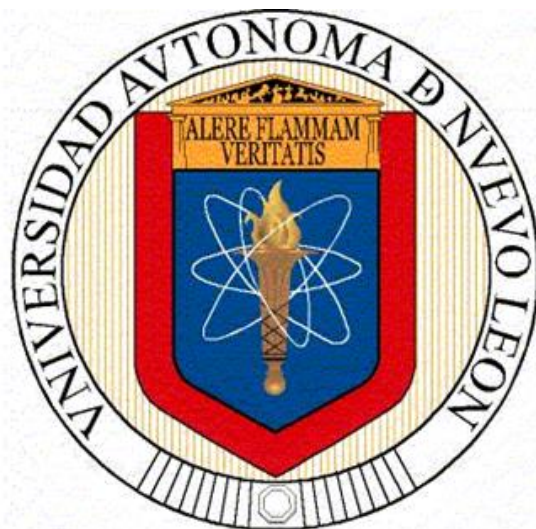


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN MONOCITOS
DIFERENCIADOS TRATADOS CON NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANO COMERCIAL Y PURIFICADO**

POR

TEODORO IVÁN RIVERA GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

MARZO, 2020

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN MONOCITOS DIFERENCIADOS
TRATADOS CON NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO COMERCIAL Y PURIFICADO**

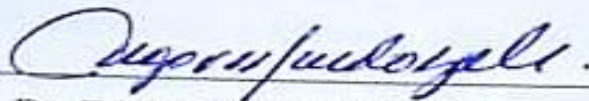
Comité de tesis



Dra. Diana Ginette Zarate Triviño
DIRECTOR DE TESIS



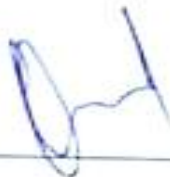
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
SECRETARIO



Dr. Edgar Mendoza Gamboa
VOCAL



Dr. Gabriel Luna Bárcenas
VOCAL



Dr. Moisés Ármides Franco Molina
VOCAL

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN MONOCITOS DIFERENCIADOS
TRATADOS CON NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO COMERCIAL Y PURIFICADO**



Dra. Diana Ginette Zarate Triviño
DIRECTOR DE TESIS

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico e infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Diana Zarate quien deposito toda su confianza en mí y me ayudo a seguir creciendo como todo un profesionalista en el área de la ciencia, quien con sus consejos me fue guiando a través de estos dos años de la maestría y con quien forje una gran amistad y ahora forma parte de mi familia, por ayudarme a descubrir mi potencial como investigador, por permitirme expandir mis conocimientos en diversas áreas científicas, pero sobre todo ser un pilar para mí en el ámbito académico y laboral.

Al Dr. Moisés por ayudarme a ver los errores que uno puede cometer en los trabajos sin llegar a darse cuenta, ya que todo eso me ayudo a ser más precavido en mi trabajo y por esos consejos que ayudaron a que mi confianza en mí mismo mejorara.

A la Dra. Cristina por darme la oportunidad de realizar el posgrado en el laboratorio de inmunología y virología, dado que esto me ayudo a conseguir un logro más en mi vida, gracias por tener confianza en mi persona y en mis habilidades.

La Unidad de Nanobiotecnología por siempre estar a mi lado en todo momento y por sus consejos académicos, los cuales me ayudaron a forjarme como el profesional que soy el día de hoy, gracias, compañeros.

A mis amigos Melissa, Marbella, Karla, Alondra, Alan, Bena, Kenny y Alonso por haberme brindado su apoyo y amistad a lo largo de estos dos años en los que estuvimos en la maestría, por los buenos momentos que pasamos entre clases y durante nuestras cesiones de estudios que llevábamos a cabo antes de presentar exámenes, así como las idas al billar a festejar cada fin de semestre y en general por haberme permitido ser su amigo y poder entablar una buena relación con cada uno de ustedes.

A Dios por siempre brindarme las fuerzas necesarias para seguir adelante, aun cuando me sentía exhausto y sin ánimos de seguir en este camino, por nunca desampararme y brindarme las fuerzas para confrontar mis miedos.

DEDICATORIA

A *mis Padres* por siempre ser el pilar de mi motivación para seguir adelante en mis estudios y por estar apoyándome con los consejos de vida cuando los necesitaba y darme las fortalezas para seguir adelante y tener el valor necesario para afrontar los problemas que se me presentaron.

A la *Dra. Diana Zarate* por siempre ser mi guía en el ámbito académico y por siempre depositar su confianza en mí y permitirme el seguir progresando en mis estudios, así como inculcarme la disciplina laboral y las fuerzas para siempre completar mis metas académicas y nunca permitir que desarrollara ego, sino a ser humilde en todo momento.

Sarita por estar en todo momento a mi lado, aconsejarme cuando se presentaban problemas y por siempre apoyarme con experimentos que nunca antes había realizado, muchas gracias por todo tu apoyo.

Juan José, gracias por apoyarme en la realización de mi artículo científico, por darme consejos de cómo realizar determinadas técnicas científicas y por ser un amigo en todo momento con el cual podía platicar en todo momento.

Mayra, gracias por ser una buena amiga en todo momento y por prestarme material cuando lo necesitaba, con lo cual pude seguir avanzado en el proyecto, también gracias por ser más amenas las tardes en el laboratorio y distraerme de mis problemas con las conversaciones que entablábamos.

Maggie muchas gracias por su como una hermana, con la cual pude contar en todo momento, tanto en el laboratorio como en lo social, muchas gracias por enseñarme a que siempre hay que esforzarnos en todo momento para poder alcanzar nuestras metas, por brindarme una amistad verdadera.

Edelin por brindarme consejos personales en todo momento, por ayudarme a afrontar las situaciones difíciles que se llegaron a presentar durante la maestría, por siempre ser una amiga que me escuchaba cuando más lo necesitaba, a la vez por ayudarme a madurar como persona y por ayudarme a descubrir cualidades que no sabía que tenía, también por siempre crear un ambiente positivo en el laboratorio y ayudar a mantener el orden en él,

por ultimo por permitirme seguir siendo tu amigo después de ocho años de habernos conocidos, muