respuesta de anticuerpos, lo cual impacta en aquellas formulaciones en donde se debe cubrir una variación antigénica, como es el caso del virus del dengue (DENV) quien tiene múltiples serotipos virales. Entonces, los adyuvantes son una opción atractiva cuando se trata de aumentar la eficacia de antígenos débiles (Reed et al., 2013) (Kumar, Chandiran, Bhavya, & Sindhuri, 2011; Reed, Orr, & Fox, 2013).

Un adyuvante puede ser seleccionado de acuerdo con los efectos que se desea estimular, es decir, existen distintos tipos de adyuvantes para múltiples necesidades. Ellos se dividen en tres grupos: a) sistemas acarreadores, b) moléculas inmunomoduladoras que están dirigidas a activar respuesta inmune específica y c) una combinación de ambas.

Los adyuvantes que combinan ambas características son representados comúnmente por liposomas, virosomas (VLPs) o nanopartículas, que pueden variar en tamaño y forma, pero que cumplen la función de acarrear los antígenos de interés y además pueden mejorar la presentación de éstos ante las células presentadoras de antígeno (APCs). Dentro de la formulación de dichos adyuvantes el tamaño de partícula y su dispersión, forma, carga superficial, interacción con el antígeno, la ruta de administración, entre otros, son parámetros que deben considerarse dado su potencial de afectar el tiempo de vida y la actividad biológica (Reed et al., 2013).

1. Nanopartículas como acarreadores

En las últimas décadas, la nanotecnología se ha enfocado a la fabricación de nanopartículas (NP) para un amplio rango de aplicaciones, particularmente biomedicina. Su aplicación ha generado nuevas rutas de fabricación para crear nuevas formulaciones de administración de fármacos, con objeto mimetizar los procesos biológicos. Las nanopartículas son partículas con un rango de tamaño entre 1 nm y 100 nm. Sin embargo, para la aplicación médica se han aceptado tamaños promedio de 200 a 300 nm. Entonces, una de las áreas de estudio

más importantes en nanomedicina ha sido la creación de sistemas de administración de fármacos empleando nanopartículas (Cohen et al., 2009; Rizvi & Saleh, 2018).

El paradigma del uso de nanopartículas como vehículos farmacéuticos para mejorar la eficiencia *in vivo* de muchos medicamentos, se estableció en la última década tanto en investigación farmacéutica como en entornos clínicos. Numerosos sistemas de entrega de fármacos basados en nanopartículas y sistemas de focalización de fármacos están actualmente desarrollados o en desarrollo. Su uso tiene como objetivo minimizar la degradación del fármaco tras la administración, prevenir efectos secundarios indeseables, así como aumentar la biodisponibilidad del fármaco y de la fracción del fármaco acumulada en el área patológica. Además, se espera que los portadores de fármacos, especialmente los de administración parenteral, sean fáciles y razonablemente baratos para fabricarse, biodegradables, tener un tamaño de partícula uniforme, poseer una alta capacidad de carga, demostrar circulación prolongada e, idealmente, acumularse de manera específica o no específica en sitios patológicos a tratar (Torchilin, 2006).

Dentro de la categoría de acarreadores de fármacos, los liposomas, las micelas y las nanopartículas poliméricas son las más estudiadas, además de que poseen las características más adecuadas para la encapsulación de muchos fármacos y agentes de diagnóstico, aunque sistemas de múltiples materiales biocompatibles altamente específicos se encuentran en desarrollo. Los nanoacarreadores multifuncionales y selectivos a estímulos específicos puede incrementar la eficiencia del medicamento transportados. Se espera que estas funcionalidades proporcionen: (a) circulación prolongada en la sangre y la capacidad de acumularse en diversas áreas patológicas, (b) capacidad para reconocer y unir específicamente tejidos o células objetivo a través del ligando específico unido a la superficie (en este caso se emplean anticuerpos monoclonales, así como sus fragmentos Fab y algunas otras moléculas), (c) capacidad para responder estímulos locales característicos del sitio patológico, por ejemplo, liberando un fármaco atrapado o actuando específicamente sobre las membranas celulares bajo el pH o temperatura anormales en sitios de enfermedad y (d) capacidad de penetrar dentro de las células sin pasar por la degradación lisosómica para una focalización eficiente de los objetivos intracelulares del fármaco, entre otros (Rizvi & Saleh, 2018; Torchilin, 2006).

Las nanopartículas, basadas en polímeros biodegradables muestran algunas ventajas en términos de estabilidad tanto durante el almacenamiento como en los tratamientos *in vivo*. Éstas pueden consistir en una matriz polimérica (nanoesferas) o en un sistema de depósito en el que un núcleo está rodeado por una delgada pared polimérica (nanocápsulas). Los polímeros adecuados para la preparación de nanopartículas incluyen poli-alquilcianoacrilatos, poli-malonato de metilideno y poliésteres tales como ácido poli-láctico, ácido poli-glicólico, poli (ϵ -caprolactona) y sus copolímeros. Los fármacos lipofílicos, que tienen cierta solubilidad en la matriz polimérica o en el núcleo de las nanocápsulas, se incorporan más fácilmente que los compuestos hidrofílicos, aunque estos últimos pueden

absorberse en la superficie de la partícula. Los métodos para la preparación de nanopartículas pueden comenzar desde un monómero o desde un polímero preformado. Los posibles beneficios terapéuticos de los portadores de drogas coloidales dependen de su distribución dentro del organismo. Después de la administración intravenosa, éstas no pueden extravasarse, excepto en tejidos con un endotelio capilar discontinuo; es decir, el hígado, el bazo y la médula ósea. Incluso en estos órganos, el tamaño de los espacios entre las células endoteliales (aproximadamente 100 nm) significa que solo las partículas más pequeñas pueden penetrar en el tejido. Los portadores pueden extravasarse en tumores sólidos y en sitios inflamados o infectados, donde el endotelio capilar es defectuoso. Sin embargo, para los nanoportadores coloidales 'convencionales', que tienen superficies más o menos hidrófobas, el destino habitual es la opsonización por proteínas plasmáticas, seguida de la absorción por las células fagocíticas: leucocitos polimorfonucleares en la sangre o macrófagos fijos, particularmente las células Kupffer en el hígado. La activación del complemento por la vía alternativa es un componente importante del reconocimiento y la captación del nanoacarreador, pero también interviene la opsonización por otras proteínas plasmáticas, por ejemplo, la adsorción no específica de IgG (Barratt, 2000).

A pesar de muchos avances, los nanoacarreadores de medicamentos aún enfrentan varios desafíos, incluyendo variabilidad en respuesta inmune, dificultad para lograr una alta selectividad blanco y una baja concentración terapéutica en los compartimentos subcelulares blanco. Estos desafíos surgen de la complejidad de los obstáculos biológicos que deben ser superados por los nanoacarreadores antes de lograr su objetivo terapéutico. Desde la administración hasta la actividad farmacológica, varios obstáculos limitan su eficacia, incluyendo la actividad del retículo endoplásmico y la estabilidad de la actividad renal, extravasación, acumulación de fármacos, internalización celular y, en algunos casos, escape endosómico. Cada uno de estos obstáculos requiere partículas de atributos diferentes y a menudo contradictorios. Por ejemplo, la modificación de la superficie con polietilenglicol (PEG) ofrece una circulación prolongada de portadores a través de la minimización de sus interacciones con el sistema inmune. Sin embargo, la misma propiedad de PEG compromete su capacidad de interactuar con el blanco y, por lo tanto, reduce la acumulación del fármaco de interés. Una aproximación es el diseño de acarreadores adaptativos cuyas propiedades se pueden cambiar "en tiempo real" para navegar a través de diversas tareas biológicas complejas, adaptando sus propiedades como función del tiempo o en respuesta a un estímulo externo (Yoo et al., 2011).

Particularmente, el efecto del tamaño de las nanopartículas (NPs) en sus propiedades de transporte y la eficiencia de entrega sigue siendo poco conocido. Ello radica en gran parte al limitado número de métodos para fabricar nanopartículas con un tamaño bien controlado y un alto grado de uniformidad. Se ha demostrado que el tamaño de partícula incide directamente en la modulación de sus interacciones con el medio biológico después de la administración, incluyendo la unión molecular y la modificación de la superficie de ésta, la

unión de partícula-célula, la internalización y el tráfico intracelular, la distribución vascular y la extravasación y difusión de tejidos, dictando así la eficiencia general de entrega. Entonces, el desarrollo de métodos que permitan monodispersidad de las nanopartículas preparados a partir de una amplia gama de materiales es fundamental.

El autoensamblado de bloques de construcción poliméricos en nanopartículas con propiedades fisicoquímicas bien definidas (tamaño, forma, química de la superficie y funcionalidad) es uno de los mecanismos para fabricar nanoacarreadores de administración de medicamentos y herramientas de diagnóstico. Generalmente se basa en interacciones intermoleculares secundarias de tipo hidrófobas-hidrófobas, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, entre otras. Mediante la modulación de los componentes químicos, se pueden alterar los procesos de autoensamblado para controlar la estructura y las propiedades fisicoquímicas de los componentes. Adicionalmente, los polímeros con distribuciones de peso molecular estrechos permiten fabricar nanopartículas con baja heterogeneidad. Además del control de las propiedades fisicoquímicas de los polímeros, la dinámica de mezcla y las condiciones del disolvente, el método de fabricación de las nanopartículas poliméricas juega un papel crucial en el tamaño y las propiedades deseadas (Hickey et al., 2015).

Para que un dispositivo de administración de medicamentos logre los beneficios de interés, debe estar presente en el torrente sanguíneo el tiempo suficiente para alcanzar o reconocer el sitio terapéutico blanco. Sin embargo, la opsonización o eliminación de los portadores de fármacos en nanopartículas del cuerpo por el sistema fagocítico mononuclear (MPS) o sistema reticuloendotelial (RES), es un obstáculo importante para la realización de estos objetivos. Los macrófagos de la MPS tienen la capacidad de eliminar las nanopartículas no protegidas del torrente sanguíneo en cuestión de segundos después de la administración intravenosa, lo que las hace ineficaces como dispositivos de administración de fármacos específicos del sitio. Estos macrófagos, que son típicamente células de Kupffer o macrófagos del hígado, no pueden identificar directamente las nanopartículas en sí mismas, sino que reconocen proteínas específicas de opsonina unidas a la superficie de las partículas. En términos generales, las opsoninas son cualquier componente del suero sanguíneo que ayuda en el proceso de reconocimiento fagocítico, pero las proteínas del sistema del complemento como C3, C4, C5 y las inmunoglobulinas suelen ser las más comunes. Se han desarrollado varios métodos para enmascarar nanopartículas para evitar temporalmente el reconocimiento por parte del MPS y aumentar su vida media en la circulación sanguínea. Algunos de los reportados han sido Owens y Peppas, 2006, sistemas basados en polietilenglicol, reportando la menor ocurrencia de efectos nocivos *in vivo* .

2. Nanopartículas como adyuvantes

Uno de los retos actuales en el campo de la formulación de vacunas es nuevos adyuvantes y sistemas de administración. Muchas de las vacunas en desarrollo se basan en proteínas

de subunidades purificadas, moléculas recombinantes, péptidos sintéticos o ADN plasmídico. Sin embargo, esta nueva generación de vacunas será menos inmunogénica que las vacunas tradicionales y requerirá mejores adyuvantes y sistemas de administración para inducir respuestas inmunes óptimas. Además, las vacunas no vivas generalmente han demostrado ser ineficaces para inducir una potente inmunidad celular, particularmente del tipo Th1. Las células T cooperadoras se pueden clasificar en los subtipos Th2 y Th1, principalmente en función de su perfil de producción de citocinas, caracterizándose las respuestas Th1 por la producción de interferón. Es probable que las respuestas Th1 permitan el desarrollo de vacunas contra enfermedades infecciosas importantes, como el VHC y el VIH. Los adyuvantes se pueden usar para mejorar la respuesta inmune a los antígenos de la vacuna de varias maneras diferentes, incluyendo: 1) aumentar la inmunogenicidad de los antígenos débiles, 2) mejorar la velocidad y la duración de la respuesta inmune, 3) modular la avidéz del anticuerpo, la especificidad, el isotipo o la subclase distribución, 4) estimular CMI, 5) promover la inducción de la inmunidad de la mucosa, 6) mejorar las respuestas inmunes en individuos inmunológicamente inmaduros o senescentes, 7) disminuir la dosis de antígeno en la vacuna para reducir los costos y 8) ayudar a superar el antígeno competencia en combinación de vacunas (Wendorf et al., 2006).

En los adyuvantes que se encuentran a manera de emulsiones el grado de dispersión se define no sólo por la distribución del tamaño de las partículas, sino también por las fuerzas de fricción al momento de la administración. Debido a lo anterior, es importante tener en cuenta que la dispersión real puede variar entre preparaciones y entre los individuos a los que se les administra. En contraste, las nanopartículas ofrecen la ventaja de poder ser manufacturadas de manera reproducible, monitoreando que su tamaño y composición siempre se encuentre dentro de los límites deseados. Es de resaltar que se pueden añadir fármacos o compuestos inmunogénicos durante el proceso de polimerización de las partículas, o en el caso de moléculas más pequeñas, se pueden adsorber a partículas ya sintetizadas (Kreuter, 1995).

Actualmente se conoce que el uso de nanopartículas en las formulaciones para vacunas permite mejorar la estabilidad del antígeno, su inmunogenicidad, así como la administración dirigida y su liberación lenta. Derivado de ello, el número de candidatos se ha incrementado, a pesar de que las nanopartículas pueden variar en composición, tamaño, forma y propiedades de la superficie entre las distintas formulaciones. Sin embargo, la falta de comprensión sobre el comportamiento de las nanopartículas *in vivo* ha generado preguntas que siguen sin resolverse. Se ha reportado que tanto las características de la superficie como el tamaño de partícula pueden afectar la absorción por parte de las células presentadoras de antígeno (APCs), el tráfico linfático, la calidad y potencia de la respuesta inmune, así como la toxicidad de las formulaciones, por lo que son de importancia para este trabajo (Zhao et al., 2013a).

Una clasificación propuesta de acarreadores incluye:

- Nanopartículas poliméricas
- Nanopartículas inorgánicas
- Liposomas
- Complejos Inmunoestimulantes (ISCOM)
- Virosomas o partículas tipo virus (VLPs)
- Proteínas autoensambladas.

Si el objetivo de un acarreador es su respuesta inmune, su tamaño es una característica fundamental. La **Figura 1** muestra diversos tipos de partículas comparadas respecto a su tamaño, teniendo morfologías y composiciones diversas.

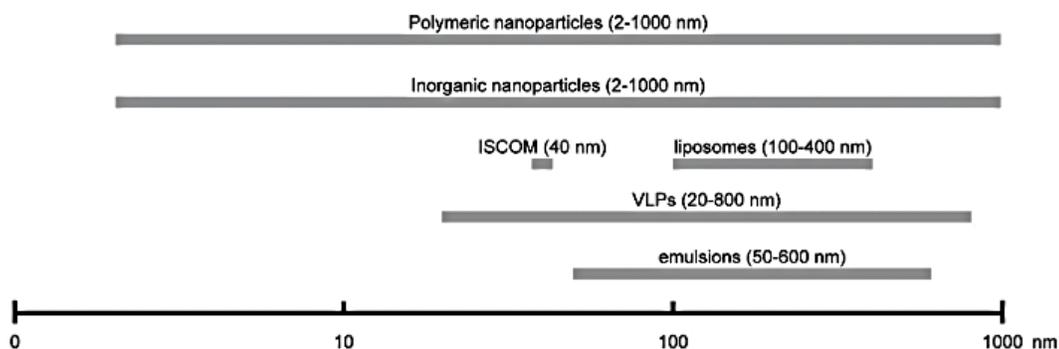


Figura 1. Distribución de tamaño de las nanopartículas usadas como adyuvantes (Zhao et al., 2013).

Debido a que las nanopartículas pueden llegar a tener un tamaño comparable al de ciertos patógenos, se considera que tienen potencial para ser reconocidas fácilmente por las APCs. (Xiang et al., 2006), reportaron que las células dendríticas prefieren partículas similares a las virales, cuyo tamaño oscile entre 20 y 200 nm, mientras que los macrófagos prefieren partículas de mayor tamaño (0.5 – 5 μ m). (Foged et al., 2005; Wischke et al., 2006) demostraron que la carga superficial también juega un rol importante en la activación del sistema inmune puesto que nanopartículas de superficie catiónica inducen un mayor consumo por parte de las células debido a las interacciones electrostáticas con los aniones de la membrana celular.

Otro factor importante que considerar es que los nódulos linfáticos son uno de los principales blancos para “entrega de antígenos”, dado que ahí residen las células B y las células T. Sin embargo, la distribución de las nanopartículas en dichos sitios se ve afectada por su tamaño. Nanopartículas en un rango de 10 a 100 nm pueden penetrar la matriz extracelular fácilmente y por ello son fácilmente captadas por las células dendríticas residentes, mientras que partículas con tamaños mayores a 100 nm suelen persistir en la zona de la aplicación y tienden a ser barridas por las APCs locales. Así mismo, aquellas con un tamaño menor a 10

nm son drenadas a los capilares sanguíneos (Cohen et al., 2009; H. Kim et al., 2010; Xiang et al., 2006).

Para ser considerados como sistemas acarreadores, las nanopartículas deben estar asociadas al antígeno de interés. Sin embargo, este acoplamiento no es estrictamente necesario para potenciar la respuesta inmune, esto debido a que en algunos casos se pueden ocasionar modificaciones no deseadas a la estructura del antígeno (Morel et al., 2011; O'Hagan et al., 1997). Sin embargo, sigue existiendo un gran interés en incorporar antígenos a nanopartículas dado que presentaría la ventaja de acarreo más eficiente, así como un potencial mejoramiento en la maduración de las APCs y la presentación cruzada de antígenos, que generaría una respuesta inmune potente. La **Figura 2** presenta los distintos tipos de asociación entre las partículas y los antígenos.

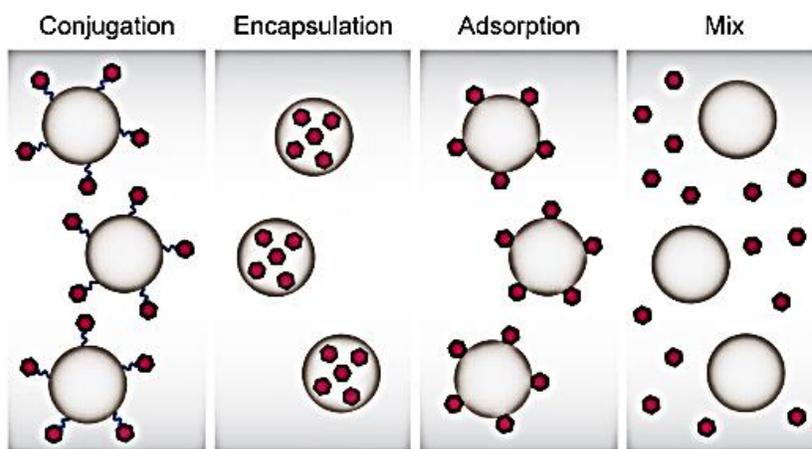


Figura 2. Tipos de asociación nanopartícula-antígeno (Zhao et al., 2013).

De acuerdo con (Zhao et al., 2013), la unión del antígeno a las nanopartículas se puede dar por varios métodos dependiendo de la fuerza con la que se necesite que permanezca adherido. Cuando no sea necesaria una unión altamente estable o buscando cuidar la integridad del antígeno, se puede optar por la adsorción de los antígenos a la superficie. Esta se basa en la interacción de fuerzas electrostáticas entre el antígeno y la partícula. Sin embargo, cuando se desea que la unión sea más estable se realiza una conjugación mediante funcionalización química. En este segundo escenario también se puede encapsular al antígeno durante el proceso de fabricación, siendo liberado por la célula misma.

Las formulaciones de vacunas que comprenden nanopartículas y antígenos pueden clasificarse por acción de nanopartículas en 1) aquellas basadas en *sistemas acarreadores* o 2) en *adyuvantes inmunitarios*. Como sistema de acarreador, las nanopartículas pueden administrar antígenos a las células del sistema inmunitario, es decir, el antígeno y la nanopartícula son ingeridas conjuntamente por la célula inmunitaria, o actúan como un sistema de administración transitorio, es decir, protegen el antígeno y luego lo liberan en la

ubicación deseada. Para que las nanopartículas funcionen como acarreadores, la asociación de antígeno y nanopartículas es típicamente necesaria. Para los enfoques de adyuvantes inmunes, las nanopartículas activan ciertas vías inmunes que podrían mejorar el procesamiento de antígenos y mejorar la inmunogenicidad. Nanopartículas de materiales cristalinos, como los basados en sílice, oro, y fosfato de calcio, se han examinado principalmente para su uso como un sistema de entrega y, por lo tanto, se han diseñado para promover la unión al antígeno. La fijación del antígeno se ha logrado mediante adsorción física simple o métodos más complejos, como la conjugación química o la encapsulación. La adsorción de antígeno en una nanopartícula generalmente se basa en la carga o en la interacción hidrofóbica. Por lo tanto, la interacción entre las nanopartículas y el antígeno es relativamente débil, lo que puede conducir a una rápida disociación del antígeno y la nanopartícula *in vivo*. La encapsulación y la conjugación química proporcionan una interacción más fuerte entre las nanopartículas y el antígeno. En la encapsulación, los antígenos se mezclan con los precursores de nanopartículas durante la síntesis, lo que resulta en la encapsulación del antígeno cuando los precursores forman partículas en una nanopartícula. El antígeno se libera solo cuando la nanopartícula se ha descompuesto *in vivo* o dentro de la célula. Por otro lado, para la conjugación química, el antígeno está químicamente reticulado a la superficie de una nanopartícula. El antígeno es absorbido por la célula junto con la nanopartícula y luego se libera dentro de la célula. En la materia blanda, el sistema de suministro de nanopartículas, como los basados en VLP, ISCOM, ISCOMATRIXTM o liposomas, la unión del antígeno se logra mediante conjugación química, adsorción, encapsulación o fusión a nivel de ADN. Para que las nanopartículas actúen como un potenciador inmune, no es necesario el apego o la interacción entre la nanopartícula y el antígeno, y puede ser indeseable en los casos en que se produce una modificación de la estructura antigénica en la interfaz de la nanopartícula. Se ha demostrado que las nanopartículas de materia blanda, como los adyuvantes basados en emulsión MF59TM y AS03TM, adyuvan a un antígeno diana incluso cuando se inyectan independientemente y antes del antígeno. Sobre la base de esta idea, la formulación de nanopartículas potenciadoras inmunitarias con un antígeno blanco podría ser posible mediante la simple mezcla de nanopartículas y adyuvante, poco antes de la inyección, con una asociación mínima entre nanopartículas y antígeno necesario (Zhao et al., 2013).

3. Biocompatibilidad

La evaluación de la toxicidad y biocompatibilidad de las nanopartículas de interés, son factores fundamentales para que puedan volverse una aplicación clínica real, particularmente es requisito el entendimiento de las propiedades fisicoquímicas que puedan influir en respuestas biológicas adversas (Kunzmann et al., 2011).

3.1 Tipos de materiales para nanopartículas biocompatibles

La composición del material puede incluir metales y partículas inorgánicas tales como oro, plata y óxidos metálicos, materiales a base de polímeros como PLGA y partículas a base de lípidos como nanoliposomas, nanopartículas de lípidos sólidos y nanoemulsiones. Cada sustancia exhibe sus propias propiedades fisicoquímicas, como carga superficial, hidrofobicidad, solubilidad, tamaño, forma y agregación. Derivado de sus propiedades fisicoquímicas, su biocompatibilidad puede variar (**Figura 3**) (Naahidi et al., 2013). Dependiendo del tipo de aplicación, las nanopartículas pueden diseñarse para desencadenar diferentes respuestas biológicas.

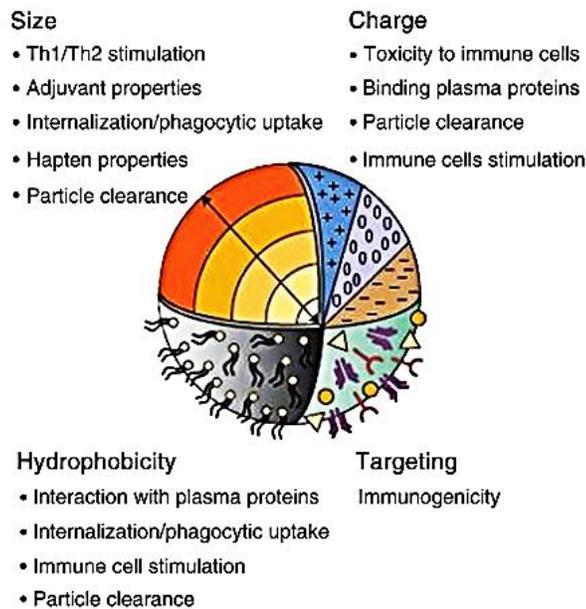


Figura 3. Efecto de las características fisicoquímicas de las nanopartículas en procesos celulares (Naahidi et al., 2013).

Diversos fármacos acoplados a nanopartículas se encuentran en diversas fases en desarrollo en la industria farmacéutica. Algunos han sido aprobados para uso clínico, mientras que otros están siendo estudiados y atraviesan el proceso de aprobación. Los precursores para la fabricación de nanopartículas incluyen: polímeros, cerámicos, metales, semiconductores, carbono y sus compositos.

El grafeno, nanotubos, fullerenos y nanodiamantes son formas alotrópicas del carbono, siendo los polímeros a base de ellos un área importante en la fabricación y aplicación de nanoestructuras. Los fullerenos, son estructuras cerradas cuasi-esféricas. Una capa simple de carbono en 2D, se conoce como grafeno, mientras que los nanotubos son capas de grafeno en forma tubular que pueden ser de pared simple o múltiple. Los fullerenos y los nanotubos de carbono se han propuesto para su uso como acarreadores de fármacos dado que sus propiedades conjugativas y de penetración celular los convierten en competidores de las aplicaciones de administración de fármacos *in vivo*. La funcionalización de su

superficie puede hacer que tanto los nanotubos como los fullerenos, típicamente heterogéneos, sean solubles en agua. Sin embargo, se ha demostrado que los nanotubos de carbono activan el sistema del complemento a través de las vías clásica y alterna, además de que podrían en algunos casos, sobreestimular el sistema del complemento, provocando inflamación y formación de granulomas (Naahidi et al., 2013).

Por otra parte, las nanopartículas poliméricas pueden ser biopoliméricas, sintéticas o compositas, siendo la estructura del polímero la responsable de las propiedades fisicoquímicas, efectividad de carga de drogas, tasa de liberación de fármaco y biodistribución del portador. La polidispersidad del polímero, es decir la combinación heterogénea de longitudes de cadenas, incide en las propiedades biológicas que dependen de la masa molecular. Los polímeros son una opción elegible dado que proporcionan una liberación continua de fármacos cuando son encapsulados, los protegen de las condiciones enzimáticas y degenerativas del cuerpo, pueden ser funcionalizados para ser selectivos y bioacumularse de forma pasiva en tumores, así como mostrar características adyuvantes. Sin embargo, los polímeros frecuentemente son absorbidos por las células inmunes y, por lo tanto, su inmunocompatibilidad es un problema que debe evaluarse y resolverse. Los policationes de ciertos polímeros pueden ser citotóxicos, inducir hemólisis y activación del complemento. También se ha observado que los polianiones son menos citotóxicos, pero aún pueden inducir actividad anticoagulante y liberación de citocinas. Por ello, una de las condiciones de la fabricación de nanoacarreadores poliméricos es el estudio de su compatibilidad *in vivo* (Naahidi et al., 2013).

Las nanopartículas de quitosán (QN) se han empleado ampliamente debido a que es un polímero catiónico natural, no tóxico, biocompatible y biodegradable obtenido para la desacetilación de la quitina, y puede establecer interacciones iónicas con moléculas biológicas como proteínas, lípidos, y ADN. La quitina es el segundo polímero más abundante de la naturaleza, después de la celulosa, que se extrae principalmente de los desechos biológicos de los camarones. El quitosán se compone de unidades de glucosamina y N-acetil glucosamina unidas por enlaces β - (1-4) -glucosídicos. Se degrada fácilmente *in vivo* por la lisozima y varias quitinasas humanas. Su degradación enzimática conduce a la incorporación de sus residuos en las rutas metabólicas para su eliminación. Las nanopartículas de QN se han utilizado en diversas aplicaciones biomédicas, ya sea como acarreador o como adyuvante para las formulaciones de vacunas, principalmente de la mucosa. Existe evidencia sobre su uso en la vacunación parental debido a su viscosidad y actividad inmunológica, así como su efecto de depósito, que implica la liberación lenta de antígeno con el tiempo mejorando la respuesta inmune. Existen diversas rutas de síntesis de nanopartículas de quitosano, entre ellas: coacervación o precipitación, coalescencia de gotas de emulsión, micelar inversa, modificación química de autoensamblado y gelación iónica. La gelación iónica empleando tripolifosfato de sodio (TPP), es una de las más empleadas dado que incrementa la reticulación entre QN y diversas biomoléculas, particularmente proteínas. Se

ha estudiado ampliamente la asociación de proteínas a nanopartículas de quitosán (QN-NPs) a través de diferentes técnicas como conjugación química, encapsulación o adsorción. Sin embargo, solo unos pocos informes han abordado si la asociación química entre el antígeno y QN-NPs es necesaria para lograr la actividad adyuvante (Izaguirre-Hernández et al., 2017).

El carácter policationico del QN le confiere propiedades antimicrobianas, lo que favorece la interacción con las paredes celulares microbianas cargadas negativamente y las membranas citoplasmáticas. Estas interacciones dan como resultado una disminución de la estabilidad osmótica, alteración de la membrana y eventual fuga de elementos intracelulares. Cuando se aplica a nanoescala, el quitosán tiene una mayor relación superficie-volumen, lo que se traduce en una mayor densidad de carga superficial, una mayor afinidad por bacterias y hongos y una mayor actividad antimicrobiana. Aún más, posee algunas funciones que incluyen la inhibición de las citocinas proinflamatorias y la promoción de la granulación de tejidos a través del reclutamiento de fibroblastos, lo que sugiere que el quitosán puede utilizarse como un antimicrobiano, antiinflamatorio y acelerador de la cicatrización de heridas. Dadas las propiedades antimicrobianas e inmunológicas del quitosán, se han investigado modificaciones químicas para poder mejorar su desempeño dependiendo de la aplicación deseada (Friedman et al., 2012) puesto que sus grupos amino se protonan en un medio ácido aumentando su solubilidad, siendo más soluble en soluciones neutras conforme sus cadenas son de menor tamaño y con mayor desacetilación. Sin embargo, presenta problemas de solubilidad en soluciones fisiológicas.

Se ha reportado que los compuestos de quitosán-alginato tienen una mayor actividad antimicrobiana cuando la vía de administración es cutánea (Friedman et al., 2012). El quitosán-glicol es un derivado comercialmente disponible que posee una solubilidad mejorada en agua, y se ha utilizado como un andamiaje para la administración de fármacos o diagnóstico por imagen. Así mismo, se ha reportado la fabricación de quitosán-glicol modificado hidrofóticamente como un nuevo polímero anfifílico que puede ser autoensamblado en solución acuosa para formar nanopartículas estables, quienes suministraron con éxito varios tipos de agentes terapéuticos (genes, péptidos y fármacos anticancerígenos de molécula pequeña) (Yun et al., 2009).

Entre los derivados de quitosán, se encuentra el N, N, N-trimetil quitosán (TMQ). Al igual que QN, el TMQ es mucoadhesivo y biodegradable y se ha utilizado con éxito, generalmente en forma de nanopartículas (NP), para el suministro nasal, pulmonar y oral de antígenos en ratones. Las QN-NPs y nanopartículas de N, N, N-trimetil quitosán (TMQ-NPs) pueden prepararse mediante métodos químicos escalables como la formación de complejos polielectrolíticos y la gelificación ionotrópica. Las TMQ-NP poseen una toxicidad limitada y como sistemas de administración, tienen un gran potencial como adyuvantes para la vacunación nasal (Amidi et al., 2006a; Tafaghodi et al., 2012).

ANTECEDENTES

1. Efectos de las propiedades superficiales en las interacciones nanopartícula – célula

La interacción de los nanomateriales con las células y las bicapas lipídicas es crítica en muchas aplicaciones, entre ellas la fototerapia, imagenología y administración de fármacos y/o genes. Estas aplicaciones requieren del conocimiento de las interacciones entre nanopartículas y células, que están dictadas principalmente por las propiedades superficiales de las nanopartículas.

La membrana plasmática es una membrana selectivamente permeable que define el límite y mantiene el entorno intracelular esencial de la célula. Las moléculas pequeñas y no polares como el O₂ y el CO₂ pueden difundirse fácilmente a través de la bicapa lipídica, sin embargo, las moléculas polares como los iones y los nanomateriales más grandes son incapaces de atravesar la membrana plasmática por sí mismas. En la naturaleza, los iones importantes y las proteínas de tamaño nanométrico se transportan a través de la bicapa lipídica por canales especializados de proteínas de transporte de membrana. La mayoría de las otras macromoléculas y conjuntos moleculares, a nanoescala, se internalizan a través de endocitosis al entrar en contacto con la membrana celular. Estos nanomateriales endocitados están confinados en endolisosomas y son incapaces de alcanzar el citosol. Este destino endocítico de los nanomateriales ha sido demostrado por (Canfarotta et al., 2016). Como ejemplo, se ha demostrado que nanopartículas de oro de 3-4 nm se incorporan a las células de macrófagos a través de un mecanismo que involucra pinocitosis, como lo indican estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM), electrónica de transmisión (TEM) confocal, que confirmaron que 24 h después de la internalización, las nanopartículas se encuentran en cuerpos lisosomales dispuestos de manera perinuclear (Verma & Stellacci, 2010a).

Si bien las observaciones cualitativas muestran que, en la mayoría de los casos, los nanomateriales están contenidos dentro de las estructuras vesiculares y no pueden romper las barreras de la membrana celular, la cinética, la cantidad y el mecanismo de captación varían dependiendo de numerosos factores en el estudio, entre ellos la pureza y tipo de nanomaterial, las condiciones de incubación de las células, el tratamiento celular, el tipo de línea celular, entre otros.

Sin embargo, muchos nanomateriales han demostrado la capacidad de penetrar con éxito las membranas celulares. En el caso de sistemas naturales esta capacidad se ha observado en péptidos penetrantes de células (CPP) o péptidos fusogénicos de células (como los que se encuentran en los virus), que son eficientes para atravesar las membranas celulares sin formar poros abiertos en las bicapas lipídicas. Entre los nanomateriales sintéticos, con la excepción de moléculas muy pequeñas (como grupos de metales) o materiales en forma de aguja (por ejemplo, nanotubos de carbono químicamente funcionalizados), solo nanopartículas catiónicas (puntos cuánticos (QD) metálicos y dendrímeros) son capaces de

penetrar las membranas celulares. Sin embargo, en el proceso crean poros en las membranas celulares que pueden conducir a la toxicidad celular al destruir el delicado equilibrio de concentración de iones intracelulares versus extracelulares, proteínas y otras macromoléculas importantes que se requieren para proteger la integridad y la función normal de una célula (Verma & Stellacci, 2010).

1.1 Propiedades inmunológicas de nanomateriales

Evaluar la inmunotoxicidad de los productos biomédicos de tamaño nanométrico implica la evaluación de propiedades como solubilidad, química superficial, tamaño y morfología, entre otros. Sin embargo, los efectos de las propiedades de las nanopartículas en el sistema inmune aún se están explorando. Los estudios inmunológicos de las nanopreparaciones generalmente se dividen en dos categorías: 1) Respuestas a las nanopartículas que se modifican específicamente para estimular el sistema inmune, o 2) efectos secundarios indeseables.

Los datos preclínicos de seguridad disponibles indican que las nanopartículas no son intrínsecamente más inmunotóxicas que los fármacos "convencionales". Además, la reformulación de ellos para incluir portadores derivados de la nanotecnología a menudo conduce a una inmunotoxicidad sistémica reducida en comparación con la de las formulaciones no modificadas. Por ejemplo, las nanopartículas pueden mantener los medicamentos alejados de las células sanguíneas y los tejidos normales, liberándolos solo en sitios específicos. Las nanopartículas también pueden disminuir la inmunotoxicidad de un medicamento al mejorar su solubilidad. La investigación sugiere que las propiedades fisicoquímicas (tamaño, forma, carga, grupos de superficie, etc.) de las nanopartículas determinan su inmunotoxicidad. Numerosos estudios han intentado abordar los problemas de toxicidad asociados con diferentes rutas de administración de nanopartículas. Sin embargo, se pueden establecer pocas tendencias definidas. Esto probablemente se deba a la falta de una evaluación exhaustiva de 1) la composición, el tamaño, la arquitectura y el potencial zeta (carga superficial) de las nanopartículas; 2) la densidad, el grosor y la estabilidad del revestimiento de la superficie en condiciones fisiológicas; 3) una comparación exhaustiva de 1) y 2) entre varios modelos animales; 4) variabilidad en las materias primas utilizadas para fabricar estas partículas y diferencias en los procedimientos de fabricación y 5) caracterización inmunológica completa. Las nanopartículas se pueden administrar por vía nasal, oral, intraocular, pulmonar (pulmones) y otras vías. Por lo tanto, es importante centrarnos en la ruta sistémica, que es común para una amplia variedad de nanopartículas de ingeniería, así como resumir su interacción con el sistema inmune (Dobrovolskaia & Neil, 2007).

La absorción de nanopartículas por las células inmunes puede ocurrir tanto en el torrente sanguíneo por los monocitos, plaquetas, leucocitos y células dendríticas (DC), como en los tejidos por los fagocitos residentes (p. ej., Células de Kupffer en el hígado, DC en los ganglios

linfáticos, macrófagos y células B en bazo). La absorción de nanopartículas por las células inmunes puede ocurrir a través de varias vías y puede ser facilitada por la adsorción de opsoninas (proteínas plasmáticas) a la superficie de la partícula. Esta absorción puede hacer que una nanopartícula se aleje del sitio de su aplicación prevista y, por lo tanto, reduzca en gran medida la cantidad de nanopartículas disponibles para llegar al sitio objetivo, reduciendo efectivamente la eficacia del medicamento. Como tal, comprender la hemocompatibilidad de nanopartículas es un paso importante durante la caracterización inicial de los nanomateriales. Hay tres categorías principales consideradas relevantes para la biodistribución de nanopartículas a las células y órganos inmunes: hemólisis, trombogenicidad y activación del complemento (Dobrovolskaia et al., 2008).

Una nanopartícula que induce la hemólisis puede adsorber cierta cantidad de la hemoglobina liberada y/o adherirse a los desechos celulares, lo que a su vez aumenta su probabilidad de eliminación por parte de los macrófagos a través de la fagocitosis mediada por receptores de fosfato y fosfatidilserina. Los eritrocitos ocupan una fracción de volumen de sangre mayor que las células fagocíticas mononucleares, por lo que es probable que una nanopartícula inyectada por vía intravenosa interactúe con los glóbulos rojos antes de encontrarse con otras células inmunes. Esta posición temprana en la cascada de interacción con el contacto sanguíneo, así como la intensidad del resultado fisiológico adverso, hace que el examen de la actividad hemolítica sea un aspecto importante de la caracterización preclínica de las nanopartículas. La trombogenicidad es la propensión de un material a inducir la coagulación sanguínea y la oclusión parcial o completa de un vaso sanguíneo por un trombo. Algunos estudios iniciales han indicado una relación entre la trombogenicidad de nanopartículas y la fagocitosis de los macrófagos. Además, los medicamentos basados en nanopartículas a menudo están diseñados para tener tiempos de circulación sistémica más largos que los medicamentos de molécula pequeña. Estos tiempos de circulación extendidos en el torrente sanguíneo aumentan la duración del contacto de la nanopartícula con los componentes sanguíneos, incluido el sistema de coagulación, lo que potencialmente amplifica la activación de la cascada de coagulación y la coagulación de la sangre. Por último, el sistema del complemento es un grupo de proteínas unidas entre sí en una cascada bioquímica que elimina los patógenos del cuerpo y también puede contribuir a la biodistribución de nanopartículas alterada en forma de eliminación rápida de la circulación sistémica a través de la fagocitosis mediada por el receptor del complemento. Además, la activación del complemento por fármacos administrados sistémicamente es responsable de las reacciones de hipersensibilidad (alérgicas) y anafilaxia, una afección potencialmente mortal. Como tal, las nanopartículas destinadas a la administración sistémica deben analizarse para detectar una tendencia a activar el sistema del complemento (Dobrovolskaia et al., 2008).

Los efectos anteriores confieren mayor importancia a las pruebas preclínicas de interacción de nanopartículas con el sistema inmune. Dichas pruebas preclínicas son cuestionadas por varios factores. Primero, no existe un procedimiento armonizado o un documento de

orientación reglamentaria actualmente disponible, aunque se están realizando esfuerzos tanto locales (en cada país), como internacionales para rectificar esta situación. En segundo lugar, a pesar de que existen algunos estándares para seleccionar métodos de prueba biológicos para materiales y dispositivos medicinales, las pruebas de biocompatibilidad del material en sí mismas deben evolucionar rápidamente a medida que los datos de investigación básica sugieren continuamente métodos nuevos y mejorados. En tercer lugar, las nanopartículas son una amplia clase de materiales destinados a un amplio espectro de aplicaciones clínicas (por ejemplo, como dispositivos médicos, componentes de formulaciones de vacunas o portadores de fármacos para la intervención terapéutica de trastornos malignos, inflamatorios, virales, neurodegenerativos y de otro tipo). Las propiedades fisicoquímicas potencialmente diferentes de las nanopartículas plantean nuevos desafíos metodológicos y regulatorios (Dobrovolskaia et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, los adyuvantes son agentes añadidos a una vacuna para aumentar las respuestas inmunes a los antígenos. Varios estudios describen el uso de nanopartículas como adyuvantes. Por ejemplo, las nanopartículas de polimetilmetacrilato indujeron títulos de anticuerpos de larga duración (la cantidad de sustancia requerida para producir una reacción) en la vacuna contra el virus completo del VIH2 en ratones. La respuesta de anticuerpos fue 100 veces mayor que cuando se usó un adyuvante tradicional de sulfato de aluminio (alúmina). De manera similar, cuando se inmunizaron con glucoproteína de la rabia, las nanopartículas de polisacárido recubiertas de lípidos indujeron cuatro veces más inmunoglobulina G que cuando se inmunizaron con adyuvante de alumbre. Los dendrímeros PAMAM de quinta generación terminados en amino, también aumentaron los niveles de inmunoglobulina G e inmunoglobulina M anti-ovoalbúmina. La inmunización de animales con antígenos completos y haptenos (moléculas pequeñas que pueden provocar una respuesta inmune solo cuando se unen a un vehículo grande, como una nanopartícula o una proteína), conjugada a la superficie de partículas de oro coloidal, genera niveles más altos de anticuerpos específicos que la inmunización de los mismos antígenos con adyuvantes clásicos. Además, la cantidad de antígeno requerida para lograr una alta respuesta de anticuerpos fue un orden de magnitud menor que para la inmunización con adyuvante de Freund. En resumen, las nanopartículas se pueden diseñar para que sirvan como portadores de vacunas y adyuvantes. Algunos estudios sugieren que las nanopartículas pueden exacerbar las reacciones alérgicas y, por lo tanto, se requiere una caracterización preclínica cuidadosa. Se necesitan estudios exhaustivos de la relación estructura-actividad para comprender mejor los parámetros críticos que determinan las propiedades antigénicas y adyuvantes de las nanopartículas (Dobrovolskaia & Neil, 2007).

En un proceso inflamatorio las células del sistema inmune se activan para reconocer a los patógenos y desencadenar una respuesta inflamatoria, que implica la secreción de moléculas de señalización conocidas como citocinas, para atraer más células que destruyan la sustancia extraña, como nanopartículas. Dichas células reconocen las nanopartículas por

sus propiedades superficiales y su composición, desencadenando una respuesta inflamatoria de manera similar. Sin embargo, muchos de los eventos moleculares aún son poco conocidos. Se requiere un examen sistemático de un rango de tamaños de nanopartículas y cargas superficiales dentro de cada clase de nanomateriales diseñados, para cuantificar cómo estos parámetros influyen en la respuesta inflamatoria. En general, las partículas catiónicas tienen más probabilidades de inducir reacciones inflamatorias que las especies aniónicas y neutras. Además, también se ha demostrado que las impurezas de rastreo dentro de la formulación de nanomateriales también pueden inducir frecuentemente una respuesta inflamatoria (Dobrovolskaia & Neil, 2007). Algunos estudios sugieren que los nanotubos de carbono inducen reacciones inflamatorias, pero un estudio más reciente muestra que no lo hacen cuando se purifican. Del mismo modo, el óxido de hierro purificado y las nanopartículas de oro no inducen la secreción de citocinas. Esto muestra que la pureza, estabilidad, composición y propiedades fisicoquímicas de la superficie del material en condiciones fisiológicas, puede afectar la toxicidad (Shvedova et al., 2012).

Otra consideración en la respuesta inflamatoria es mantener la respuesta de reacción inflamatoria desencadenada por las células Th (Th1 /Th2), que dirigen y activan otras células inmunes como las células B y T y los macrófagos, para secretar diferentes citocinas. Ello se demuestra por la estimulación de la inmunidad adaptativa por partículas. Por ejemplo, pequeñas partículas de poliestireno (<100 nm) promovieron respuestas de células T, CD8 y CD4, y se asociaron con niveles de anticuerpos más altos que las partículas mayores a 500 nm. Comprender los mecanismos requiere una mayor investigación, y es importante para el desarrollo de la formulación de “nanovacunas”. Usando la nanotecnología, las partículas pueden ser diseñadas para poseer ciertas propiedades para que se parezcan a los patógenos y se manejen en el cuerpo de manera similar (Xiang et al., 2006).

Diversos autores han reportado el uso de sistemas basados en quitosán para aplicaciones de administración de medicamentos en diversas enfermedades dadas sus múltiples propiedades. La disponibilidad de grupos funcionales presentes en su estructura permite la conjugación de ligandos específicos y, por lo tanto, ayuda a dirigir los medicamentos cargados al sitio de infección/inflamación. La biodegradación lenta del quitosán permite la liberación controlada y sostenida de los agentes cargados, también reduce la frecuencia de dosificación y es útil para mejorar el cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes que tienen enfermedades infecciosas. La mucoadhesión que ofrece el quitosán lo convierte en un candidato atractivo para la administración de fármacos antiinflamatorios, donde la entrega rápida del compuesto activo debido a la mayor permeabilidad del tejido es el principal problema (Rajitha et al., 2016).

Las células de mamíferos tienen cinco formas de internalizar macromoléculas y/o nanopartículas: fagocitosis (a través de las vías mediadas por el receptor de manosa, receptor del complemento, receptor de Fcγ y receptor de barrido), macropinocitosis, mediada por clatrina, mediada por caveolina y clatrina/caveolina, y endocitosis independiente. Cada

vía involucra un conjunto único de receptores y actúa sobre tipos particulares de nanopartículas (**Figura 4**).

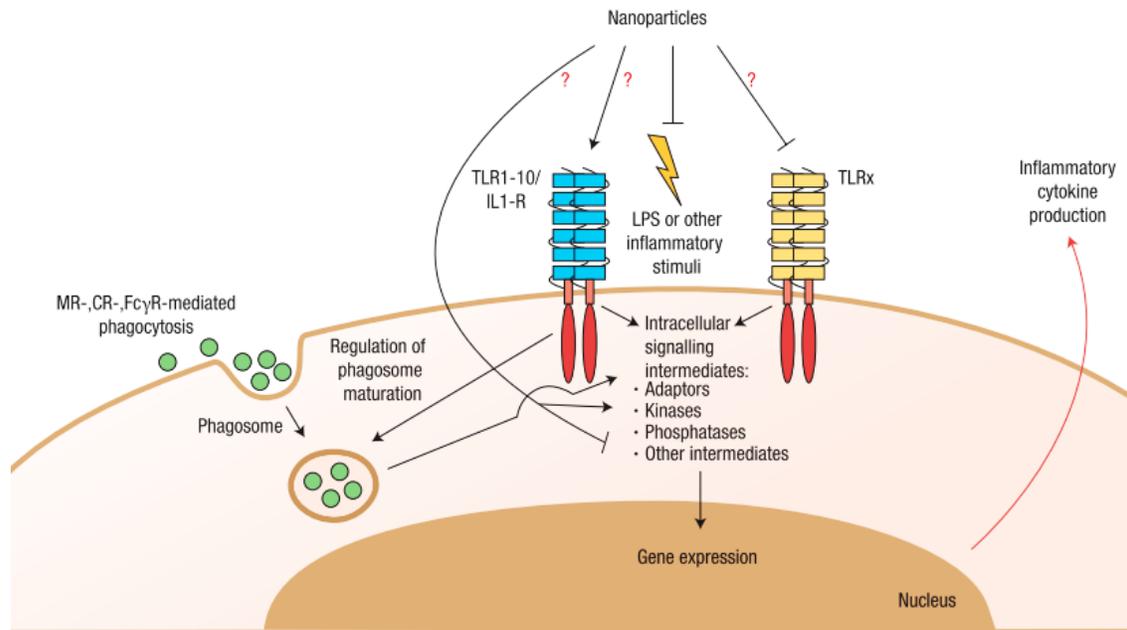


Figura 4. Procesos involucrados en la interacción de nanopartículas con la membrana celular (Dobrovolskaia & Neil, 2007).

Tradicionalmente, el término "fagocitosis" describe la absorción de materiales en partículas que son mayores a 0.5 μm (Aderem & Underhill, 1999; Blander & Medzhitov, 2006; Conner & Schmid, 2003). Otras vías endocíticas están asociadas con soluciones y partículas más pequeñas. Según el tamaño de las vesículas endocíticas, algunos informes clasifican la internalización de nanopartículas como endocitosis mediada por receptores (Xiang et al., 2006). Las nanopartículas que representan una clase muy diversa de materiales pueden interactuar con las proteínas plasmáticas y ser diseñadas para dirigirse a vías de suministro específicas. Por ejemplo, las partículas de poliestireno de 50 nm pre-incubadas en plasma son internalizadas por las células de Kupffer (macrófagos hepáticos) a través de receptores captadores, y se demostró que la proteína de plasma fetuina media esta captación (Nagayama et al., 2007) (**Figura 5**).

La fagocitosis de materiales nanoestructurados generalmente recurre a estudios con ensayos indirectos, como la detección basada en luminol o la citometría de flujo, dado que las técnicas de uso rutinario en ciencia de materiales como las microscopías electrónicas, imposibilitan su seguimiento durante este proceso. El primero es un ensayo sensible basado en un aumento de la luminiscencia tras la oxidación de luminol en los fagolisosomas, pero puede estar limitado por la extinción de partículas de la señal de luminol cuando está dentro de la célula. Los ensayos de citometría de flujo para fagocitosis, por otro lado, no pueden distinguir entre partículas unidas a la membrana celular y partículas internalizadas.

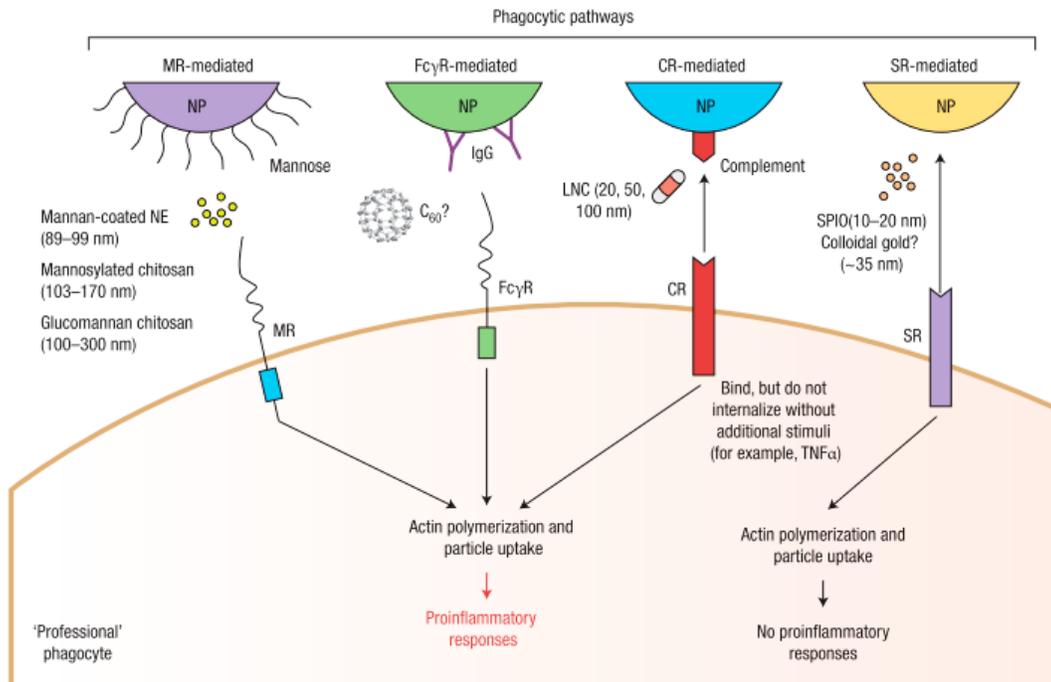


Figura 5. Vías fagocíticas involucradas en la internalización de distintos tipos de nanopartículas (Dobrovolskaia & Neil, 2007).

Las conclusiones basadas en estudios que usan nanopartículas marcadas con fluorescencia son problemáticas debido a: 1) La estabilidad desconocida de las nanopartículas con fluorocromo en condiciones fisiológicas y 2) la falta de controles para evaluar los efectos del fluorocromo en las propiedades de las nanopartículas. Sin embargo, se ha demostrado que las nanoemulsiones recubiertas de manosa (90 nm), las nanopartículas de manosa-quitosán (130 nm) y las partículas de glucomanano (200 nm), son internalizadas por los macrófagos a través de una vía fag (Cui & Mumper, 2002; Cuña & Pivel, 2006; T. H. Kim et al., 2006), mientras que las nanocápsulas lipídicas de 100 nm se internalizan a través de una vía mediada por el receptor del complemento (Vonarbourg, Passirani, Saulnier, Simard, et al., 2006). Teniendo en cuenta que, aunque se sabe que el mecanismo exacto de la absorción de nanopartículas coloidales está influenciado por el tamaño de partícula, la forma, la carga y la modificación de la superficie, aún no se concluye su elucidación. De hecho, se ha propuesto el empleo de diversos polímeros para la modificación superficial de nanopartículas, entre ellos el PEG, poloxámero y polímeros de poloxamina, que permitan "camuflar" las partículas para prevenir la fagocitosis (Vonarbourg, Passirani, Saulnier, A., et al., 2006, et al., 2006).

1.2 Evaluación toxicológica de la seguridad de los materiales

La toxicología tradicionalmente aborda los efectos adversos por envenenamiento de químicos diversos en humanos, animales y el medio ambiente. Sin embargo, las respuestas a dosis toxicológicas pueden ser complejas y decididamente no lineales, especialmente en

el rango de dosis baja y alta. Los parámetros clave para la toxicología convencional son la concentración y hora. Estos factores se pueden medir fácilmente para productos químicos individuales y, después de haber establecido la naturaleza de la respuesta a la dosis de un determinado producto químico, se pueden determinar los niveles umbral bajo los cuales un compuesto químico puede considerarse seguro o peligroso, considerando las normas internacionales vigentes.

La nanotoxicología surgió para dar respuesta al comportamiento de los nanomateriales cuando se encuentran en interacción con seres vivos, desde el nivel celular. Está ampliamente documentado que los materiales en la nanoescala adquieren nuevas propiedades fisicoquímicas, como sus propiedades mecánicas, eléctricas, reactivas, magnéticas, entre otras. En particular, su química superficial cambia y aumenta su reactividad química dado que en esta escala su relación superficie-volumen incrementa en 9 órdenes de magnitud, respecto a la macro escala (Elsaesser & Howard, 2012).

Hay una gran cantidad de interacciones biofísicoquímicas que podrían generarse cuando nanomateriales de diferente composición, tamaño, área superficial, forma, dispersabilidad, agregación, cristalinidad, funcionalización de la superficie, humectabilidad, revestimiento de la superficie, etc., entran en contacto con fluidos biológicos, proteínas, lípidos, ADN, membranas celulares, lisosomas, mitocondrias y procesos biológicos a escala nanométrica. Si bien no se ha documentado a largo plazo que las interacciones biofísicoquímicas entre nanomateriales y especies biológicas hayan resultado en enfermedades humanas o daños ecológicos, existe evidencia experimental de que los nanomateriales pueden presentar riesgos que podrían interpretarse en términos de posibles vías toxicológicas o mecanismos de lesión. De hecho, actualmente existen discrepancias en cómo proceder con las pruebas de toxicidad de nanomateriales incluyendo la detección, sensibilidad de la detección, equilibrio correcto de *in vitro* (celular y molecular) versus *in vivo* (animales u organismos completos), costo del esfuerzo y quién debe ser responsable de la detección y evaluación de seguridad de los nanomateriales. Los intentos de utilizar ensayos y modelos toxicológicos tradicionales han dado resultados contradictorios poco reproducibles, de modo que aún no es una plataforma de detección ampliamente aceptada (Meng et al., 2009).

Para medir algunas de las variables toxicológicas, el nanomaterial debe ser caracterizado desde todas sus vertientes fisicoquímicas. De lo contrario, los posibles efectos tóxicos no pueden atribuirse fácilmente a una determinada propiedad del nanomaterial o incluso del nanomaterial en sí porque, por ejemplo, las impurezas y otros componentes podrían ser considerados responsables. Por lo tanto, es absolutamente crítico conocer el material de partida y sus propiedades. En el pasado, esto no siempre ha sido sencillo para las nanopartículas producidas industrialmente debido a los procesos de producción de crudo y, por lo tanto, a las grandes variaciones en las propiedades del material, tamaño, forma, entre otros. A medida que avanza la nanotecnología, se desarrollan procesos de fabricación más refinados que conducen a nanomateriales con propiedades uniformes y consistentes.

Además de la clasificación de nanomateriales según la ubicación celular en la que comúnmente se encuentran las nanoestructura, los nanomateriales y las nanopartículas, en particular, se han categorizado con respecto a su "suavidad" y/o "dureza". Los conductores, semiconductores y sus compositos se consideran materiales "duros", mientras que los materiales "blandos" son los dendrímeros, polímeros, proteínas, entre otros. Dado que las nanopartículas encuentran cada vez más aplicaciones biológicas y médicas, es que se han propuesto compositos de materiales duros y suaves que heredan sus propiedades individuales a las nuevas nanoestructuras. Partículas tipo coraza-núcleo (*core-shell*), pueden ser fabricadas con un núcleo metálico y una capa coraza suave, o viceversa (Elsaesser & Howard, 2012).

Como se describió anteriormente, la dosis es uno de los parámetros clave en toxicología. En nanotoxicología, es importante evaluar regímenes de dosis relevantes y realistas para extraer conclusiones significativas de experimentos *in vitro* e *in vivo* para la evaluación de riesgos de salud pública. Esto último, es indispensable no solo para dilucidar mecanismos celulares sino también para conocer sus efectos derivados de la exposición humana en su uso sistémico.

La discusión sobre la métrica más apropiada para evaluar la "dosis" de nanopartículas es una consideración crítica en el campo de la nanomedicina. En toxicología clásica, la dosis es casi invariable en relación con la masa. Sin embargo, con las nanopartículas el efecto toxicológico es de esperarse que sea diferente dado su comportamiento nanoscópico, que influye a nivel macroscópico. Debido a la naturaleza de las nanopartículas, una métrica de dosis lógica estaría relacionada con el número de partículas que alcanzan cada sub-compartimento celular de relevancia. Sin embargo, experimentalmente los números de nanopartículas presentes pueden ser complejos para estimar. Diversos autores reportan que la superficie total de las nanopartículas, donde ocurren muchas de las reacciones químicas de interés, puede ser una métrica más discriminatoria, en algunas circunstancias. Si bien la masa por sí sola no puede predecir el área de superficie total, el número de nanopartículas dentro de un cierto rango de tamaño y forma es predictivo de ella, por lo tanto, es probable que sea una medida de dosis que sea más predictiva de uso que la masa simple. Dado que, si no están estabilizadas químicamente, la mayoría de las nanopartículas muestran tendencias a formar aglomerados más grandes por la presencia de fuerzas de corto alcance, por lo cual la evaluación *in vitro* e *in vivo* debe advertir del comportamiento de las nanopartículas o sus aglomerados cuando entran en contacto con sistemas biológicos (Elsaesser & Howard, 2012).

Por ello, las nanopartículas fabricadas para su aplicación en contacto con sistemas biológicos requieren una caracterización mucho más extensa, incluyendo su tamaño, forma, solubilidad, aglomeración, pureza elemental, área de superficie, entre otros, para determinar correlaciones entre los efectos biológicos y las propiedades de las partículas. Por ejemplo, sus altas capacidades de adsorción, diferentes propiedades ópticas y mayores actividades catalíticas pueden influir en los resultados de muchos ensayos de toxicidad *in vitro*, lo que

llevaría a la interpretación errónea de los resultados. Además, la ausencia de metodologías y pautas estandarizadas, dificulta la comparación de las evaluaciones de seguridad/toxicidad de diferentes grupos de investigación. Se han discutido diversos métodos para la estandarización de la aplicación y de los desafíos que enfrenta el empleo de nanopartículas (Dhawan & Sharma, 2010).

Entonces dado que el seguimiento de la internalización de nanopartículas en los sistemas celulares es de suma importancia para comprender y correlacionar los efectos biológicos provocados por estas nanopartículas, el desafío radica en detectar la absorción de nanopartículas, el modo de absorción y el destino de ellas dentro de las células, derivado de su tamaño y cantidad. La microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission electron microscopy*) ha sido la metodología de estudio preferida para la captación celular de nanopartículas. Además de detectar la localización intracelular, proporciona una vista detallada de la interacción de las nanopartículas con las estructuras celulares. Debido a su alta resolución, la microscopía electrónica de transmisión permite obtener imágenes de las invaginaciones de la membrana, la formación de vesículas y los orgánulos. Esto hace posible estudiar el modo de absorción de las nanopartículas, que es de importancia primordial para comprender la influencia del tamaño, la forma, la química de la superficie, los recubrimientos y otros factores en su absorción. También ayuda a comprender los cambios ultraestructurales que ocurren en las células después de la absorción de nanopartículas. Sin embargo, la microscopía electrónica de transmisión es solo una herramienta cualitativa para evaluar la captación de nanopartículas y generalmente se limita a obtener imágenes de algunas células debido a la complicada preparación de la muestra y al análisis de imágenes involucrado. Por otro lado, la citometría de flujo es una técnica que empleada para estudiar la captación de nanopartículas en células de mamíferos. Es una técnica simple, fácil y sensible, económicamente rentable y no invasiva. En este método, se hace incidir un haz láser sobre una corriente de fluido enfocada hidrodinámicamente, que contiene una suspensión de una sola célula. Entonces, algunos detectores recopilan información de la interacción luz-células. Algunos de los fotones que inciden el borde de la celda se desvían ligeramente, y esta luz se esparce hacia adelante (FSC) corresponde al tamaño de las células. Los fotones dispersados en el ángulo recto al haz láser (esparcimiento lateral SSC) indican la complejidad interna o granularidad de las células. El detector también mide la fluorescencia emitida por las estructuras presentes dentro de las células o unidas a las células, proporcionando una serie de información útil (**Figura 6**). Por lo tanto, la citometría de flujo puede usarse para la detección de nanopartículas fluorescentes y no fluorescentes dentro de las células. En el caso de la captación celular de nanopartículas no fluorescentes, la luz se esparce hacia adelante permanece constante en las células expuestas y no expuestas, mientras que la intensidad de la luz con esparcimiento lateralmente aumenta en proporción a la concentración de nanopartículas dentro de las células. La sensibilidad del esparcimiento lateral debe mantenerse baja para detectar una amplia gama de cambios en la absorción (Dhawan & Sharma, 2010).

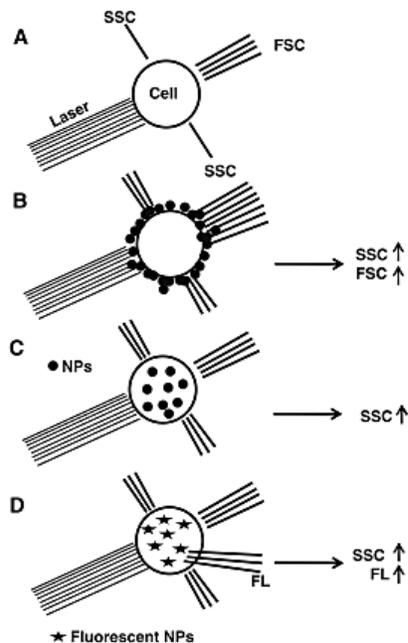


Figura 6. Análisis de captación de nanopartículas en células mediante citometría de flujo: A esparcimiento de luz por una célula que no está asociada con ninguna nanopartícula; B nanopartículas se adhieren a la superficie celular, lo que conduce a un aumento en el esparcimiento hacia adelante (FSC) y el esparcimiento lateral (SSC); C internalización de nanopartículas por la célula, lo que aumenta sólo SSC; D internalización de nanopartículas fluorescentes lo que causa aumento en SSC e intensidad de fluorescencia (Dhawan & Sharma, 2010).

Los métodos que se usan en la toxicología tradicional no se pueden aplicar *per se* a la nanotoxicología dado que, como se mencionó, las nanopartículas muestran varias propiedades fisicoquímicas únicas. Debido a ello, las nanopartículas interfieren con los sistemas de prueba normales, como ha sido documentado. Por ejemplo, una razón área/volumen grande, está directamente relacionada con una mayor capacidad de adsorción. diferentes propiedades ópticas que interfieren con los sistemas de detección de fluorescencia o absorción de luz visible; aumento de la actividad catalítica debido a la energía de superficie mejorada y propiedades magnéticas que los hacen activos redox y, por lo tanto, interfieren con los métodos basados en reacciones redox (**Figura 7**). Estos obstáculos conducen a informes contradictorios y a la generación de datos poco confiables (Dhawan & Sharma, 2010).

1.1 Biodegradación de nanomateriales

El término "metabolismo" como se define en la farmacocinética clásica no es adecuado para algunos nanomateriales. Por lo anterior, el término "degradación" se utilizará en su lugar para cubrir colectivamente múltiples procesos como la erosión, la desaglomeración, la desintegración, la disolución o la degradación química de las nanopartículas. Los estudios de excreción y degradación disponibles solo incluyeron la administración única de los nanomateriales a una determinada concentración (Kettiger et al., 2013).

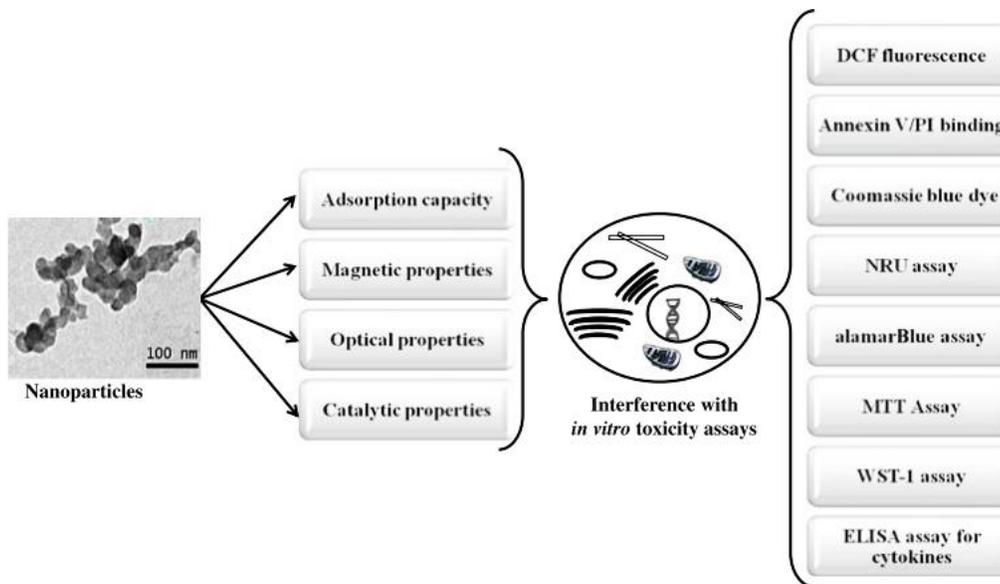


Figura 7. Propiedades de las nanopartículas que se usan como base para poder monitorear toxicidad a través de distintos ensayos previamente reportados por (Dhawan & Sharma, 2010).

Una vez internalizado por las células inmunes, el destino de una nanopartícula está determinado en gran medida por su composición (**Figura 8**).

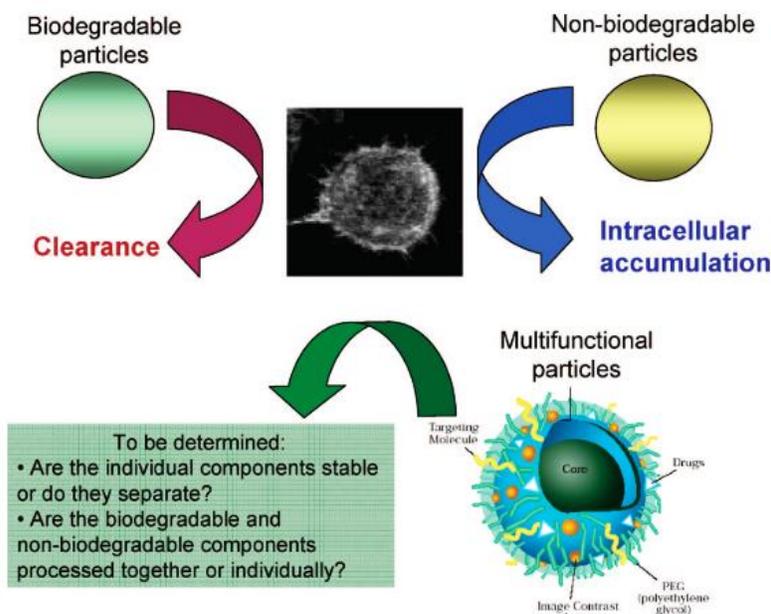


Figura 8. Distintos enfoques para evaluar toxicidad durante el tratamiento con nanopartículas que tienen influencia en el sistema inmune (Dobrovolskaia et al., 2008).

Las partículas biodegradables, generalmente de base polimérica o cerámica reabsorbible, se digieren y eliminan del cuerpo, mientras que las partículas no biodegradables (por ejemplo, metal, coloides, diversos cerámicos, nanopartículas basadas en carbono) se acumulan en las células durante períodos prolongados. El procesamiento de nanopartículas

multifuncionales y multicomponentes es más complejo dados sus componentes individuales y por ende, las propiedades de los mismos (Dobrovolskaia et al., 2008).

2. Uso de nanopartículas como acarreadores y adyuvantes en infecciones virales

El uso de nanopartículas como acarreadores y adyuvantes ha ganado terreno en el área de las infecciones virales. Se ha reportado que nanopartículas metálicas, particularmente las de oro (AuNP) pueden ser empleadas como portadoras de diversos productos biofarmacéuticos. Ejemplo de ello es un sistema de administración de IFN α de acción prolongada específico del blanco, utilizando un material híbrido de AuNP y ácido hialurónico (HA), para el tratamiento de Hepatitis C (Jin, Luo, Zhang, & Pang, 2017) .

En el caso de otras infecciones virales, como la influenza, las vacunas actuales administradas por vía intramuscular inducen una inmunidad mucosa mínima. Está reportado que el uso de nanopartículas de quitosán (QN) como vehículo de entrega de una vacuna intranasal contra la influenza, fabricada con hemaglutinina (HA) del virus de la influenza generó respuestas de anticuerpos sistémicos y de la mucosa más altas que aquellas vacunas fabricadas solo con el virus de la influenza dividida en HA, en animales inmunizados. Además, la vacuna QN-HA logró inducir también una respuesta inmune mediada por células que se muestra como un gran número de células secretoras de IFN- γ en los bazo, mientras que la vacuna HA sola no los mostró (Sawaengsak et al., 2014).

La inmunización de la mucosa ofrece varias ventajas sobre la vacunación parenteral, pero típicamente requiere potentes sistemas de administración y/o adyuvantes para producir inmunidad protectora, como la que pueden ofrecer el uso de nanopartículas. De manera específica, las nanopartículas (NP) de quitosán trimetilado (TMQ) y quitosán (QN) cargadas con antígeno de superficie de la hepatitis B (HB), Tafaghodi et al., 2012 reportaron que las TMQ-NPs y QN-NPs son inmunoadyuvantes de la mucosa igualmente potentes para HB. Además, ambos polímeros son inmunoadyuvantes potentes para HB, lo que da como resultado relaciones IgG2a / IgG1 más altas en comparación con HB adyuvante de alúmina.

3. Nanopartículas poliméricas como acarreadores de fármacos

El uso de nanopartículas como agentes terapéuticos y de diagnóstico, así como el avance del suministro de medicamentos, es importante y necesario dado que los medicamentos tradicionales disponibles actualmente para administración oral o inyectable no siempre se fabrican como la formulación óptima para cada producto. Así mismo, los productos que contienen proteínas o ácidos nucleicos requieren un tipo de sistema portador que mejore su eficacia y su protección ante la degradación no deseada. Específicamente las nanopartículas de base polimérica, natural y sintéticos (biodegradables y no biodegradables), han recibido mucha atención porque se pueden personalizar para la entrega dirigida de medicamentos, mejorar la biodisponibilidad y proporcionar una liberación controlada de fármacos a partir de

una sola dosis. Así mismo que, mediante la adaptación, el sistema nanolibrador puede evitar que las enzimas endógenas degraden el fármaco. Por otro lado, el desarrollo de nuevos sistemas de suministro de medicamentos de base nanotecnológica impulsa a las compañías farmacéuticas a desarrollar nuevas formulaciones de medicamentos existentes. Si bien estas nuevas formulaciones serían benéficas para los pacientes, también crearían nueva fuerza de mercado, impulsando el desarrollo de métodos de entrega aún más efectivos (Rizvi & Saleh, 2018).

Las nanopartículas poliméricas se usan más ampliamente en los sistemas de administración de genes que otros tipos de nanopartículas. Sus propiedades fisicoquímicas como la fácil manipulación del tamaño de partícula, carga superficial y disponibilidad de muchos grupos funcionales que pueden explotarse para conjugar diferentes biomoléculas y ligandos dirigidos, han demostrado que los biopolímeros y polímeros compatibles son una buena opción para la fabricación de nanoacarreadores. Las nanopartículas basadas en polímeros más comúnmente exploradas para la entrega de genes son las nanopartículas de polímeros sintéticos como el ácido poliláctico-co-glicólico o de origen natural, como el quitosán. Se ha explorado la focalización de los sistemas de suministro de genes basados en nanopartículas poliméricas, para mejorar la absorción de ácido nucleico en el sitio de tumores, y para evitar efectos indeseables fuera del objetivo en tejidos sanos. La eficiencia de administración dirigida depende de la concentración y densidad del ligando, la afinidad de unión al receptor del ligando, la carga superficial y la estabilidad de las nanopartículas poliméricas (Amreddy & Babu, 2017).

Particularmente, investigaciones farmacéuticas recientes han examinado el uso de sistemas basados en quitosán, derivado del segundo biopolímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa, para aplicaciones de administración de medicamentos en diversas enfermedades. La disponibilidad de grupos funcionales aminos e hidroxilos permite la conjugación de ligandos específicos y, por lo tanto, ayuda a dirigir los medicamentos cargados al sitio de infección/inflamación. La biodegradación lenta del quitosán permite la liberación controlada y sostenida de agentes cargados, reduce la frecuencia de dosificación y es útil para mejorar la terapia de drogas infecciosas cuando son administrados a pacientes. La mucoadhesión que ofrece el quitosán lo convierte en un candidato atractivo para la administración de fármacos antiinflamatorios, donde el aclaramiento rápido del principio activo debido a la mayor permeabilidad del tejido es el principal problema. La hinchazón dependiente del pH y las propiedades de liberación del fármaco del quitosán presentan un medio de direccionamiento pasivo de los principios activos del fármaco, a los sitios inflamatorios (Rajitha et al., 2016).

JUSTIFICACIÓN

La importancia y novedad de este trabajo radica en que los macrófagos juegan un papel clave en la respuesta inmune y están involucrados en la eliminación de agentes extraños, incluidas las nanopartículas. Por lo anterior, podemos obtener información sobre los mecanismos celulares que subyacen a la absorción, el tráfico y el destino de las nanopartículas en estas células.

Este trabajo de investigación aporta información para avanzar en el desarrollo de nanoterapias seguras y eficaces, así como para comprender las interacciones biológicas entre las nanopartículas y las células inmunitarias.

HIPÓTESIS

Las nanopartículas de N-trimetil quitosán fabricadas serán internalizadas por las células J774 principalmente a través de procesos de endocitosis, lo que se reflejará en una mayor presencia intracelular de las nanopartículas. Además, provocarán la activación de lisosomas en las células J774 indicando un proceso de degradación y procesamiento intracelular de las nanopartículas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto causado por nanoacarreadores de N- trimetil quitosán acoplados a proteína BSA, en células J774.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de N-trimetil quitosán acopladas a BSA por técnica microfluídica.
2. Evaluar el efecto del tratamiento con nanopartículas en la proliferación celular.
3. Evaluar la activación lisosomal de células J774 tratadas con nanopartículas de N-trimetil quitosán
4. Monitorear la endocitosis de nanopartículas de N-trimetil quitosán en células J774.
5. Evaluar la vía de endocitosis utilizada por las células J774 tratadas con nanopartículas de N-trimetil quitosán.

METODOLOGÍA

Síntesis de N-trimetil quitosán

Se siguió el protocolo propuesto por (Amidi et al., 2006a), que consiste en:

1. Preparar una solución de NaOH al 15 %m/v y una solución de NaCl 10 %m/v.
2. Instalar una parrilla eléctrica y colocar un cristizador de 1 L con aceite de silicón, y un matraz bola acoplado a un refrigerante de serpentín con reflujo de agua corriente
3. Ajustar la temperatura a 60 °C y agregar los reactivos en el siguiente orden: 2 g de quitosán de peso molecular medio (Desacetilado al 95 %), 4.8 g de yoduro de sodio, 11 ml de NaOH 15 %, 11.5 ml de metil yoduro, 80 ml de 1-metil-2-pirrolidona. Colocar un agitador magnético e incubar por 1 h cuidando que se mantenga estable la temperatura.
4. Retirar el sobrenadante y el solvente encontrado en el matraz y precipitarlo usando etanol.
5. Centrifugar a 35,000 rpm por 10 min para su purificación.
6. Retirar el sobrenadante y realizar lavados con éter dietílico con un embudo y papel filtro para remover el etanol.
7. Agregar el producto anterior en el matraz y resuspender con 80 ml de 1-metil-2-pirrolidona. Mantener la temperatura a 60 °C para remover la mayoría del éter dietílico. Posteriormente, añadir en orden: 4.8 g de yoduro de sodio, 11ml de NaOH 15%, 7ml de metil yoduro, con agitación rápida a 60 °C por 30 min.
8. Añadir 2 ml de metil yoduro adicionales y 0.6 g NaOH. Continuar la agitación por 1 h adicional. Posteriormente se agregaron 40 ml de NaCl 10 %.
9. Retirar el sobrenadante y el solvente. Precipitar con etanol para entonces centrifugar a 35,000 rpm por 10 min, para su purificación.
10. Con un embudo y papel filtro, lavar con etanol y éter dietílico. Secar al vacío para obtener un polvo blanco soluble en agua. Almacenar las estructuras fabricadas para su posterior caracterización y empleo.

Síntesis microfluídica de nanopartículas

Las nanopartículas de TMC fueron sintetizadas con un equipo de microfluídica basándose en la metodología descrita por Tenorio et. al, 2023. Se preparó una solución acuosa de 10 mg/ml de TMC y una solución acuosa de TPP de 6 mg/ml. Ambas soluciones se colocaron en tubos cónicos de 50 ml cuyas bases fueron conectadas para alimentar al equipo de microfluídica de manera independiente e inyectadas a una presión de 1 bar a un chip microfluídico en forma de T, para la formación de las nanopartículas. Las nanopartículas sintetizadas fueron colectadas en alícuotas de 1 ml que fueron liofilizadas para su posterior caracterización. Por su parte, los nanoacarreadores de proteína BSA fueron sintetizadas de manera similar, resuspendiendo 12 o 55 µg/ml de BSA, o bien 12µg de BSA marcada con FITC, en la solución de TMQ y procediendo a la síntesis previamente mencionada.

Similarmente, al finalizar la síntesis se colectaron alícuotas de 1 ml que fueron liofilizadas para su posterior uso.

METODOLOGÍAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El fundamento del TEM consiste en usar un haz de electrones altamente energético, que se genera en un cañón de electrones y se enfoca en una muestra delgada colocada en el camino de éste. Cuando los electrones atraviesan la muestra, interactúan con los átomos y las estructuras de la muestra. Estas interacciones causan dispersión y absorción de los electrones, lo que da lugar a un patrón de intensidades de electrones transmitidos y dispersados. Al colocar un detector en la trayectoria de los electrones transmitidos, se colectan y procesan los electrones, con que serán detectados y transducidos para generar una imagen resultante de la región de la muestra analizada.

En este trabajo de tesis, se realizó el montaje de las muestras en rejillas de cobre (400 *mesh*), con membrana de carbono, de la mezcla total resultado de la síntesis. Previo al montaje de la muestra, las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo al 2 % y secadas en atmósfera normal. Posteriormente, fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión JEOL-1400. Las imágenes tomadas fueron analizadas usando el software Image J® para la determinación de la morfología y diámetro de las partículas sintetizadas.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

La técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) emplea la interferometría de Michelson para registrar información sobre un material expuesto a un haz de luz en la región infrarroja (número de onda 4000 a 400 cm^{-1}) (longitud de onda 2.5 a 25 μm). La aplicación de la transformada de Fourier al espacio de frecuencias en función del tiempo resulta en una serie de espectros de transmitancia/absorbancia en función del número de onda de la luz incidente, que se emplean para la identificación de las bandas vibracionales de los grupos funcionales presentes en la muestra analizada. Estos patrones espectrales facilitan la identificación de la muestra, dado que las moléculas presentan huellas específicas en el infrarrojo en la región del 1100 a 400 cm^{-1} , que se conoce como la región de la huella dactilar.

Para esta investigación, se colocaron las muestras de nanopartículas fabricadas y liofilizadas en la placa base del espectrómetro Bruker Alpha II, para un barrido de transmitancia en un rango número de onda de 525- 4000 cm^{-1} .

Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) constituye un método de análisis mediante el cual se registra la masa de una muestra en función del tiempo, mientras varía la temperatura o se mantiene constante durante un período determinado. Este método se emplea para examinar las propiedades y composición de los materiales, evaluar tasas de descomposición y evaporación, estudiar procesos de oxidación, etc.

Aquí, se colocaron 15 mg de muestra de nanopartículas liofilizadas en sus distintas condiciones de síntesis en un crisol colocado sobre el equipo de TGA 4000 de Perking Elmer. Se colocaron parámetros de inicio a 20°C y de finalización a 800°C con pasos de 15°C por minuto.

Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X

XPS es un método de espectrometría fotoelectrónica que implica la medición de los espectros de los fotoelectrones inducidos por fotones de rayos X sobre los orbitales más internos de los átomos. Ello permite obtener información de las primeras 10 capas atómicas de una muestra. Es una espectroscopia semi-cuantitativa y alta de resolución lateral, que permite estimar la estequiometría, estados químicos elementales y estructura electrónica de los elementos presentes sobre la superficie de un material. Los espectros son obtenidos cuando una muestra es irradiada con fotones de rayos X para coleccionar la energía cinética, o equivalentemente la energía de enlace, proporcional al número de electrones que escapan de la superficie del material analizado.

En esta investigación, se prepararon sustratos de vidrio de 5 mm de lado para el autoensamblado de las muestras de interés. Los sustratos empleados fueron sometidos a un lavado ultrasónico de agua y detergente libre de fosfatos por 15 min. Un mínimo de tres veces se realizaron lavados con agua corriente y destilada o desionizada, para retirar los residuos de detergente. Se secaron con nitrógeno gas y se volvieron a colocar en un segundo lavado ultrasónico de acetona durante 15 min. Nuevamente se lavaron con etanol y se secaron con nitrógeno gas dos veces. Dichos lavados permiten eliminar óxidos y orgánicos no deseados presentes en su superficie. Los sustratos limpios fueron colocados en cajas de Petri para su uso. Una vez limpios se autoensambló una muestra de 10 µl de las distintas muestras de nanopartículas, dejando secar dentro de un desecador por 24 h. Las muestras fueron analizadas en un equipo K-alpha de Thermo Scientific en modos *survey* (1200-0 eV) y detalle sobre todas las ventanas de los elementos de interés.

CULTIVO CELULAR

Células J774

Se cultivaron células J774 (macrófagos de ratón) usando medio DMEM- Alta glucosa con SFB al 10%. Durante los pasajes, las células fueron removidas de manera mecánica y contadas en cámara de Neubauer para ser sembradas en placas petri según fue necesario. Dichas células son adherentes, que se utilizan como modelo de macrófagos por su capacidad de exhibir características inmunológicas innatas y adquiridas, además de ser células fagocíticas y presentadoras de antígeno.

Células HaCaT

Se cultivaron células HaCaT (queratinocitos inmortalizados humanos) usando medio DMEM-F12 suplementado con SFB al 10 %. Durante los pasajes las células fueron removidas usando 500 μ l de tripsina-EDTA por 5 min y contadas en cámara de Neubauer para ser sembradas en placas petri según fue necesario. Dichas células tienen características epiteliales y son ampliamente usadas por su capacidad de diferenciación, y por lo tanto tienen la capacidad de mostrar distintas etapas del epitelio. Además de que, al no ser células fagocíticas, sirven como control para el monitoreo de la internalización de nanopartículas.

Ensayo de proliferación celular mediante azul alamar

Se sembraron 12,000 células HaCaT y 15,000 células J774 en placas de 48 pozos, y se dejaron adherir por 24 h. Las células fueron tratadas con 250 μ g/ml, 400 μ g/ml y 500 μ g/ml de nanopartículas con BSA por 24, 48 y 72 h. Al término de cada uno de los tratamientos se retiró el medio y se lavó con PBS, para colocar 500 μ l de OptiMEM y Azul Alamar al 10 %, incubando durante 1 h. Se colectó el sobrenadante en una placa de 96 pozos y se leyó en el fluorómetro Fluoroskan Ascent usando los filtros ópticos de 570 nm y 600 nm. Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 6[®].

Ensayo de activación lisosomal

Se sembraron 30,000 células J774 en placas p35 con fondo de vidrio y se dejaron adherir por 24 h. Las células fueron tratadas con 500 μ g/ml de nanopartículas con BSA-FITC por 1 h en medio, en ausencia de SFB. Al finalizar ese tratamiento, se lavaron las células con PBS y se colocó medio fresco y 50 μ l de Lysobrite-Red (Dilución 1:500), y se dejó teñir por 30 min. Finalmente se retiró ese medio, se lavó con PBS y se colocó medio fresco con 10 % de SFB.

Ensayos de inhibición de endocitosis mediante azida de sodio y dyngo-4

Se sembraron 30,000 células J774 en placas p35 con fondo de vidrio y se dejaron adherir por 24 h. Las células fueron tratadas con NaN_3 120 mM o Dyngo-4a 30 mM por 10 min.

Posteriormente se lavaron con PBS dos veces y se trataron con 500 µg/ml de nanopartículas con BSA-FITC por 1 h en medio en ausencia de SFB. Al finalizar ese tratamiento se lavaron las células con PBS y se colocó medio fresco y 50 µl de Lysobrite-Red (Dilución 1:500), y se dejó teñir por 30 min. Finalmente se retiró ese medio, se lavó con PBS y se colocó medio fresco con 10 % de SFB.

Microscopía confocal de células vivas

Las células se observaron en el microscopio confocal Nikon Eclipse Ti incubadas a 37°C y 5 % de CO₂, con intensidad de láser rojo de 105 hV y láser verde de 82 hV. Se realizaron distintos cortes en el eje z, de aproximadamente 0.5 µm, y las imágenes se analizaron con el software Fiji de ImageJ®.

RESULTADOS

Las muestras de base trimetil quitosán, sintetizadas por la técnica de microfluídica fueron: 1. Partículas de trimetil quitosán (NP_TMQ), 2. partículas de trimetil quitosán con 12 $\mu\text{g/ml}$ de BSA (NP_TMQ-BSA12), 3. partículas de trimetil quitosán con 12 $\mu\text{g/ml}$ de BSA marcado con FITC (NP_TMQ-BSA12/FITC) y 4. partículas de trimetil quitosán con 55 $\mu\text{g/ml}$ de BSA (NP_TMQ-BSA55).

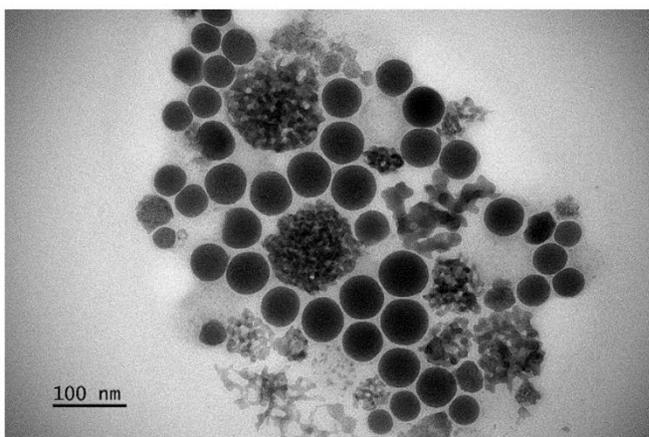
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Se cuantificaron un total de 100 partículas por micrografía de muestra fabricada, usando el software ImageJ® para determinar el diámetro promedio (D), la primera desviación estándar (FSD) y coeficiente de variación (CV), así como su morfología.

Nanopartículas de N- trimetil quitosán

La **Figura 9a** corresponde a una micrografía TEM donde se aprecia que las nanopartículas de NP-TMQ son esféricas con una superficie suave. Así mismo, se observan aglomerados que se atribuyen a residuos de TPP. Para esta muestra, que no se fabricó en presencia de proteína, el diámetro promedio correspondió 36.3 ± 16.3 nm y un CV de 12.5 % (**Figura 9b**). Para incrementar su diámetro promedio, se fabricaron muestras con trimetil quitosán de otros pesos moleculares. Sin embargo, no se obtuvo un cambio significativo con respecto al tamaño de partícula. Por ello, se procedió a la síntesis utilizando BSA como medio para observar si la concentración de proteína estaba relacionada con el tamaño final de las nanopartículas.

a)



b)

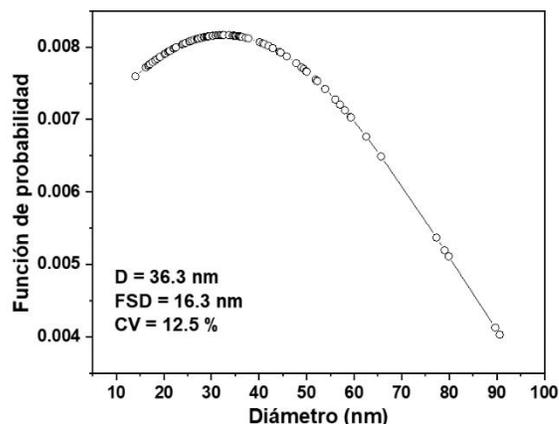


Figura 9. a) Micrografía TEM de nanopartículas de N-trimetil quitosán "vacías" (NP-TMQ) y b) distribución de diámetro promedio, primera desviación estándar y coeficiente de variación.

En las nanopartículas sintetizadas con 12 µg de BSA como proteína a cargo, se observó que las partículas también presentaron una morfología esférica (**Figura 10a**). Así mismo, se presentó un incremento de tamaño cercano al doble con respecto a las nanopartículas vacías. Dicho diámetro promedio determinado correspondió a 73.1 ± 21.7 nm y CV de 17.6 %.

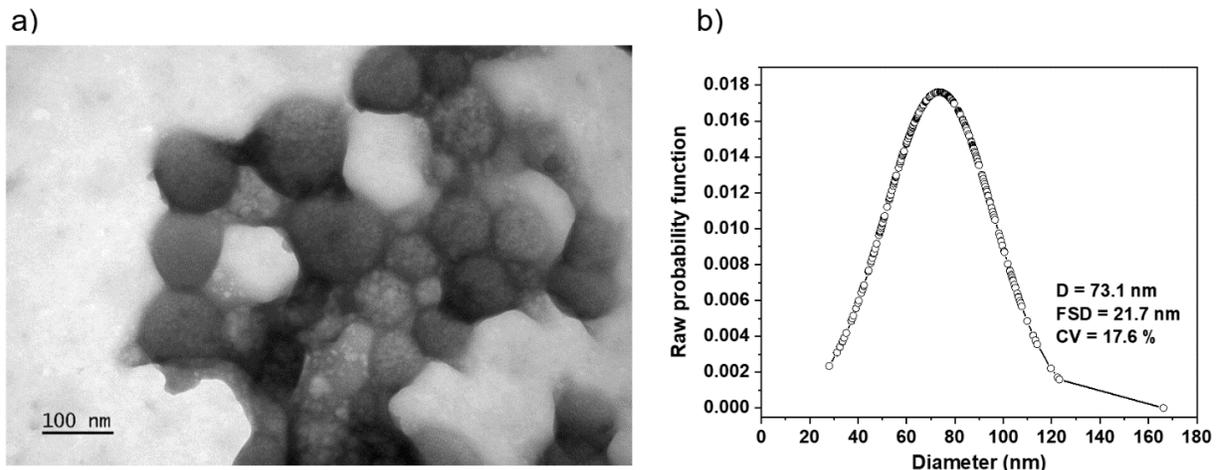


Figura 10. a) Micrografía TEM de nanopartículas de N-trimetil quitosán con 12 µg de BSA a cargo y b) distribución de diámetro promedio, primera desviación estándar y coeficiente de variación.

Adicionalmente, se fabricaron por microfluídica otras concentraciones de proteína BSA, que demostraron que la concentración de proteína presente está relacionada directamente con el tamaño de partícula (**Tabla 1**). En el **Anexo** se presentan las dispersiones de los diámetros promedios de las muestras NP_TMQ/BSA12-FITC y NP_TMQ/BSA55.

Tabla 1. Datos morfométricos correspondientes a las distintas síntesis de nanopartículas por microfluídica.

Muestra	Diámetro promedio (nm)	Primera desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
NP_TMQ	36.3	16.3	12.5
NP_TMQ/BSA12	73.1	21.7	17.6
NP_TMQ/BSA12-FITC	71.7	26.1	18.8
NP_TMQ/BSA55	179.3	119.3	92.7

Huang et al. fabricaron nanopartículas de quitosano marcadas y no marcadas con FITC de varios pesos moleculares y grados de desacetilación (DD) utilizando el método de gelificación ionotrópica utilizando TPP. Determinaron que el diámetro promedio de las estructuras de 88 % de DD y 213 kDa de peso molecular, marcadas y no marcadas con FITC, incrementó de 188 a 214 nm, respectivamente, con una polidispersidad de 0.43 y 0.36 (Huang, Khor, & Lim, 2004). Por su parte, Xu et al. reportaron la fabricación de nanopartículas de TMQ de 240.3 ± 42 (Xu et al., 2015), mientras que Amidi et al. fabricaron

nanopartículas de TMQ y nanopartículas de TMQ cargadas con ovoalbúmina (0.5 mg/ml) de 360 ± 26 nm y 479 ± 32 (después de la purificación), respectivamente, empleado quitosán de 42 kDa (Amidi et al., 2006). Así mismo, Majedi et al. y Tenorio et al., reportaron que el uso de microfluídica permite la fabricación de nanopartículas y nanopartículas con proteína a cargo, o nanoacarreadores (Majedi et al., 2013; Tenorio-Barajas et al., 2023).

En este trabajo, se observa que la dispersión de las nanopartículas es inferior al 20 %, que confirma que la técnica por microfluídica es una herramienta de fabricación de nanoacarreadores de baja dispersión de tamaños. Además, encontramos que 12 mg/ml de proteína BSA (NP-TMQ/BSA12) producen nanopartículas con un CV del 17.6 %, mientras que el empleo de una concentración de BSA a 55 mg/ml (NP-TMQ/BSA12) incrementa la dispersión hasta 92.7 %. Proponemos que la alta dispersión de tamaños en TMC/BSA55-NP se debe a la agregación de la proteína BSA como centros de nucleación de varios tamaños, dando tamaños de partículas amplios. No así sucede con concentraciones de 12 % de BSA, que genera centro de nucleación en agregados pequeños de proteína.

ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

Una de las características importantes, adicional a la morfología y tamaño de partícula, es la estabilidad térmica de un material, si es que se va a destinar para su empleo como nanoacarreador de fármacos o proteínas. Los gráficos correspondientes a la degradación de las muestras de nanopartículas de N-trimetil quitosán vacías (NP_TMQ) y con proteína BSA en concentración de 12 $\mu\text{g/ml}$ sin marcar (NP_TQM/BSA12), se muestran en la **Figura 11**. Así mismo, se incluye la primera derivada de los termogramas de las muestras analizadas, para obtener la temperatura alrededor de la cual se realizó el cambio de fase.

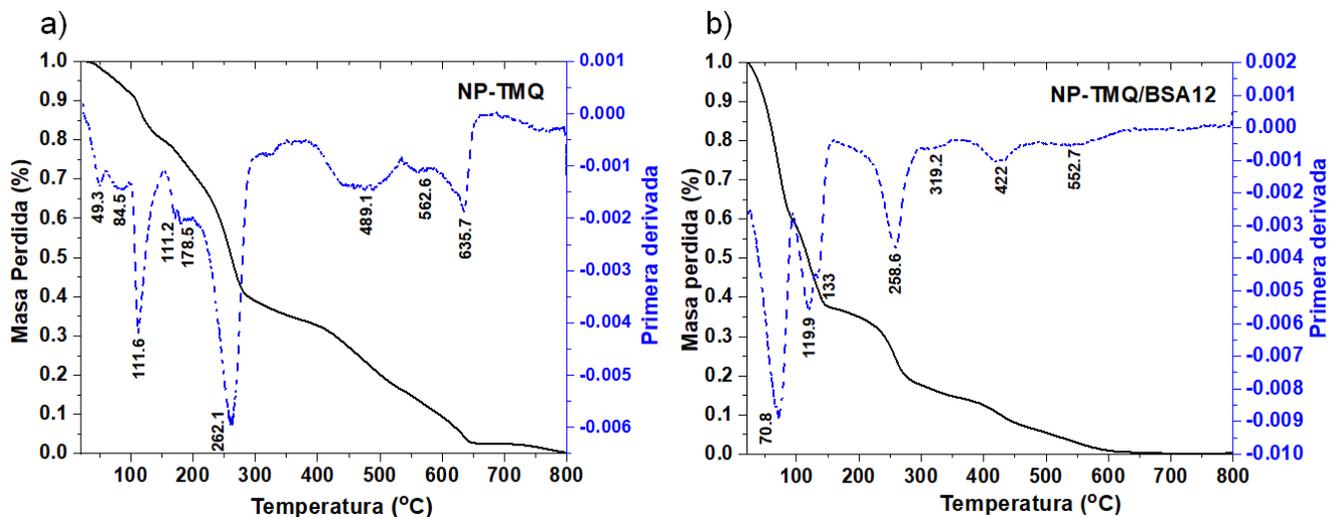


Figura 11. a) Gráfico correspondiente a la degradación de la masa de nanopartículas de TMC control y b) con 12 μg de BSA a cargo.

Por su parte la **Tabla 2**, resume a los estadios de degradación y pérdida de masa de las muestras fabricadas (**Tabla 1**), así como de los precursores empleados en la síntesis.

Tabla 2. Etapas de degradación y pérdida de masa de muestras fabricadas. Las temperaturas corresponden a la primera derivada (Dm) de la etapa de degradación. Se incluyeron muestras de QN y TMQ liofilizadas.

Etapas de degradación	Muestras											
	QN (liofilizado)		TMQ (liofilizado)		NP-TMQ		NP_TMC/BSA12		TMC/BSA12_FITC-NP		TMC/BSA55-NP	
	T (°C) de DTGA	Masa perdida (%)	T (°C) de DTGA	Masa perdida (%)	T (°C) de DTGA	Masa perdida (%)	T (°C) de DTGA	Masa perdida (%)	T (°C) de DTGA	Masa perdida (%)	T (°C) de DTGA	Masa perdida (%)
1st	62.9	4.7	104.6	20.4	49.3	0.5	70.8	16.8	61.2	13.7	52.1	0.8
2nd	303.4	31.6	165.9	45.4	84.5	2.6	119.9	28.5	114.0	33.7	113.7	5.1
3rd	630.0	58.7	281.0	69.0	111.6	4.9	133.0	32.0	190.1	50.2	181.9	10.4
4th	--	--	524.5	76.5	178.5	10.9	258.6	10.9	246.8	63.0	260.0	22.3
5th	--	--	800.0	85.0	262.1	22.9	319.2	22.9	323.7	71.8	437.4	33.4
6th	--	--	--	--	489.1	35.7	422.0	48.2	471.4	85.2	603.2	42.3
7th	--	--	--	--	552.6	39.1	800.0	53.3	600.0	100.0	800.0	44.0
8th	--	--	--	--	635.7	43.6	--	--	--	--	--	--

Como se observa en la **Tabla 2** y en la **Figura 27** del **Anexo**, la pérdida de masa de QN (liofilizado) se produce principalmente en dos etapas: la primera comienza con el aumento de la temperatura hasta aproximadamente 115 - 130 °C, derivada de la pérdida de un 4.7 % de humedad por evaporación adsorbida y absorbida en la red polimérica del QN, asociada con un evento endotérmico centrado en un pico alrededor de los 63 °C. Mientras, la segunda etapa es de 185 – 355 °C que se debe a la descomposición del QN por la desacetilación y despolimerización parcial de la cadena de quitosano (Szymańska & Winnicka, 2015). Corazzari et al., reportaron que en este segundo escalón de degradación pirolítica del quitosán, se presenta la liberación de agua de la cadena polimérica, así como de NH₃, CO, CO₂ y CH₃COOH, con una pérdida de masa de cerca del 32 % (Corazzari et al., 2015). Una tercera etapa final de degradación se produce alrededor del pico 630 °C, en el rango 450-750 °C, correspondiente a la liberación de CH₄ y la subsecuente formación de una estructura tipo grafito en la calcinación, con una pérdida de masa de 58.7 % derivado del grado de la desacetilación del precursor (Corazzari et al., 2015; Szymańska & Winnicka, 2015). Por su parte el TMQ (liofilizado), igual que QN (liofilizado), presenta la pérdida de agua desde 30 hasta 130 °C pero con una masa perdida de 20.4 %. En este caso, la segunda etapa se centró alrededor del pico 165 °C, mientras que en QN se centró alrededor de 300 °C. Este corrimiento de temperaturas hace a TMQ menos térmicamente estable que QN se puede atribuir a la incorporación de los terminales metilos en los aminos, generando una disminución en la resistencia intra cadena (Pardeshi & Belgamwar, 2016). Por su parte, Jones et al. y Adamiano et al., reportan que la degradación de las diversas cadenas de la proteína BSA se realiza en cuatro etapas principales, con una pérdida aproximada de masa de 69 %. Los picos de cada etapa se centran alrededor de 225, 313, 321 y 445 °C (Adamiano, Lesci, Fabbri, & Roveri, 2015; Jones, Zeller, & Sharma, 2013). Sin embargo, en

el reporte de Jones et al. puede reconocerse una quinta más alrededor de 65 °C, atribuible a la pérdida de agua.

En la muestra NP_TMQ (**Figura 11a**), se observan ocho rampas de degradación, donde la pérdida de masa de las primeras tres centradas alrededor de 50, 85 y 112 °C, se debe principalmente a la evaporación de adsorbida y absorbida en la red polimérica del TMC, así como a componentes volátiles presentes en la muestra, siendo menor en masa a la correspondiente al polímero liofilizado. La segunda rampa de interés se presentó alrededor de 260°C, y no en 165 °C como fue para el caso de el TMQ liofilizado. La variación de la estabilidad térmica entre la muestra liofilizada (TMQ) y la nanoparticulada (NP_TMQ) puede atribuirse al entrecruzamiento físico que se presenta entre los sitios positivamente cargados del N-trimetil quitosán y los negativamente cargados del TPP, que espontáneamente generan la formación de las nanopartículas. La interacción física que se produce entre las moléculas de TMQ y TPP estabilizan térmicamente los segmentos de las cadenas poliméricas de las nanopartículas (Facchi et al., 2016; Sadeghi, PourEskandar, Askari, & Akbari, 2023). Las nanopartículas cargadas con 12 µg de BSA (**Figura 11b**) presenta 5 rampas de degradación, donde los picos alrededor de 71, 120 y 133 °C indican una mayor retención de agua dentro de la red polimérica de la muestra NP_TMQ/BSA12. En este caso la descomposición del TMQ por la despolimerización parcial de la cadena del quitosán con la cuaternación de los terminales aminos se presentó también alrededor de 259 °C, mientras que las rampas de descomposición térmica por la presencia de la proteína presentaron un corrimiento en sus picos térmicos de la primera derivada a 319, 422 y 553 °C. Esto es atribuible a la interacción electrostática entre los terminales carboxilos y aminos del TMQ.

ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Los espectros FTIR de las muestras fabricadas con la menor dispersión de tamaños (**Tabla 1**), muestras NP_TMQ, NP_TMQ/BSA12 y NP_TMQ/BSA12-FITC, se presentan en la **Figura 12**. Así mismo, se incluyeron como controles muestras liofilizadas de quitosán y BSA.

Se observa que el polvo de quitosán (95 %DD) presenta las características bandas de estiramiento -OH y enlaces de hidrógeno intramoleculares en 3365 y 3290 cm⁻¹, respectivamente, así como los enlaces -NH₂ asimétricos y simétricos en 3200 y 3110 (Zajac, Hanuza, Wandas, & Dymińska, 2015). Los enlaces de estiramiento C=O de los grupos acetamida de la amida I aparecen en 1650 cm⁻¹, la vibración de flexión NH₂ de la amina II en 1590 cm⁻¹, el estiramiento C-N y la vibración N-H de la amida II en presentes a 1570 cm⁻¹, mientras que los bandas de amida III en 1326 cm⁻¹ se debe al estiramiento de N-H y C-N (Ding, Xia, & Zhang, 2006; Geçer, Yıldız, Çalimli, & Turan, 2010; Huang et al., 2004; Liu, Shen, Zhou, Wang, & Deng, 2016). Por su parte, los espectros de nanopartículas de TMQ (NP_TMQ) presentan una banda más afilada y desplazada en 3418 cm⁻¹, asociada con la combinación de los terminales NH₂ y OH, y en 1212 y 955 cm⁻¹ se observaron los grupos

P=O y P-O-P, respectivamente, que indica el entrecruzamiento entre TPP y los sitios del TMQ cargados positivamente durante la fabricación de las nanopartículas (Geçer et al., 2010).

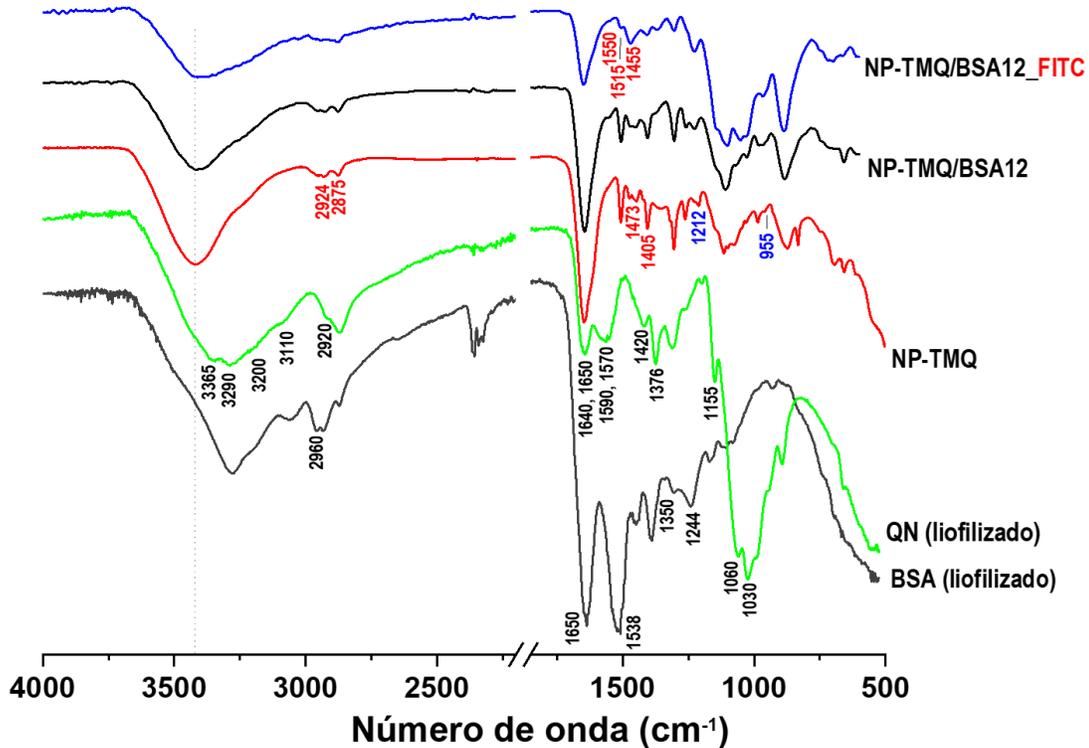


Figura 12. Espectro FTIR de las muestras seleccionadas NP_TMQ, NP_TMQ/BSA12 y NP_TMQ/BSA12-FITC. Se incluyen QN y BSA liofilizado como controles.

Como se ha reportado, la vibración de flexión del NH₂ de la amina II del quitosán disminuye tanto en el TMQ como en NP_TMQ (de Britto, de Moura, Aouada, Mattoso, & Assis, 2012). Así mismo, las bandas CH₃ en 1405 y 1360, y CH₂ en 1475 cm⁻¹ son debidas a la sustitución de grupos metilo con grupos H en el segundo carbono del quitosán (C₂-NH₂) durante el proceso de trimetilación del QN (Ding et al., 2006; Geçer et al., 2010). El espectro de la proteína BSA liofilizada muestra la banda de estiramiento C=O de la amida I y la flexión -NH de las bandas de la amida II de la α -hélice en 1650 y 1538 cm⁻¹, respectivamente, mientras que las bandas en 1350 y 1244-1240 cm⁻¹ son atribuido a la amida III de la α -hélice, así como a las vibraciones antiparalelas de la hoja β de la proteína (Ahmad, Zhou, Ling, Xiang, & Zhou, 2016; Sripriyalakshmi, Anjali, George Priya Doss, Rajith, & Ravindran, 2014; Yadav & Yadav, 2021). La atenuación de la banda de estiramiento C=O (1650 cm⁻¹) de las muestras NP_TMC/BSA12 y NP_TMC/BSA12-FITC así como la disminución de la intensidad en 1538 cm⁻¹ están relacionadas con la unión, pérdida y encapsulación de la α -hélice y la proteína BSA (Ahmad et al., 2016; Tenorio-Barajas et al., 2023). De la misma manera, la desaparición de la banda 1244-1240 cm⁻¹ se atribuyó a modificaciones en las vibraciones antiparalelas de la hoja β por el TMQ (Sripriyalakshmi et al., 2014).

ESPECTROSCOPÍA DE FOTOELECTRONES DE RAYOS X

La proteína BSA (66 kDa) fue empleada como proteína cargo para el desarrollo de este trabajo de tesis dado que se presenta en el 60% del plasma de organismos vertebrados y una similaridad estructural con la albumina de suero humana del 76 %. Es una proteína globular no glicosilada de 583 aminoácidos, organizados en una cadena simple entrecruzada con 17 residuos de cistina, en ocho puentes disulfuro y un grupo tiol (Topală, Bodoki, Oprean, & Oprean, 2014). Para determinar si la proteína BSA fue encapsulada con TMQ durante el proceso de fabricación por microfluídica, se empleó espectroscopia de fotoelectrones de rayos X en modos *survey* (**Figura 13**) como a detalle de los orbitales oxígeno, nitrógeno, carbono y fósforo (**Figura 14**), de muestras de nanopartículas con 12 μg de BSA a cargo (NP_TMQ/BSA12) y 55 μg de BSA (NP_TMQ/BSA55), nanopartículas sin proteína (NP_TMQ) y de BSA liofilizada, como control. En los espectros *survey* se identifican las energías de enlace correspondientes a los orbitales O(1s), N(1s), C(1s), P(2p_{3/2}), Na(1s) centrados en 532, 399, 285, 132 y 1072 eV (Vincent Crist, s/f), presentes en la proteína BSA, TMQ y TPP empleados en la síntesis de las nanoestructuras. Así mismo, se observa la presencia de diversas energías de enlace arriba de los 600 eV, asociadas con la presencia de impurezas no deseadas derivadas del autoensamble sobre los sustratos de vidrio empleados durante la caracterización.

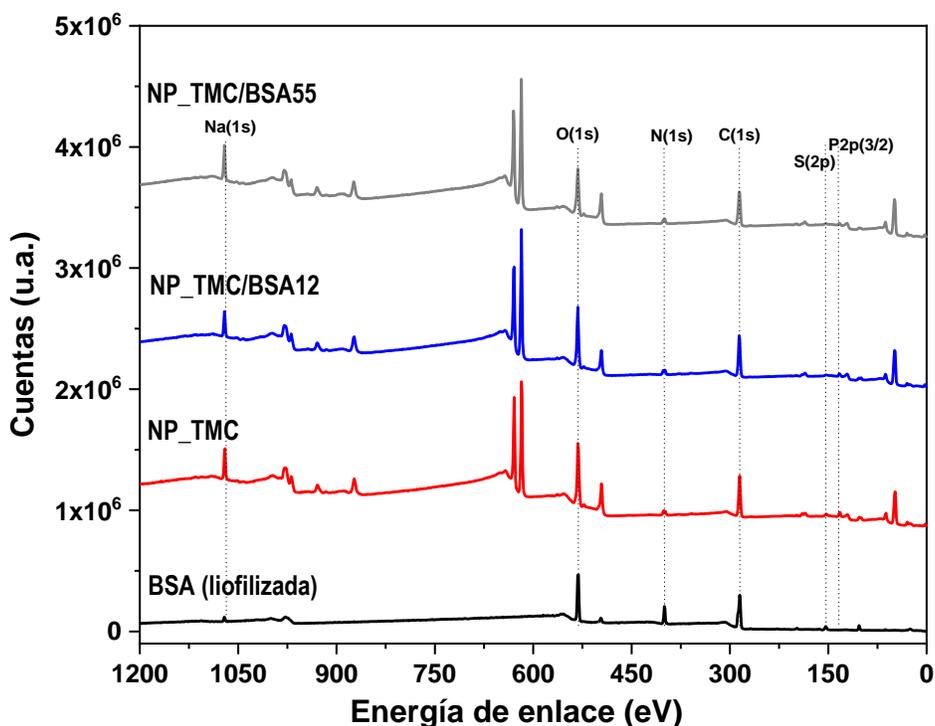


Figura 13. Gráfico XPS *survey* de muestras de nanopartículas vacías, con 12 μg de BSA, 55 μg de BSA y BSA "desnuda".

La **Tabla 2** resume los porcentajes atómicos porcentuales de cada uno de los elementos presentes en las muestras, exceptuando Na(1s) que no es de interés, determinados

mediante la cuantificación de las áreas bajo la curva de los espectros *survey*. Así mismo se incluyen las razones de C/O y N/C.

Tabla 3. Contenido atómico porcentual de cada uno de los elementos porcentuales detectados en los espectros XPS *survey* de las muestras fabricadas.

Elemento	Energía de Enlace (eV)	NPs_TMQ (%)	NP_TMQ/BSA12 (%)	NPs_TMC/BSA55 (%)
S(2p)	163-169	0	0	0
C(1s)	285	33.2	39.1	40
N(1s)	399	5.4	6	6.2
O(1s)	532	57.9	52.7	52
P(2p3/2)	132	3.5	2.2	1.8
Razón N/C	--	0.162	0.153	0.155
Razón C/O	--	0.573	0.742	0.8

La presencia de C(1s) proviene de la estructura tanto de BSA como del TMQ, así como del carbono residual que se adsorbe sobre las superficies de los materiales al ser expuestas al ambiente. Por su parte la presencia de O(1s) y N(1s) se encuentran en los precursores. Se señala en la **Figura 13** la posición del doblete del orbital azufre S(2p) alrededor de 163 eV, que fue empleado como marcador toda vez que tanto la estructura de la proteína BSA como la estructura de TMQ contienen nitrógeno y por tanto debió ser descartado para su empleo. Las relaciones N/C y C/O difieren de las reportadas previamente por Grenha et. al y Calvo et. al (Calvo, Remuñán-López, Vila-Jato, & Alonso, 1997; Grenha, Seijo, Serra, & Remuñán-López, 2007) por varias razones: 1) Ellos trabajaron la fabricación por gelación iónica, mientras en este trabajo se reporta la fabricación por microfluídica, 2) el grado de desacetilación del quitosano empleado (86% empleado por Grenha et al.) y 3) la metilación del quitosano. En este trabajo se empleó una relación TMQ/TPP = 1.6 contra la empleada por los autores mencionados de 3.6 y 4.4.

La deconvolución de los espectros a detalle de los orbitales de interés muestran el ambiente químico de cada uno de los elementos descritos. La **Figura 14a** corresponde al orbital P(2p3/2), donde se identifican los estados de oxidación del fósforo PO_3^{3-} y PO_4^{3-} en 132.4 y 133.0 eV, respectivamente (Siow, Britcher, Kumar, & Griesser, 2018) Por su parte, en el espectro a detalle de S(2p), en la **Figura 14b**, se observan tres señales en 168.3, 164.7 y 163.4 eV exclusivamente en la muestra de la proteína BSA liofilizada. La primera corresponde a los estados de oxidación del azufre SO^{2-} y SO^{3-} , mientras que en 164.7 y 163.4 eV se encuentra el doble con los estados S(2p1/2) y S(2p3/2) de los puentes disulfuro de la cistina, C-S-S-C (Siow et al., 2018). Dado que la técnica XPS es una técnica de análisis de superficies que detecta la emisión de fotoelectrones de rayos X provenientes de los últimos 10 nm de una muestra, y que no se detectó señal proveniente de las muestras con

o sin proteína a cargo (NP_TMQ, NP_TMQ/BSA12 o NP_TMQ/BSA55) es que se puede asegurar que la proteína se encuentra en el interior de la nanopartículas.

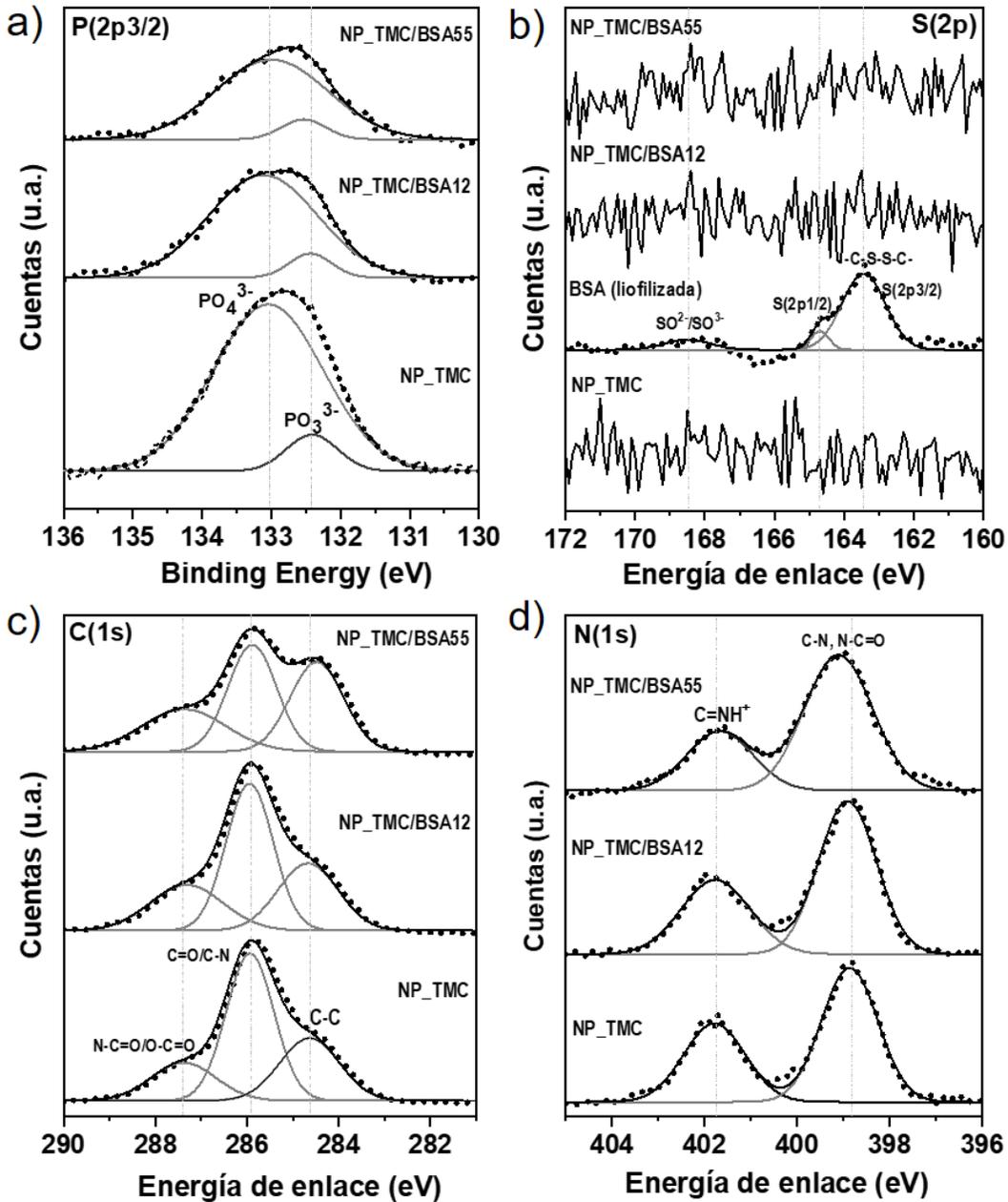


Figura 14. Espectros a detalle de XPS de los orbitales a) Fósforo b) Nitrógeno c) Carbono d) Azufre.

Así mismo, que el espesor de dichas nanopartículas es superior a 10 nm. En la **Figura 14c** se presentan los espectros a detalle del orbital C(1s) con los enlaces C-C/C-H en 284.6 eV, C=O/C-N en 285.9 eV y N-C=O/O-C=O en 287.3 eV (Foster, Harrison, & Castner, 2016; Munir et al., 2019) Finalmente, en la **Figura 14d** se observa la deconvolución del orbital N(1s), con la presencia de los enlaces C-N en 398.8 eV y N-C=O/C=NH⁺ en 401.7 (Munir et al., 2019; Siow et al., 2018).

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON AZUL ALAMAR

El ensayo de Azul Alamar se basa en el uso de resazurina como un indicador colorimétrico, ya que es un compuesto no tóxico, de color azul brillante y que puede permear en la membrana celular. Al entrar en células vivas la resazurina se reduce a resorufina, un compuesto fluorescente y de color rosa brillante. Debido a lo anterior es posible monitorear cambios en la proliferación de las células que estén relacionados con el metabolismo celular, a través de la medición de la diferencia entre los valores de fluorescencia emitidos por las muestras expuestas a distintos tipos de tratamientos.

Como se mencionó previamente en la sección de metodología, se usaron dos líneas celulares distintas por la información que pueden ofrecernos en materia de la caracterización toxicológica de los nanomateriales.

PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS HACAT

Se observaron diferencias significativas en la proliferación celular de HaCaT a las 48 y 72 h posteriores al tratamiento con las tres dosis (prueba t múltiple, $p < 0.05$) con respecto al control sin tratamiento. Sin embargo, se evidenció una tendencia hacia la recuperación de la proliferación a las 72 h, como se muestra en la **Figura 15**.

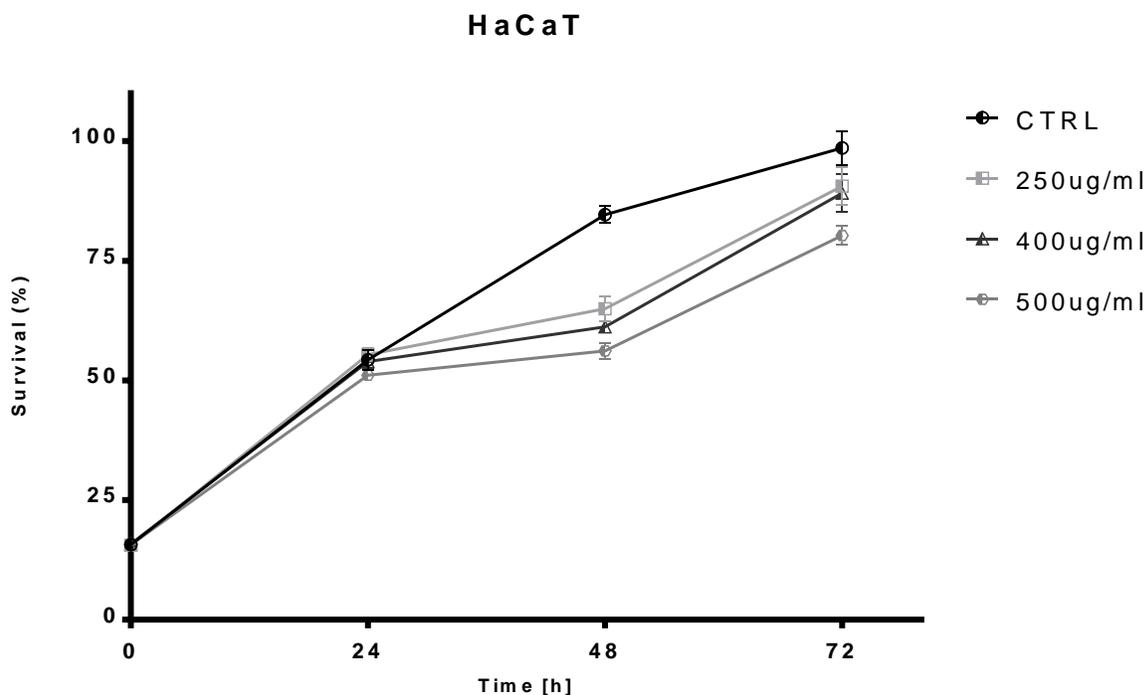


Figura 15. Monitoreo de proliferación celular de células HaCaT que fueron tratadas con distintas dosis de nanopartículas con 12ug de BSA

PROLIFERACIÓN CELULAR EN J774

En el caso de las células J774, se observó una diferencia significativa después de 24 h de tratamiento, persistiendo hasta las 72 h sin mostrar una tendencia hacia la recuperación (prueba *t* múltiple, $p < 0.05$, **Figura 16**).

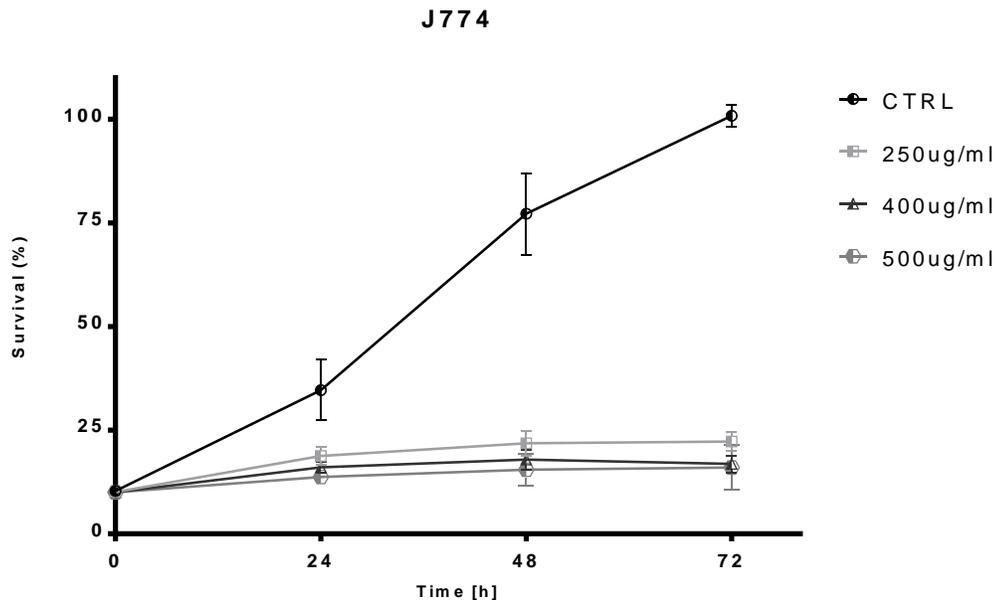


Figura 16. Monitoreo de proliferación celular de células J774 que fueron tratadas con distintas dosis de nanopartículas con 12ug de BSA.

Estos cambios podrían derivarse de la naturaleza inherente de las células, dado que las células HaCaT pertenecen al linaje de los queratinocitos, mientras que las células J774 pertenecen al linaje de los monocitos. Esta distinción podría influir metabólicamente y estar relacionada con el arresto del ciclo celular asociado con un aumento en la actividad metabólica y la diferenciación, más allá de posibles interpretaciones citotóxicas.

Tabla 4. Valores de *p* resultado de pruebas de *T* múltiples realizadas en comparación de los tratamientos de nanopartículas vs el control sin tratamiento tanto en células HaCaT como en J774

Tiempo (h)	CTRL vs 250µg (J774)	CTRL vs 400µg (J774)	CTRL vs 500µg (J774)	CTRL vs 250µg (HaCaT)	CTRL vs 400µg (HaCaT)	CTRL vs 500µg (HaCaT)
0	0.595543	0.525543	0.522477	0.839232	0.787912	0.97329
24	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.20449	0.690104	0.000638072
48	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
72	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.000380315	< 0.0001	< 0.0001

En la **Tabla 3**, se presentan los datos correspondientes a los valores de p resultado de las pruebas de t múltiple. Se observa qué tipo de comparaciones se hicieron con respecto al control y cuáles fueron aquellas que presentan una diferencia significativa.

Considerando como referencia los datos obtenidos, se determinó que el resto de los ensayos se realizaría en células J774 por sus capacidades fagocíticas y su potencial de seguimiento para futuros ensayos relacionados con procesos como presentación de antígeno y activación de vías proinflamatorias/ antiinflamatorias.

MICROSCOPIA CONFOCAL DE CÉLULAS VIVAS

Como se mencionó en secciones anteriores, monitorear la internalización de las nanopartículas a través de fluorescencia permite tratar de dilucidar el proceso metabólico de su degradación. Para ello, se empleó microscopía confocal de células vivas para monitorear en tiempo real el movimiento de las nanopartículas dentro de las células. Se realizaron dos tipos de ensayos principales: 1) la localización de las marcas de FITC (correspondientes a nanopartículas con BSA fluorisceinada, muestra NP_TMQ/BSA12-FITC) con respecto al campo claro, donde se observa la morfología celular y 2) la tinción de lisosomas con *Lysobrite*, cuyo mecanismo de acción se basa en la activación de la fluorescencia dependiente del pH lisosomal.

Inicialmente se realizaron observaciones cada hora para monitorear el movimiento de la marca verde (FITC), así como la estabilidad de la marca roja (*Lysobrite*) y se encontró que a partir de la tercera hora post-tratamiento con las nanopartículas fluorescentes, éstas se localizan en la periferia de la membrana celular (**Figura 17**).

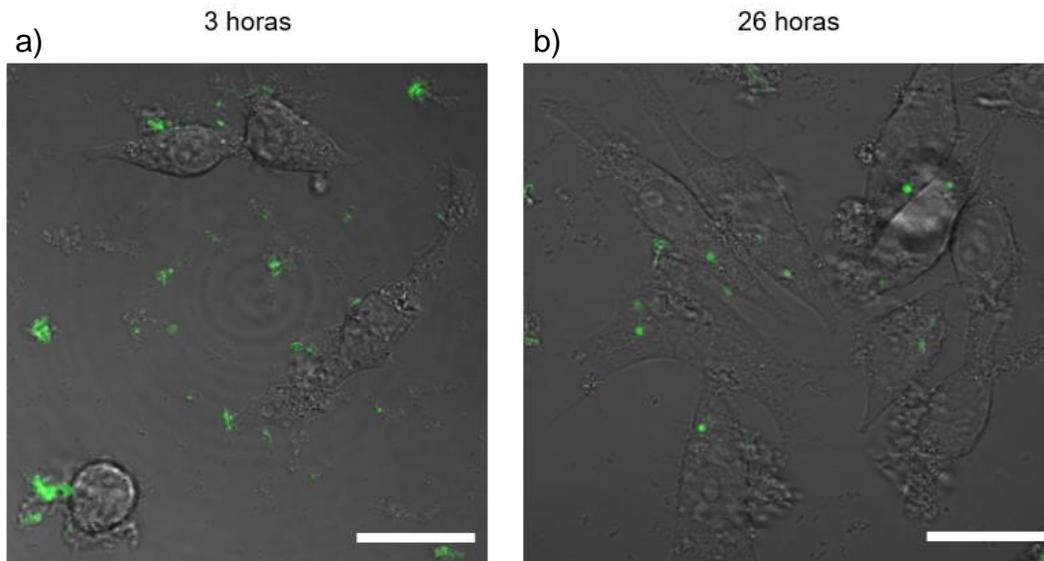


Figura 17. Imagen obtenida a través de microscopía confocal con la localización de nanopartículas con BSA-FITC (muestra NP_TMQBSA12-FITC) en células J774. a) 3 h y b) 26 h, post-exposición (Barra de escala = 25 nm).

Aproximadamente a partir de la quinta hora post-tratamiento, inicia la internalización visible dentro de las células J774. Esta actividad se mantiene por lo menos hasta 26 h post-tratamiento, tiempo en el cual se presentó la mayor cantidad de nanopartículas dentro de las células. Aunado a lo anterior, se monitoreó la actividad lisosomal a través del fluorocromo rojo de *Lysobrite*, cuya intensidad depende de la actividad metabólica de los lisosomas. Por lo anterior, se realizó un análisis semicuantitativo de los valores en *gris* de los píxeles en donde se encuentra señal de fluorescencia mediante el software ImageJ®, en donde se marcaron las células a analizar y se realizó la medición.

En la **Figura 18 (a y b)** se observa que a las 3 h post-tratamiento se presentó una clara diferencia entre el control sin tratamiento y las células tratadas con nanopartículas.

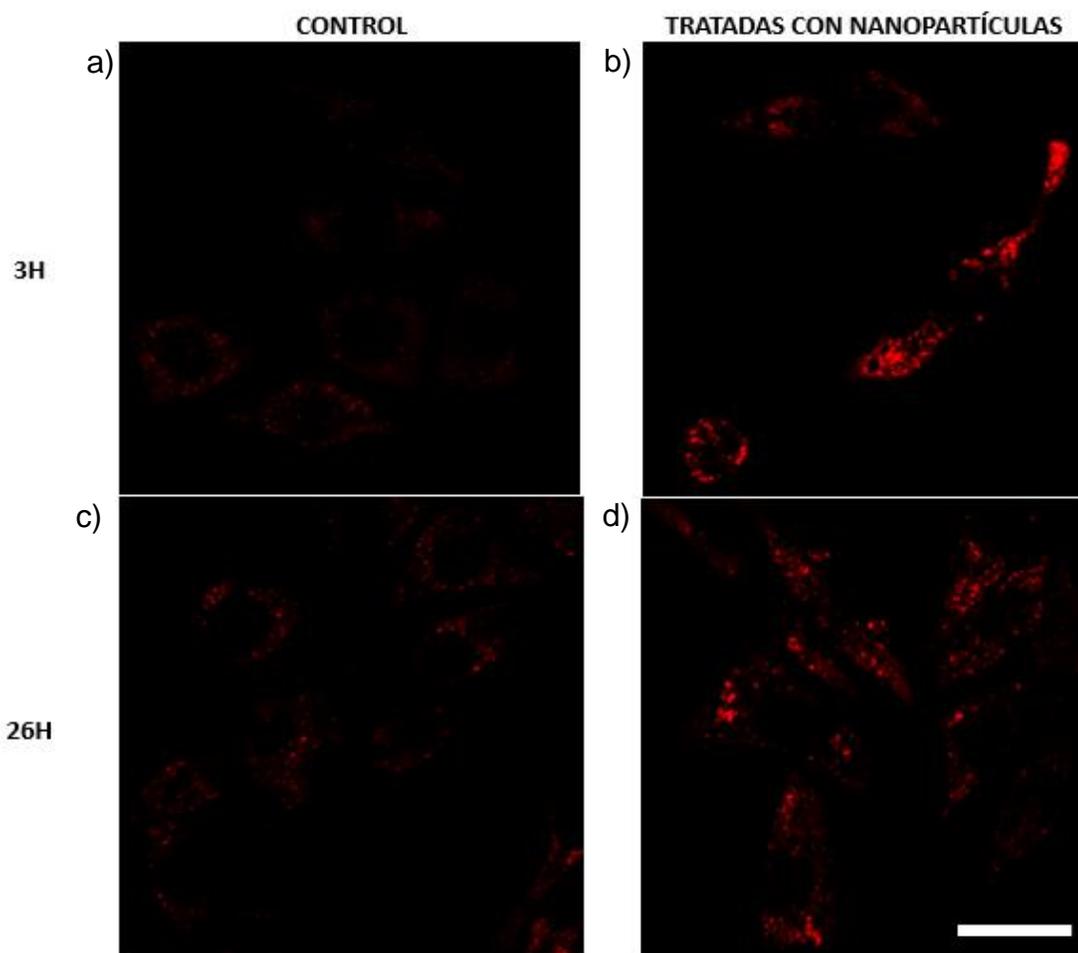


Figura 18. Células J774 tratadas con lysobrite para evaluar activación lisosomal a distintos tiempos post-exposición a) control, 3 h; b) nanopartículas BSA-FITC (muestras NP_TMQ/BSA12-FITC), 3 h; c) control, 26 h y d) nanopartículas BSA-FITC (muestras NP_TMQ/BSA12-FITC), 26 h (Barra de escala = 25nm).

Al realizar el análisis semicuantitativo de las células ($n = 23$ control; $n = 27$ tratadas), se observó una diferencia significativa a través de una comparación tipo t de Mann Whitney

para datos no paramétricos (**Figura 19a**). Sin embargo, a pesar de que la diferencia parece mantenerse a las 26 h post-tratamiento (**Figura 18c y d**), al aplicarse el análisis semicuantitativo (*t* de Mann Whitney para datos no paramétricos con $n = 21$ control; $n = 39$ tratadas), no se encontró diferencia significativa entre las células tratadas y el control (**Figura 19b**). Lo anterior es indicativo de un pico en la activación lisosomal al inicio del tratamiento con nanopartículas, y que al avanzar el tiempo se estabiliza la actividad lisosomal aunque prospere la internalización de éstas.

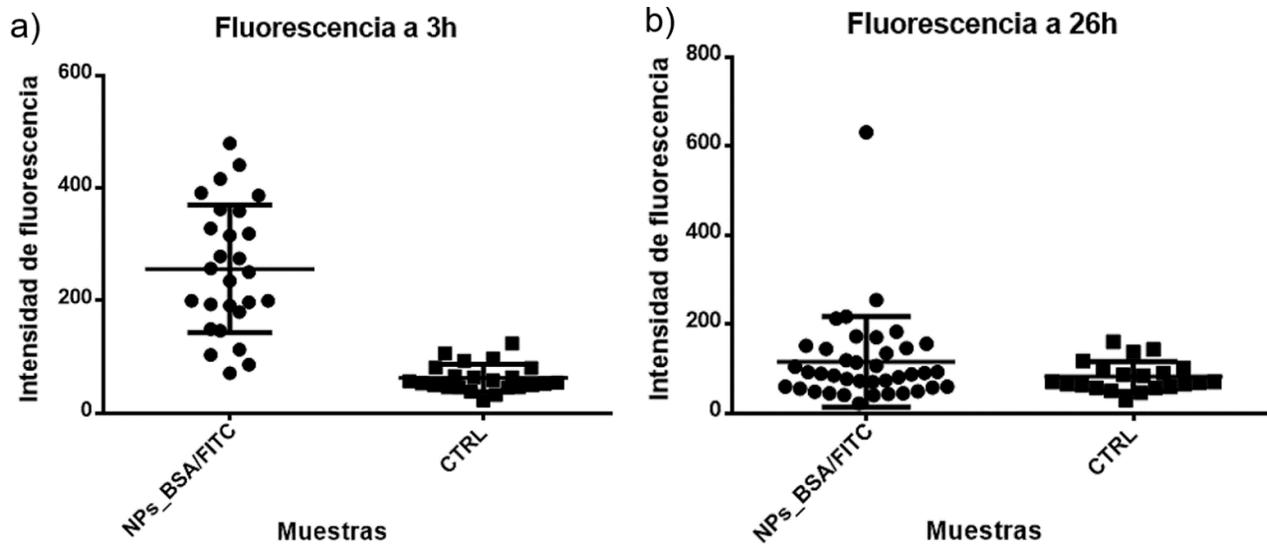


Figura 19. Representación de los datos semicuantitativos de fluorescencia de lisosomas de las células J774 tratadas con nanopartículas. Dichos datos fueron analizados por la prueba de U de Mann Whitney para datos no paramétricos.

Adicionalmente, se realizó la combinación de los canales rojo y verde, correspondientes a los fluorocromos detectados mediante el microscopio confocal para la co-localización de algunas marcas a partir de las 26 h post-exposición a las nanopartículas. Con ello, se demostró que hay internalización de las nanopartículas que comienza a partir de las 3 h post-exposición, y que existe degradación del material dentro de los lisosomas alrededor de las 26 h (**Figura 20f**). En las **Figuras 20b y 20e**, se observa que la marca verde pasa de estar dispersa a estar concentrada en cúmulos y que, (**Figuras 20c y 20f**), pasan de localizarse en los alrededores de la membrana celular y/o el citoplasma a co-localizarse de manera precisa con los sacos lisosomales.

Una vez analizado el tiempo de internalización de las nanopartículas, es importante tener conocimiento sobre la vía de endocitosis que la célula está utilizando. Para ello, se pueden emplear distintos inhibidores. En este trabajo se empleó azida de sodio con objeto de confirmar que las nanopartículas entran por endocitosis, y no por fagocitosis mediada por receptores o algunas vías alternas.

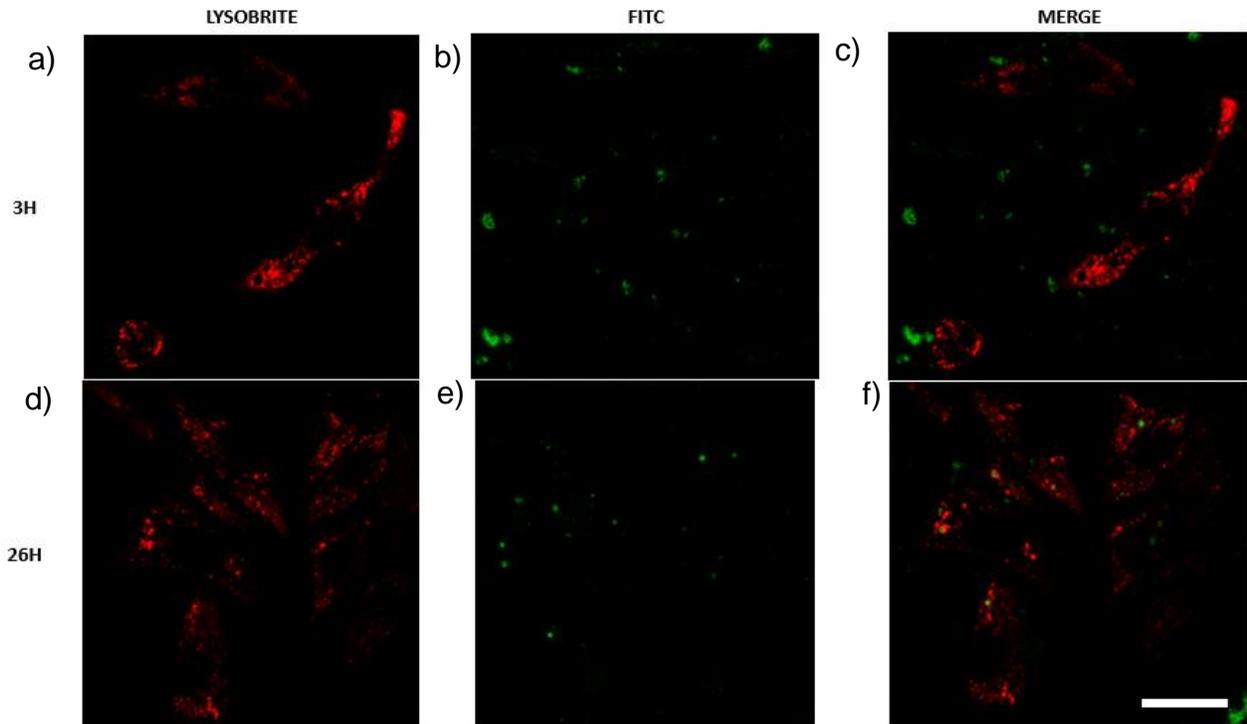


Figura 20. Co-localización de marcas verdes provenientes de las nanopartículas de BSA-FITC en células J774 a distintos tiempos post-exposición. a), b) y c) 3 h; d), e) y f) 26 h.

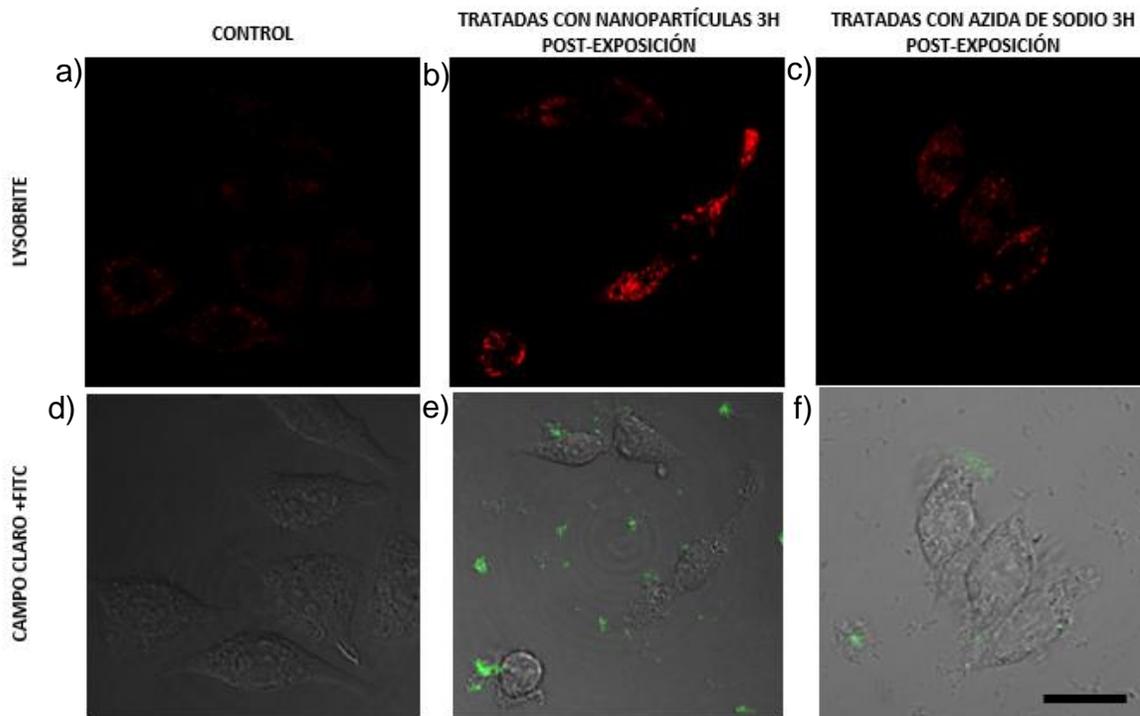


Figura 21. Células J774 tratadas con nanopartículas y azida de sodio para evaluar la inhibición de la endocitosis. a) y b) Control; c) y d) células tratadas con nanopartículas BSA-FITC y sin inhibidor; e) y f) células tratadas con azida de sodio y nanopartículas BSA-FITC y sin inhibidor.

En la **Figura 21** se muestran resultados representativos de los ensayos con azida de sodio como inhibidor de endocitosis. Se determinó que la activación lisosomal es similar a la observada en las células control, además de que se observó una acentuada disminución de los conglomerados correspondientes al FITC de las nanopartículas acarreadoras de proteína fluorescente. Los pocos conglomerados restantes, presentes en los distintos campos, se ubican en la membrana celular y en los cortes sobre el eje Z, más cerca del fondo. Esto podría atribuirse a que el efecto de la azida de sodio inhibe no solo la endocitosis de las partículas, sino también tiene un efecto en la manera que las nanopartículas interactúan con la membrana, impidiendo que permanezcan ancladas, ante la inhibición de la respuesta de endocitosis. Se evidenció que la activación lisosomal está relacionada a la endocitosis de las partículas, y puede ser la razón por la cual las células tratadas con inhibidores son tan parecidas a las células control.

DISCUSIÓN

Uno de los aspectos más importantes cuando se decide trabajar con nanoacarreadores es tener en cuenta sus características físicoquímicas, debido a que juegan un papel importante en la interacción con las células. Dentro de las características químicas más relevantes está la carga, que define el tipo de interacciones iniciales con las células; la capacidad acarreadora de agentes como fármacos o proteínas; así como su capacidad de retener agua. Se ha demostrado que el quitosán incrementa la permeabilidad celular de manera dosis dependiente, además de se ha reportado que dependiendo de su grado de acetilación y peso molecular, se pueden mejorar las propiedades de absorción de los elementos que acarrea dentro de distintos tipos de tejido, en especial mucosas (Bowman, 2017). Por lo anterior, se decidió que la trimetilación del quitosán potenciaría dichos efectos, además de hacer las nanopartículas estables en agua y más manejables a pH fisiológico (Amidi et al., 2006b) .

El uso de dichos nanoacarreadores ha visto incrementado su uso dentro de formulaciones orientadas al mejoramiento de vacunas, debido a que ofrecen la oportunidad de generar compuestos “minimalistas” que incrementan la efectividad de los antígenos de interés. De manera particular, se ha reportado que las nanopartículas poliméricas han sido ampliamente usadas para transportar antígenos proteicos o toxinas provenientes de microorganismos, muchas veces actuando como una capa protectora entre el agente de interés y el ambiente. Es por lo anterior que el encapsulamiento de los agentes de interés suele ser una de las metodologías para protegerlo y liberarlo únicamente cuando la nanopartícula es degradada dentro del sistema en donde se realizan los ensayos, como pueden ser cultivos celulares o modelos animales. Entonces, uno de los factores que toman mayor relevancia es el tamaño ya que se ha reportado que es una característica que define la afinidad entre las nanopartículas y distintos tipos de células inmunes. Por ejemplo: Las células dendríticas (CD) prefieren partículas cercanas al tamaño de virus (20-200 nm) mientras que los macrófagos prefieren partículas de mayor tamaño (0.5-5 μm) (Zhao et al., 2013b). Tomando en cuenta lo descrito previamente, era fundamental controlar la dispersidad de tamaño de las nanopartículas, procurando que fueren monodispersas.

El uso de la técnica microfluídica permitió disminuir la dispersión de diámetro promedio de las nanopartículas de TMQ, como se reportó desde que Tenorio-Barajas y colaboradores, (2023) propusieron la síntesis como alternativa al método por gelación iónica, comúnmente empleado para la síntesis de partículas de quitosán. Sin embargo, debido a la variación del largo de las cadenas poliméricas del quitosán empleado, la dispersión del diámetro no podrá ser disminuida como para poder tener como blanco algún tipo celular específico. Se ha reportado que usando otro tipo de polímeros biodegradables como el PLGA cuyo peso molecular se encuentra estandarizado, las nanopartículas pueden diseñarse para ser sintetizadas del mismo tamaño usando la técnica adecuada (Metz et al., 2016), por lo cual se plantea en un trabajo futuro la obtención de cadenas uniformes de quitosán peso medio

peso molecular. Como derivado de la quitina, el quitosán también presenta tanto pesos moleculares diversos, lo cual impacta directamente tanto en el tamaño, como en la dispersión de éste al momento de la síntesis de las nanopartículas (Aranda-Barradas et al., 2022). Sin embargo, la modificación de los grupos amino correspondiente a la metilación del quitosán, es un proceso que afecta la reactividad de éste con el agente entrecruzante (TPP), por lo que el equilibrio entre la metilación y la dispersión del peso molecular es estrecho. Se ha considerado que pueden existir alternativas para poder reducir la dispersión del tamaño, tales como el pre-tratamiento del quitosán en un baño sónico con el fin de tratar de reducir la variabilidad en su peso molecular, no obstante, se desconoce el efecto que dicho procedimiento podría tener en la metilación, y de manera subsecuente en la síntesis de nanopartículas.

Tomando en cuenta las características de dispersión, morfología, terminales reactivos expuestos y propiedades térmicas de las nanopartículas de trimetil quitosán con y sin proteína BSA encapsulada fabricadas en este trabajo, se puede afirmar que cuentan con las características necesarias para ser utilizadas como acarreadores útiles para el sistema inmune. Debido al tamaño, características fisicoquímicas y capacidad de contener proteína en su interior, es altamente probable que tengan una interacción favorable con células dendríticas o macrófagos.

Tenorio-Barajas et al., 2023, reportaron un posible mecanismo para la formación de los nanoacarreadores de proteína fabricados por microfluídica. En su trabajo, reportaron el encapsulamiento de proteína IgG empleando quitosán de bajo peso molecular. Propusieron que las moléculas de proteína funcionan como centros de nucleación al interactuar con los grupos funcionales del quitosán y que éstos conglomerados al entrar en contacto con el tripolifosfato forman una red polímero-proteína, donde el polímero termina recubriendo todo en la superficie. (Sakrani et al., 2014) describieron también dicho proceso (**Figura 22**).

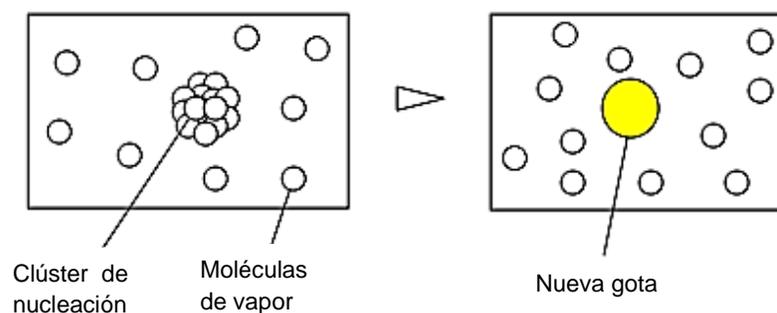


Figura 22. Proceso de nucleación en la síntesis de nanopartículas reportado por (Sakrani et al., 2014).

A diferencia de Tenorio et al., en este trabajo, se empleó como líquido acarreador agua dado que el precursor quitosán previamente fue trimetilado, lo que permitió que la formación de las nanoestructuras y nanoacarreadores fuese realizado al interior de la celda microfluídica

y no de manera combinada con el proceso de microemulsión. En ambos casos, la proteína sirvió como centro de nucleación.

Una vez establecida la estructura y las características fisicoquímicas de las nanopartículas, es importante considerar parámetros toxicológicos derivados de la interacción entre el material propuesto y su comportamiento y posible uso tanto en cultivos celulares como en modelos animales. Dichas variables suelen restringir el desarrollo de nanomateriales, dado el riesgo de su uso. Sin embargo, el quitosán es un material biocompatible con pocos efectos citotóxicos reportados. Dentro de las líneas celulares que se usaron para probar su efecto con respecto a la proliferación celular encontramos a las células HaCaT que provienen de una línea de queratinocitos inmortalizados. Esta línea celular no es tumorigénica y se utiliza como modelo de estudio para distintos tipos de epitelio. Aunque se ha reportado que el quitosán puede tener efectos citotóxicos dependientes de su peso molecular cuando se emplea en cultivos de células HaCaT, éstos se presentaron utilizando únicamente la cadena polimérica (Wiegand et al., 2010; Zubareva et al., 2017). Debido a sus características electroquímicas, el quitosán puede interactuar de maneras poco favorables con las membranas celulares; sin embargo, al realizar la síntesis de nanopartículas de quitosán, dichos efectos disminuyen por la estabilización de sus terminales aminos positivos con los iones cargados negativamente del entrecruzante TPP.

Si bien la diferencia significativa entre la proliferación de células HaCaT tratadas con nanopartículas (250-500 μg , 48-72h; **Figura 15**) puede interpretarse como un efecto citotóxico relacionado con lo que reporta Wiegand et al., 2010, también puede deberse a un proceso de diferenciación de las células HaCaT. Se ha reportado que las células HaCaT disminuyen su proliferación cuando se encuentran en un proceso activo de diferenciación, el cual puede estar relacionado con la producción de mediadores inflamatorios que están relacionados con la remodelación del tejido epitelial y corresponde a procesos como el de curación de heridas (Colombo et al., 2017). A pesar de que ambas respuestas pueden ser inducidas por algún tipo de daño, los datos presentados por Colombo y colaboradores también implican que la respuesta de las células HaCaT de disminuir la proliferación por activación de un proceso inflamatorio, puede estar estrechamente ligada a la activación de componentes del sistema inmune innato. En este sentido, para poder discernir qué tipo de respuesta estimula las nanopartículas fabricadas, es necesario hacer ensayos específicos enfocados al monitoreo de las caspasas 3/7, 8 y 9 para evaluar si se trata de una respuesta que genere como resultado apoptosis de las células HaCaT, o bien el monitoreo de CXCL8/IL8, VEGF y MMP-9 como marcadores de remodelación de la matriz celular e inflamación. Adicionalmente, también es importante realizar ensayos que monitoreen la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) y posibles daños al ADN, como medida adicional para poder tener un acercamiento a las posibles propiedades citotóxicas de las nanopartículas (Nabeshi et al., 2011).

Una consideración relevante al momento de evaluar toxicidad de nanomateriales es el tipo celular en el que se harán los ensayos. Esto deriva de sus diferencias fundamentales, como en este caso, entre queratinocitos y macrófagos. Si bien la gran mayoría de las técnicas

usadas para monitorear variables citotóxicas pueden extrapolar su uso de cultivos como HaCaT o J774, el contexto del metabolismo de cada tipo celular es importante al momento de realizar los análisis específicos.

De manera particular, se ha reportado que distintos tipos de cultivo celular del linaje inmune como células J774 o RAW264 tienen respuestas específicas relacionadas con el tratamiento con nanopartículas en la proliferación celular, el tamaño celular y el contenido intracelular de ROS. Debido a las características semi-adherentes de las células J774, se espera que sean más sensibles ante el tratamiento con nanopartículas porque se conoce que pueden provocar un fenómeno de disminución de anclaje de las células, lo cual también afecta el proceso de división celular (Feito et al., 2021). Otro motivo por el cual puede verse afectada la proliferación de células J774 está relacionada con el procesamiento de las nanopartículas, lo cual tiene como consecuencia el aumento de tamaño de las células y su posterior diferenciación hacia un tipo celular específico.

Se sabe que los macrófagos se clasifican en subconjuntos proinflamatorios (M1), no activados (M0) o anti-inflamatorios (M2) que desempeñan roles distintos en el inicio y la resolución del proceso inflamatorio. Se ha reportado la actividad de los factores de crecimiento GM-CSF y el M-CSF, siendo GM-CSF impulsor de la diferenciación de monocitos "proinflamatorios" a macrófagos M1, mientras que M-CSF regula la diferenciación del subconjunto de monocitos "anti-inflamatorios" a macrófagos M0 que tienen propiedades fenotípicas y funcionales similares a M2. Por lo tanto, en caso de un estímulo pro-inflamatorio, los monocitos pueden polarizarse directamente en tres subconjuntos de macrófagos con fenotipo pro-inflamatorio similar a M1. Es de resaltar que los macrófagos inducidos por interferón- γ producen las reacciones pro-inflamatorias más fuertes y que cuando se exponen a varios estímulos anti-inflamatorios, los monocitos pueden diferenciarse en al menos cinco subconjuntos de macrófagos similares a M2. Tomando en cuenta lo anterior, es de vital importancia diseñar ensayos para monitorear el estado de diferenciación de las células J774 ante el tratamiento de las partículas fabricadas, los cuales pueden centrarse alrededor de la medición de los niveles de receptores CD80 y CD206, que son los marcadores principales para la diferenciación M1 y M2, respectivamente (Feito et al., 2021; Orekhov et al., 2019).

Es de recalcar que dentro del estudio del efecto de nanopartículas en sistemas vivos, no existe un estándar sobre las técnicas que deben considerarse para su análisis toxicológico, sino que depende el contexto en el que serán utilizadas. Sin embargo, se ha considerado que las vías principales a analizar durante estos estudios deberían estar centradas en la biocompatibilidad, la vía de ingreso a las células, distribución intracelular y vías de degradación. Adicionalmente, cuando se busca emplear las nanopartículas con fines de estimulación del sistema inmune, se debe tener en cuenta que es vital la medición de los perfiles de citocinas que se producen ante el tratamiento con nanopartículas (Elsabahy & Wooley, 2013; Kunzmann et al., 2011).

Tal como se mencionó previamente, la distribución celular y vías de degradación son de vital importancia al momento de trabajar con nanopartículas, por lo que los ensayos de

activación de lisosomas que se realizaron en este trabajo proporcionan información relevante con respecto Nicolete y colaboradores reportaron en 2011 que células J774 que fueron tratadas con nanopartículas de PLGA tenían una respuesta inflamatoria distinta a células control, además de que observaban colocalización de marcas fluorescentes de sus nanopartículas y lisosomas (Nicolete, Santos, & Faccioli, 2011). De manera similar, en nuestro trabajo, dicha colocalización aunada al aumento significativo de la intensidad de la marca correspondiente a los lisosomas, puede indicar que el tratamiento estimula la actividad lisosomal de manera sostenida. Este aumento en la actividad lisosomal con respecto al control es destacable también por el hecho de que, como se ha reportado por otros autores (**Figura 18** y **Figura 19**), en nuestro caso algunas vías de degradación de nanopartículas probablemente estarían siendo almacenadas y degradadas en los compartimentos lisosomales (Elsabahy & Wooley, 2013).

En lo que respecta a la activación lisosomal debemos recordar que se encuentra estrechamente ligada al proceso de fagocitosis, que se basa en una red de vesículas endocíticas para transportar distintos tipos de carga desde los fagosomas hasta los lisosomas para su degradación. Los fagosomas se forman *de novo* en la membrana plasmática y mantienen una bicapa lipídica asimétrica con proteínas y lípidos asociados. Una vez dentro de las células, la composición de estas membranas adquiere un carácter único, determinado por los tipos de receptores involucrados durante la fagocitosis. La naturaleza de los ligandos presentes en la carga internalizada dicta los tipos de receptores involucrados. Por ejemplo, una partícula opsonizada con inmunoglobulina se unirá a los receptores Fc, mientras que una partícula opsonizada con complemento se unirá a los receptores de complemento. Con el tiempo, los fagosomas adquieren nuevos componentes mediante fusiones secuenciales con endosomas, un proceso descrito como “maduración del fagosoma”. Dicho proceso consiste en la fusión con los lisosomas para la degradación terminal de la carga y la eliminación de microorganismos internalizados. Es notable que la maduración del fagosoma esté acompañada por una disminución progresiva del pH fagosomal, que disminuye desde alrededor de pH 5.5 en los fagosomas tempranos hasta alrededor de pH 4.5 en los lisosomas. Este proceso ocurre en la mayoría de los tipos celulares, incluidas las células no profesionales presentadoras de antígenos, pero no incluye a las células dendríticas inmaduras, que parecen mantener activamente un pH más alcalino. Las enzimas hidrolíticas residentes en los endosomas tardíos y los lisosomas tienen un pH óptimo más bajo, lo que asegura que sus actividades estén confinadas a una etapa específica en la vía endocítica. Sin embargo, está reportado que el resultado de la maduración del fagosoma en los macrófagos se relaciona con la eliminación de microorganismos internalizados y la degradación completa y eliminación de la carga fagocítica, mientras que la maduración de los fagosomas en las células dendríticas sirve para evitar la degradación completa de los antígenos de carga, de manera que las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) puedan presentarlos (Blander & Medzhitov, 2006).

Los reportes mencionados anteriormente permiten dilucidar el posible fenómeno observado con el tratamiento con las nanopartículas de trimetil quitosán, por el cual se presentan

diferencias significativas entre células tratadas y células control a tiempos cortos. Con base en los datos reportados por (Blander & Medzhitov, 2006b; Nicolette et al., 2011), la activación lisosomal a 3 h post-exposición a nanopartículas puede deberse al inicio del proceso de endocitosis y la activación de los distintos tipos de fagosoma, lo cual podría producir un aumento en la expresión de algunos marcadores como los receptores Fc o los receptores del complemento, que sería interesante dilucidar. Aunado a lo anterior el comportamiento observado a 26 h post-exposición puede ser resultado de la observación de fagosomas “maduros”, en donde se lleva a cabo la degradación activa tanto de las nanopartículas como de la proteína fluorescente.

También es importante mencionar que dependiendo del comportamiento que pudieran presentar los lisosomas con respecto a si se usan receptores de complemento o Fc, se podría contar con datos más precisos sobre el proceso de presentación del antígeno a evaluar. El comportamiento que se esperaría para que fuera un nanoacarreador y adyuvante de utilidad futura en formulaciones como vacunas, es que debería estimular al mínimo el sistema de complemento, así como tener una respuesta inflamatoria controlada y un aumento en la producción de moléculas correspondientes al MHC II.

Es sabido que la vía endocítica es determinada por las propiedades superficiales de las nanopartículas, las cuales pueden a su vez estar dadas por propiedades fisicoquímicas, modificaciones, o por agregados de proteínas en su superficie, que generen una mayor interacción con las células. De manera específica para procesos como el mencionado anteriormente, la fagocitosis se realiza principalmente en células del sistema inmune con capacidad de ser fagocitos profesionales, como los macrófagos o las células dendríticas. Las cuatro rutas principales de endocitosis en ellas son: la mediada por el receptor de manosa, la que se realiza mediada por el receptor de complemento, la endocitosis mediada por el receptor Fc y por último la endocitosis mediada por el receptor *scavenger*. Además, se encuentran las vías independientes a receptores como la endocitosis mediada por clatrin, caveolinas, macropinocitosis o incluso mediante la intervención de señales de receptores tipo TLR. Cada una de estas vías puede ser utilizada de manera específica, si se desea usar como blanco para estimular una versión específica de la respuesta inmune y así potencializar el efecto inmunoestimulador de las nanopartículas (Kettiger et al., 2013b).

Con base en lo anterior, y retomando lo reportado por Elsabahy & Wooley, 2013, el conocimiento de las vías de endocitosis, así como de la maduración de los fagosomas involucrados en la degradación de nanopartículas con una composición específica, permitiría tener un control relativo del perfil de citocinas generado, lo que podría tener un impacto muy importante en su utilización y eficacia. De esta forma, temas como las vías de entrada de los potenciales nanoacarreadores a la célula (**Figura 23**), daría la posibilidad de manipularlos de manera más precisa. Además, de las estrategias de monitoreo de las vías de endocitosis utilizadas, también es conveniente considerar el monitoreo del porcentaje de escape endosomal, puesto que puede ser una variable importante para medir la toxicidad de nanomateriales.

Una de las estrategias más utilizadas para ello es la citometría de flujo, dado que ofrece un enfoque rápido y en tiempo real del procesamiento de las nanopartículas dentro del ambiente celular (Kettiger et al., 2013b).

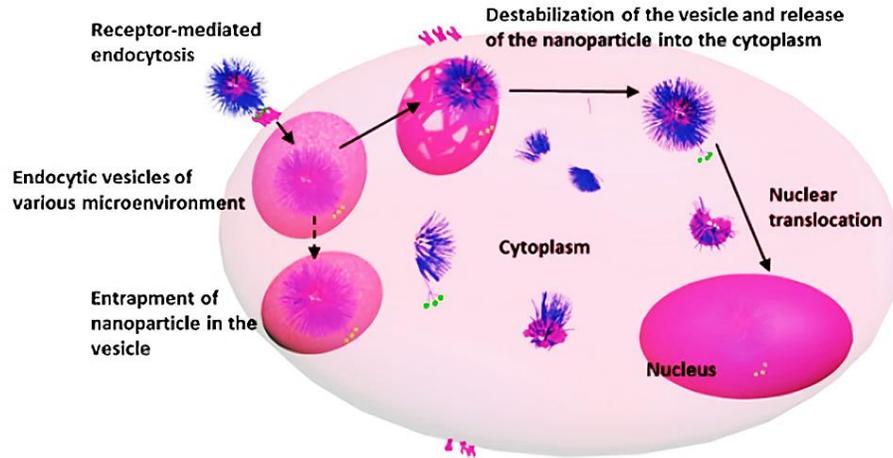


Figura 23. Proceso de maduración de lisosomas a partir de la endocitosis. Reportado por Elsabahy & Wooley, 2013.

Una vez analizadas las variables anteriores, se puede considerar el paso hacia los ensayos en modelos animales, considerando el comportamiento del nanomaterial de interés y los sitios en donde se podría buscar una respuesta específica. De esta forma sería posible encaminarse a analizar las vías de administración más convenientes, su localización en cada uno de los órganos, producción de histaminas (entre otros métodos para evaluar su toxicidad), así como la evaluación de la estimulación de la respuesta inmune deseada, como se presenta en la cronología de la **Figura 24**:

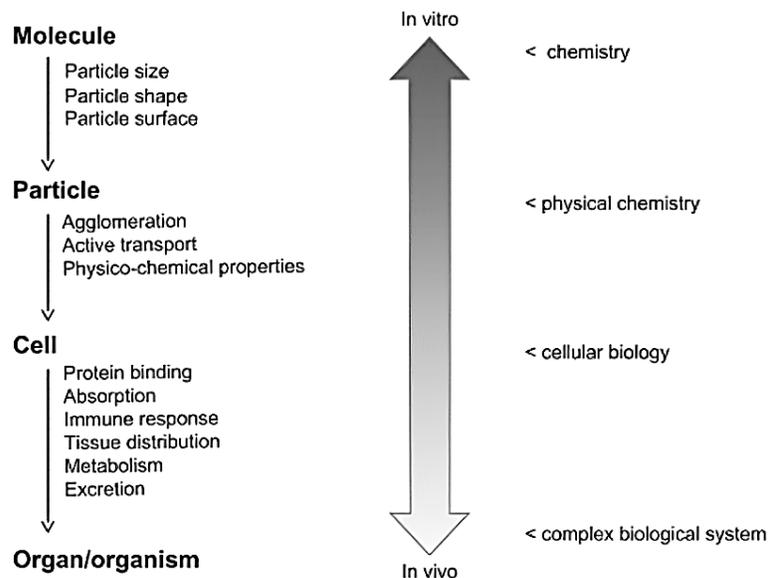


Figura 24. Cronología idónea para seguir durante la evaluación de nanomateriales en sistemas biológicos (Kettiger, et. al, 2013).

CONCLUSIONES

El diámetro promedio de las nanopartículas de N-trimetil quitosán fabricadas por el método de microfluídica bajo las variables establecidas, dependieron de la concentración de proteína utilizada como carga que sirve como centro de nucleación durante el proceso de encapsulamiento de la proteína. A mayor concentración, mayor diámetro promedio y mayor dispersión. Es de esperarse que, si el tamaño de la proteína cambia, para concentraciones iguales, influirá en el diámetro promedio. Considerando la morfología esférica de los nanoacarreadores fabricados, su diámetro promedio, así como el tamaño de la proteína, se podría establecer una aproximación que relacione el diámetro promedio con la dosis deseada del agente a acarrear. Los análisis composicional, térmico y superficial realizados por FTIR, TGA y XPS, indicaron que las nanopartículas presentaron entrecruzamiento entre los terminales reactivos del trimetil quitosán y el TPP, incrementando su estabilidad térmica cuando se presenta una proteína a cargo. Así mismo, que la proteína se encuentra encapsulada por una cubierta esférica de trimetil quitosán, cuyo espesor es superior a 10 nm. Estas características son fundamentales para considerar sus futuros usos y seguimiento de la proteína acarreada, e incluso de los comportamientos de los nanoacarreadores en distintos tipos celulares o en modelos *in vivo*.

El tratamiento con nanopartículas de TMQ tiene efectos distintos sobre la proliferación, dependiendo del tipo celular empleado, afectando de manera rápida y permanente los cultivos de células fagocíticas (J774), mientras que los efectos en células epiteliales (HaCaT) son menores y temporales. Dicha diferencia puede deberse a las radicales diferencias metabólicas entre queratinocitos y células fagocíticas.

La incorporación de las nanopartículas de TMQ en las células fagocíticas sucede mediante endocitosis, ya que el tratamiento de las células J774 con azida de sodio provocó una disminución importante en la presencia intracelular de las nanopartículas de TMQ-BSA/FITC. Sin embargo, la ausencia de nanopartículas observables en la membrana celular después del tratamiento sugiere que la azida de sodio pudiera también inhibir la interacción membrana-nanopartículas, lo que requiere mayor investigación.

La activación lisosomal en las células J774 tratadas con nanopartículas de TMQ-BSA/FITC, indica que, tras su endocitosis, estas partículas siguen la ruta hacia su degradación. Este comportamiento es de esperarse ya que la degradación lisosomal de las nanopartículas es un paso previo a la presentación de antígeno, lo cual queda pendiente de comprobar.

PERSPECTIVAS

- Monitorear variables de apoptosis como Caspasas 3/7, 9 y de remodelación celular, como CXCL8/IL8, VEGF y MMP9.
- Monitorear marcadores de diferenciación de macrófagos como CD80 (M1) o CD206 (M2).
- Monitorear marcadores de activación de receptores Fc, y receptores de complemento.
- Realizar pruebas con distintos inhibidores de endocitosis como Clorpromazina (vía de clatrin), Genisteína (vía de caveolinas), Amilorida (macropinocitosis), cloroquina o Bafilomicina A (acidificación de endosomas).

Bibliografía

- Adamiano, A., Lesci, I. G., Fabbri, D., & Roveri, N. (2015). Adsorption of bovine serum albumin onto synthetic Fe-doped geomimetic chrysotile. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(107). <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0186>
- Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). *MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES*. 593–623.
- Ahmad, F., Zhou, Y., Ling, Z., Xiang, Q., & Zhou, X. (2016). Systematic elucidation of interactive unfolding and corona formation of bovine serum albumin with cobalt ferrite nanoparticles. *RSC Advances*, 6(42), 35719–35730. <https://doi.org/10.1039/c6ra02850k>
- Amidi, M., Romeijn, S. G., Borchard, G., Junginger, H. E., Hennink, W. E., & Jiskoot, W. (2006). Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release*, 111(1–2), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.11.014>
- Amreddy, N., & Babu, A. (2017). *Polymeric Nanoparticle-Mediated Gene Delivery for Lung Cancer Treatment*. 233–255. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-77866-2>
- Aranda-Barradas, M. E., Trejo-López, S. E., Real, A. Del, Álvarez-Almazán, S., Méndez-Albores, A., García-Tovar, C. G., González-Díaz, F. R., & Miranda-Castro, S. P. (2022). Effect of molecular weight of chitosan on the physicochemical, morphological, and biological properties of polyplex nanoparticles intended for gene delivery. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100228>
- Banerjee, T., Mitra, S., Kumar Singh, A., Kumar Sharma, R., & Maitra, A. (2002). Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 243(1–2), 93–105. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00267-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00267-3)
- Baer, D. R., Wang, Y.-C., & Castner, D. G. (2016). Use of XPS to Quantify Thickness of Coatings on Nanoparticles. *Microscopy Today*, 24(2), 40–45. <https://doi.org/10.1017/s1551929516000109>
- Barratt, G. M. (2000). *Therapeutic applications of colloidal drug carriers*. 3(5).
- Belsey, N. A., Shard, A. G., & Minelli, C. (2015). Analysis of protein coatings on gold nanoparticles by XPS and liquid-based particle sizing techniques. *Biointerphases*, 10(1). <https://doi.org/10.1116/1.4913566>
- Blander, J. M., & Medzhitov, R. (2006a). *On regulation of phagosome maturation and antigen presentation*. 7(10), 1029–1035.
- Blander, J. M., & Medzhitov, R. (2006b). *On regulation of phagosome maturation and antigen presentation*. 7(10), 1029–1035.
- Bowman, K. (2017). Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery Properties of chitosan. *International Journal of Nanomedicine*, 1(2), 117–128. <https://doi.org/DOI.10.2147/nano.2006.1.2.117>
- Canfarotta, F., Waters, A., Sadler, R., McGill, P., Guerreiro, A., Papkovsky, D., Haupt, K., & Piletsky, S. (2016). Biocompatibility and internalization of molecularly imprinted

- nanoparticles. *Nano Research*, 9(11), 3463–3477. <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1222-7>
- Cohen, J. A., Beaudette, T. T., Tseng, W. W., Bachelder, E. M., Mende, I., Engleman, E. G., & Fréchet, J. M. J. (2009). T-cell activation by antigen-loaded pH-sensitive hydrogel particles in vivo: The effect of particle size. *Bioconjugate Chemistry*, 20(1), 111–119. <https://doi.org/10.1021/bc800338n>
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P. A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D., & Dell'Agli, M. (2017). HaCaT Cells as a Reliable in Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7435621>
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). *Regulated portals of entry into the cell*. 422(March), 37–44.
- Cui, Z., & Mumper, R. J. (2002). *Coating of cationized protein on engineered nanoparticles results in enhanced immune responses*. 238, 229–239.
- Cuña, M., & Pivel, J. P. (2006). *Development of Phosphorylated Glucomannan-Coated Chitosan Nanoparticles as Nanocarriers for Protein Delivery*. 6(9), 2887–2895. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.435>
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4)
- Corazzari, I., Nisticò, R., Turci, F., Faga, M. G., Franzoso, F., Tabasso, S., & Magnacca, G. (2015). Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*, 112, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.006>
- de Britto, D., de Moura, M. R., Aouada, F. A., Mattoso, L. H. C., & Assis, O. B. G. (2012). N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.09.002>
- Ding, Y., Xia, X. H., & Zhang, C. (2006). Synthesis of metallic nanoparticles protected with N,N,N-trimethyl chitosan chloride via a relatively weak affinity. *Nanotechnology*, 17(16), 4156–4162. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/16/027>
- Dhawan, A., & Sharma, V. (2010). *Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges*. 589–605. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3996-x>
- Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal, P., Hall, J. B., & Mcneil, S. E. (2008). *Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution*. 5(4), 487–495. <https://doi.org/10.1021/mp800032f>
- Dobrovolskaia, M. A., & Neil, S. E. M. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 2, 469–478.

- Elsabahy, M., & Wooley, K. L. (2013). Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chemical Society Reviews*, 42(12), 5552–5576. <https://doi.org/10.1039/c3cs60064e>
- Elsaesser, A., & Howard, C. V. (2012). Toxicology of nanoparticles ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.001>
- Facchi, S. P., Scariot, D. B., Bueno, P. V. A., Souza, P. R., Figueiredo, L. C., Follmann, H. D. M., ... Martins, A. F. (2016). Preparation and cytotoxicity of N-modified chitosan nanoparticles applied in curcumin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.063>
- Feito, M. J., Casarrubios, L., Oñaderra, M., Gómez-Duro, M., Arribas, P., Polo-Montalvo, A., Vallet-Regí, M., Arcos, D., & Portolés, M. T. (2021). Response of RAW 264.7 and J774A.1 macrophages to particles and nanoparticles of a mesoporous bioactive glass: A comparative study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112110>
- Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., & Sundblad, A. (2005). Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *International Journal of Pharmaceutics*, 298(2), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.035>
- Friedman, A. J., Phan, J., Schairer, D. O., Champer, J., Qin, M., Pirouz, A., Blecher-paz, K., Oren, A., Liu, P. T., Modlin, R. L., & Kim, J. (2012). Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activity of Chitosan – Alginate Nanoparticles: A Targeted Therapy for Cutaneous Pathogens. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(5), 1231–1239. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.399>
- Foster, R. N., Harrison, E. T., & Castner, D. G. (2016). ToF-SIMS and XPS Characterization of Protein Films Adsorbed onto Bare and Sodium Styrenesulfonate-Grafted Gold Substrates. *Langmuir*, 32(13), 3207–3216. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04743>
- Geçer, A., Yıldız, N., Çalimli, A., & Turan, B. (2010). Trimethyl chitosan nanoparticles enhances dissolution of the poorly water soluble drug Candesartan-Cilexetil. *Macromolecular Research*, 18(10), 986–991. <https://doi.org/10.1007/s13233-010-1004-0>
- Grenha, A., Seijo, B., Serra, C., & Remuñán-López, C. (2007). Chitosan nanoparticle-loaded mannitol microspheres: Structure and surface characterization. *Biomacromolecules*, 8(7), 2072–2079. <https://doi.org/10.1021/bm061131g>
- Gupta, R. K., & Siber, G. R. (1995). Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 13(14), 1263–1276. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)00011-0](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)00011-0)
- Hickey, J. W., Santos, J. L., Williford, J., & Mao, H. (2015). Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.006>
- Huang, M., Khor, E., & Lim, L. Y. (2004). Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 344–353. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016249.52831.a5>

- Izaguirre-Hernández, I. Y., Mellado-Sánchez, G., Mondragón-Vásquez, K., Thomas-Dupont, P., Sánchez-Vargas, L. A., Hernández-Flores, K. G., Mendoza-Barrera, C., Altuzar, V., Cedillo-Barrón, L., & Vivanco-Cid, H. (2017). Non-Conjugated Chitosan-Based Nanoparticles to Proteic Antigens Elicit Similar Humoral Immune Responses to Those Obtained with Alum. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(1), 846–852. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.13067>
- Jiang, L., Li, X., Liu, L., & Zhang, Q. (2013). Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified pullulan nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 1825–1834. <https://doi.org/10.2147/IJN.S44342>
- Jin, K., Luo, Z., Zhang, B., & Pang, Z. (2017). Biomimetic nanoparticles for inflammation targeting. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.12.002>
- Jones, A., Zeller, M. A., & Sharma, S. (2013). Thermal, mechanical, and moisture absorption properties of egg white protein bioplastics with natural rubber and glycerol. *Progress in Biomaterials*, 2(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/2194-0517-2-12>
- Kettiger, H., Schipanski, A., & Wick, P. (2013a). *Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution : from cell to organism*. 3255–3269.
- Kettiger, H., Schipanski, A., & Wick, P. (2013b). *Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution : from cell to organism*. 3255–3269.
- Kim, H., Uto, T., Akagi, T., Baba, M., & Akashi, M. (2010). Amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles induce size-dependent dendritic cell maturation. *Advanced Functional Materials*, 20(22), 3925–3931. <https://doi.org/10.1002/adfm.201000021>
- Kim, T. H., Jin, H., Kim, H. W., Cho, M., & Cho, C. S. (2006). Mannosylated chitosan nanoparticle – based cytokine gene therapy suppressed cancer growth in BALB / c mice bearing CT-26 carcinoma cells. 5(July), 1723–1733. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0540>
- Kreuter, J. (1995). Nanoparticles as Adjuvants for Vaccination. En *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (pp. 463–472). https://doi.org/10.1142/9789814520652_0030
- Kumar, B. P., Chandiran, I. S., Bhavya, B., & Sindhuri, M. (2011). Microparticulate drug delivery system: a review. *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research*, 1(1), 19–37.
- Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A., & Fadeel, B. (2011a). Biochimica et Biophysica Acta Toxicology of engineered nanomaterials : Focus on biocompatibility , biodistribution and biodegradation ☆. *BBA - General Subjects*, 1810(3), 361–373. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.04.007>
- Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A., & Fadeel, B. (2011b). Biochimica et Biophysica Acta Toxicology of engineered nanomaterials : Focus on biocompatibility , biodistribution and biodegradation ☆. *BBA - General Subjects*, 1810(3), 361–373. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.04.007>
- Kumar, B. P., Chandiran, I. S., Bhavya, B., & Sindhuri, M. (2011). Microparticulate drug delivery system: a review. *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research*, 1(1),

19–37.

- Lee, M. Y., Yang, J. A., Jung, H. S., Beack, S., Choi, J. E., Hur, W., Koo, H., Kim, K., Yoon, S. K., & Hahn, S. K. (2012). Hyaluronic acid-gold nanoparticle/interferon α complex for targeted treatment of hepatitis C virus infection. *ACS Nano*, *6*(11), 9522–9531. <https://doi.org/10.1021/nn302538y>
- Liu, Y., Shen, X., Zhou, H., Wang, Y., & Deng, L. (2016). Chemical modification of chitosan film via surface grafting of citric acid molecular to promote the biomineralization. *Applied Surface Science*, *370*, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.02.124>
- Majedi, F. S., Hasani-Sadrabadi, M. M., Hojjati Emami, S., Shokrgozar, M. A., Vandersarl, J. J., Dashtimoghadam, E., ... Renaud, P. (2013). Microfluidic assisted self-assembly of chitosan based nanoparticles as drug delivery agents. *Lab on a Chip*, *13*(2), 204–207. <https://doi.org/10.1039/c2lc41045a>
- Meng, H., Xia, T., George, S., & Nel, A. E. (2009). A Predictive Toxicological Paradigm for the Safety Assessment of Nanomaterials. *ACS NANO*, *3*(7), 1620–1627. <https://doi.org/10.1021/nn9005973>
- Metz, S. W., Tian, S., Hoekstra, G., Yi, X., Stone, M., Horvath, K., Miley, M. J., DeSimone, J., Luft, C. J., & de Silva, A. M. (2016). Precisely Molded Nanoparticle Displaying DENV-E Proteins Induces Robust Serotype-Specific Neutralizing Antibody Responses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005071>
- Morel, S., Didierlaurent, A., Bourguignon, P., Delhaye, S., Baras, B., Jacob, V., Planty, C., Elouahabi, A., Harvengt, P., Carlsen, H., Kielland, A., Chomez, P., Garçon, N., & Van Mechelen, M. (2011). Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine*, *29*(13), 2461–2473. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.011>
- Munir, A., Haq, T. U., Qurashi, A., Rehman, H. U., Ul-Hamid, A., & Hussain, I. (2019). Ultrasmall Ni/NiO nanoclusters on thiol-functionalized and-exfoliated graphene oxide nanosheets for durable oxygen evolution reaction. *ACS Applied Energy Materials*, *2*(1), 363–371. <https://doi.org/10.1021/acsaem.8b01375>
- Naahidi, S., Jafari, M., Edalat, F., Raymond, K., Khademhosseini, A., & Chen, P. (2013). Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, *166*(2), 182–194. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.12.013>
- Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Nagano, K., Abe, Y., Yoshioka, Y., Kamada, H., Itoh, N., Tsunoda, S. ichi, & Tsutsumi, Y. (2011). Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Particle and Fibre Toxicology*, *8*. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-1>
- Nagayama, S., Ogawara, K., Minato, K., Fukuoka, Y., Takakura, Y., Hashida, M., Higaki, K., & Kimura, T. (2007). Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *329*, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.025>
- Nicolete, R., Santos, D. F. D., & Faccioli, L. H. (2011). The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response.

- International Immunopharmacology*, 11(10), 1557–1563.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.014>
- O'Hagan, D. T., Ott, G. S., & Van Nest, G. (1997). Recent advances in vaccine adjuvants: The development of MF59 emulsion and polymeric microparticles. *Molecular Medicine Today*, 3(2), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(96\)10058-7](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(96)10058-7)
- Orekhov, A. N., Orekhova, V. A., Nikiforov, N. G., Myasoedova, V. A., & Andrey, V. (2019). *Monocyte differentiation and macrophage polarization*. 4. <https://doi.org/10.20517/2574-1209.2019.04>
- Owens, D. E., & Peppas, N. A. (2006). *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*. 307, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>
- Pardeshi, C. V., & Belgamwar, V. S. (2016). Controlled synthesis of N,N,N-trimethyl chitosan for modulated bioadhesion and nasal membrane permeability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 933–944. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.012>
- Rajitha, P., Gopinath, D., Biswas, R., Sabitha, M., & Jayakumar, R. (2016). *Chitosan nanoparticles in drug therapy of infectious and inflammatory diseases*. 5247(April). <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1178232>
- Reed, S. G., Orr, M. T., & Fox, C. B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, 19(12), 1597–1608. <https://doi.org/10.1038/nm.3409>
- Rizvi, S. A. A., & Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>
- Sadeghi, A., PourEskandar, S., Askari, E., & Akbari, M. (2023). Polymeric Nanoparticles and Nanogels: How Do They Interact with Proteins? *Gels*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/gels9080632>
- Sakrani, S., Qiao Jie, L., & Wahab, Y. (2014). The formation of nanoscale clusters – nanofilms / quantum dots predicted using a capillary model of nucleation. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 1(1). <https://doi.org/10.11113/mjfas.v1n1.12>
- Sawaengsak, C., Mori, Y., Yamanishi, K., Mitrevej, A., & Sinchaipanid, N. (2014). Chitosan nanoparticle encapsulated hemagglutinin-split influenza virus mucosal vaccine. *AAPS PharmSciTech*, 15(2), 317–325. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0058-7>
- Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Mercer, R., Murray, A. R., Johnson, V. J., Potapovich, A. I., Tyurina, Y. Y., Gorelik, O., Arepalli, S., Hubbs, A. F., Antonini, J., Evans, D. E., Ku, B., Maynard, A., Kagan, V. E., Castranova, V., Baron, P., Shvedova, A. A., Kisin, E. R., ... Baron, P. (2012). *Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice*. *Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice*. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00084.2005>
- Siow, K. S., Britcher, L., Kumar, S., & Griesser, H. J. (2018). XPS study of sulfur and phosphorus compounds with different oxidation states. *Sains Malaysiana*, 47(8), 1913–1922. <https://doi.org/10.17576/jsm-2018-4708-33>

- Sripriyalakshmi, S., Anjali, C. H., George Priya Doss, C., Rajith, B., & Ravindran, A. (2014). BSA nanoparticle loaded atorvastatin calcium - A new facet for an old drug. *PLoS ONE*, 9(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086317>
- Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1819–1846. <https://doi.org/10.3390/md13041819>
- Tafaghodi, M., Saluja, V., Kersten, G. F. A., Kraan, H., Slütter, B., Amorij, J., & Jiskoot, W. (2012). Hepatitis B surface antigen nanoparticles coated with chitosan and trimethyl chitosan : Impact of formulation on physicochemical and immunological characteristics. *Vaccine*, 30(36), 5341–5348. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.035>
- Tenorio-Barajas, A. Y., Olvera, M. de la L., Romero-Paredes, G., Altuzar, V., Garrido-Guerrero, E., & Mendoza-Barrera, C. (2023). Chitosan, Chitosan/IgG-Loaded, and N-Trimethyl Chitosan Chloride Nanoparticles as Potential Adjuvant and Carrier-Delivery Systems. *Molecules*, 28(10). <https://doi.org/10.3390/molecules28104107>
- Topală, T., Bodoki, A., Oprean, L., & Oprean, R. (2014). Bovine serum albumin interactions with metal complexes. *Clujul Medical*, 87(4), 5. <https://doi.org/10.15386/cjmed-357>
- Torchilin, V. (2006). Introduction. Nanocarriers for Drug Delivery: Needs and Requirements. En *NANOPARTICULATES AS DRUG CARRIERS* (pp. 1–8).
- Vincent Crist. (s/f). The XPS Library. Recuperado de <https://xpslibrary.com/>
- Verma, A., & Stellacci, F. (2010a). *Effect of Surface Properties on Nanoparticle – Cell Interactions*. 1, 12–21. <https://doi.org/10.1002/sml.200901158>
- Verma, A., & Stellacci, F. (2010b). *Effect of Surface Properties on Nanoparticle – Cell Interactions*. 1, 12–21. <https://doi.org/10.1002/sml.200901158>
- Villar-Chavero, M. M., Domínguez, J. C., Alonso, M. V., Oliet, M., & Rodriguez, F. (2018). Thermal and kinetics of the degradation of chitosan with different deacetylation degrees under oxidizing atmosphere. *Thermochimica Acta*, 670, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2018.10.004>
- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Ā, J. B., & Inserm, U. (2006). *Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems*. 27, 4356–4373. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>
- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Simard, P., Leroux, J. C., & Benoit, J. P. (2006). *Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake*. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>
- Wendorf, J. R., Singh, M., & O'Hagan, D. T. (2006). Nanoparticles and Microparticles as Vaccine Adjuvants. En *NANOPARTICULATES AS DRUG CARRIERS* (pp. 675–696). https://doi.org/10.1007/978-3-662-46875-3_100746
- Wiegand, C., Winter, D., & Hipler, U. C. (2010). Molecular-weight-dependent toxic effects of chitosans on the human keratinocyte cell line HaCaT. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(3), 164–170. <https://doi.org/10.1159/000276996>
- Wischke, C., Borchert, H. H., Zimmermann, J., Siebenbrodt, I., & Lorenzen, D. R. (2006). Stable cationic microparticles for enhanced model antigen delivery to dendritic cells.

Journal of Controlled Release, 114(3), 359–368.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.06.020>

- Wu, M., Long, Z., Xiao, H., & Dong, C. (2017). Preparation of N, N, N-trimethyl chitosan via a novel approach using dimethyl carbonate. *Carbohydrate Polymers*, 169, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.043>
- Xiang, S. D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P. L., & Plebanski, M. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods*, 40(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.016>
- Xu, J., Liu, C., Xu, Y., Shan, W., Liu, M., & Huang, Y. (2015). [Mechanism of cellular uptake and transport mediated by integrin receptor targeting trimethyl chitosan nanoparticles]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*, 50(7), 893–898. Recuperado de <http://europepmc.org/abstract/MED/26552153>
- Yadav, P., & Yadav, A. B. (2021). Preparation and characterization of BSA as a model protein loaded chitosan nanoparticles for the development of protein-/peptide-based drug delivery system. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00345-w>
- Yoo, J., Doshi, N., & Mitragotri, S. (2011). Adaptive micro and nanoparticles : Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(14–15), 1247–1256. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.05.004>
- Yun, H., Min, S., Chung, H., Lee, S., Kwon, S., Jeon, H., Kim, Y., Hyung, J., Kim, J., Her, S., Oh, Y., Chan, I., Kim, K., & Young, S. (2009). Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 135(3), 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.018>
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.-X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. J. (2013a). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32(3), 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>
- Zajac, A., Hanuza, J., Wandas, M., & Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.071>
- Zubareva, A., Shagdarova, B., Varlamov, V., Kashirina, E., & Svirshchevskaya, E. (2017). Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives. *European Polymer Journal*, 93, 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.021>

ANEXOS

ANEXO 1. Gráficos de distribución de tamaño de otros lotes de nanopartículas.

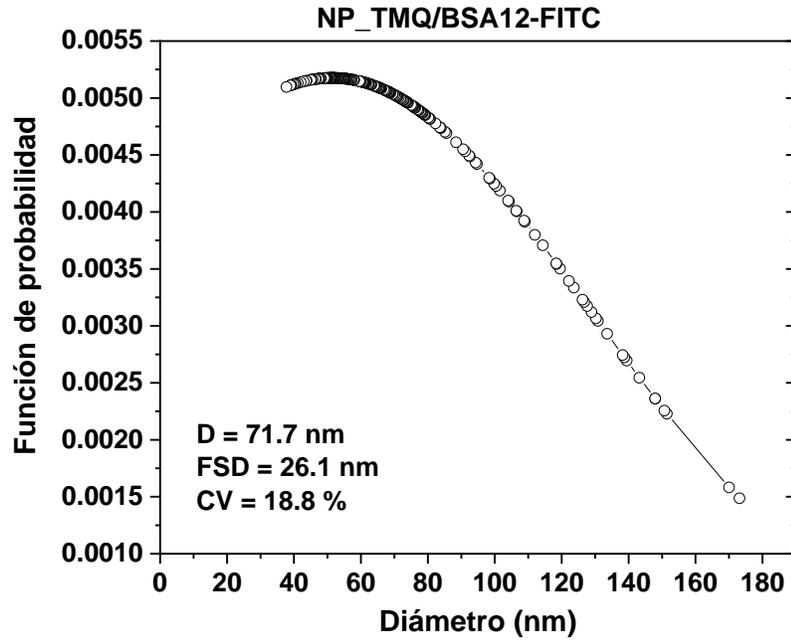


Figura 25. Distribución de tamaño de nanopartículas cargadas con 12 μg de BSA-FITC observadas mediante TEM.

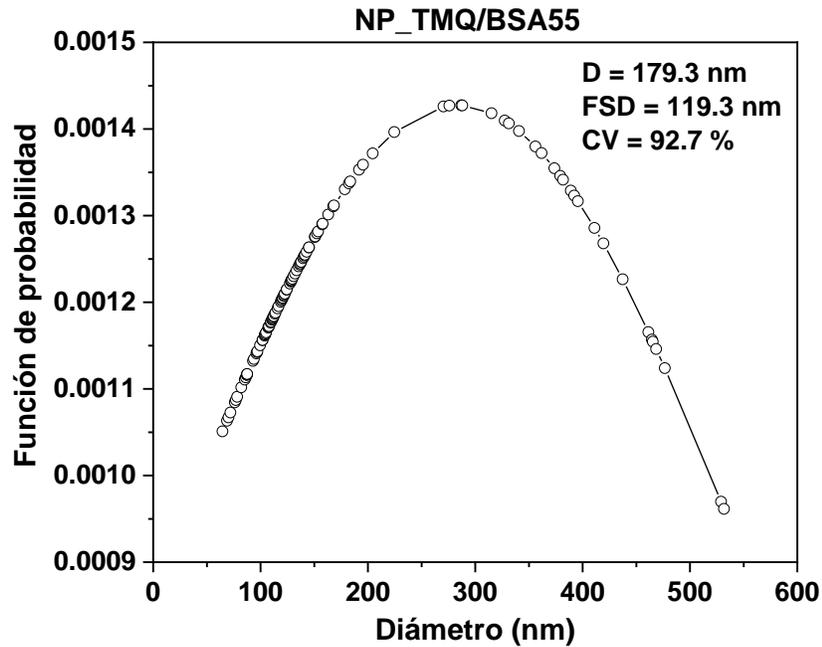


Figura 26. Distribución de tamaño de nanopartículas cargadas con 55 μg de BSA observadas mediante TEM.

ANEXO 2. Gráficos adicionales de análisis termogravimétrico.

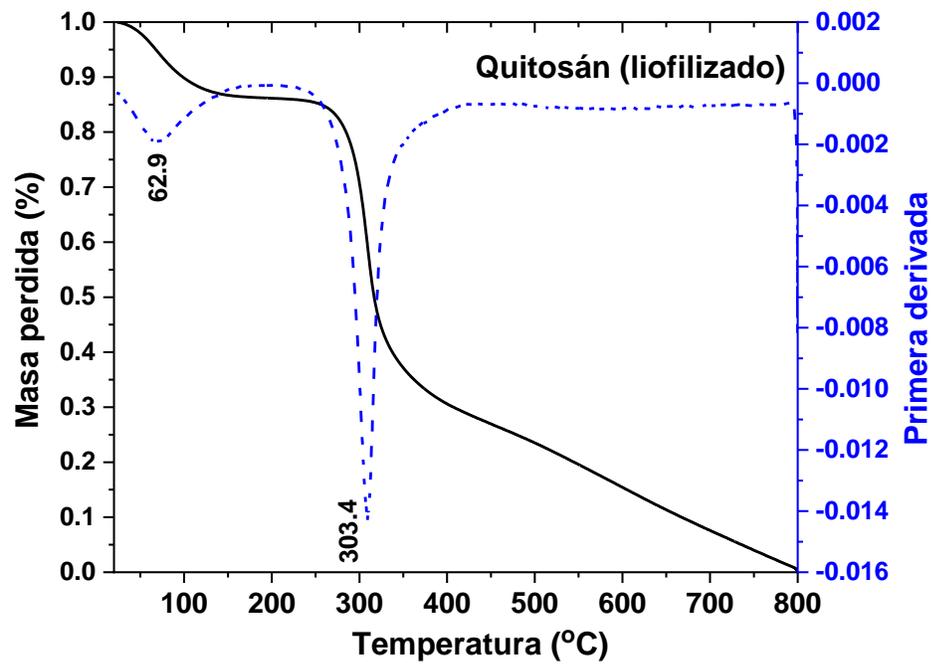


Figura 27. Gráfico de TGA con patrón de degradación de quitosán en polvo (líoilizado).

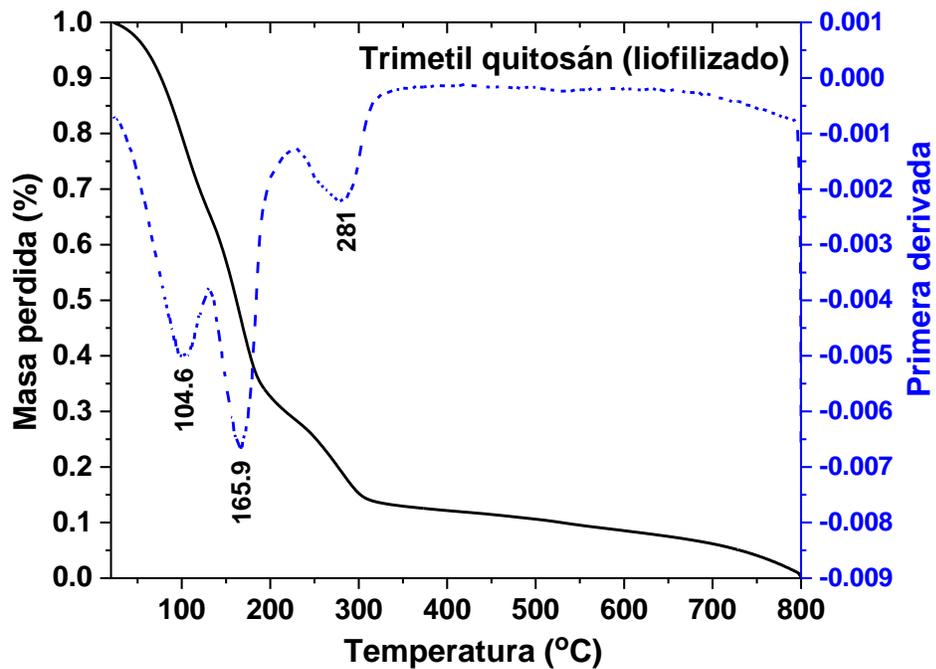


Figura 28. Gráfico de TGA con patrón de degradación de TMQ en polvo (líoilizado).

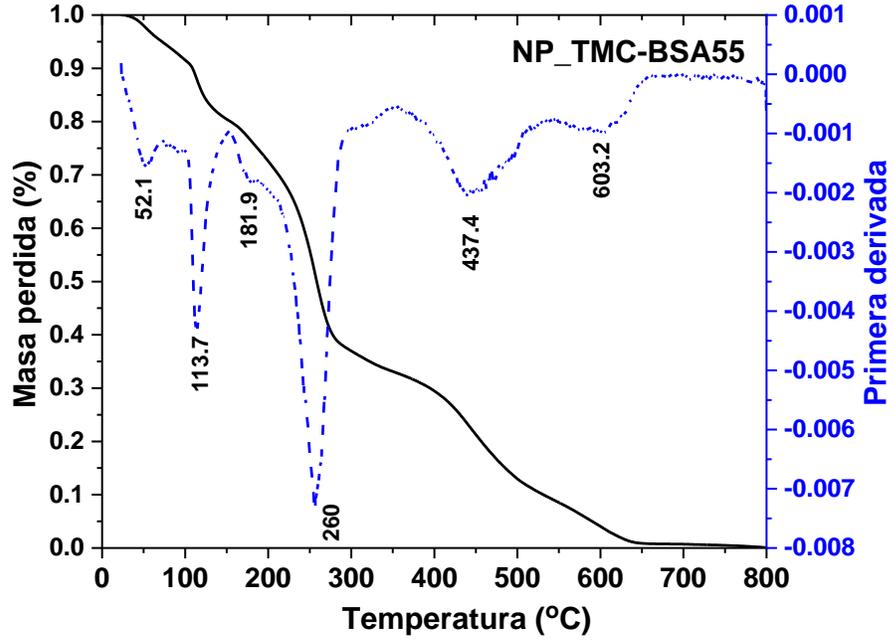


Figura 29. Gráfico de TGA correspondiente al patrón de degradación de nanopartículas cargadas con 55 μg de BSA.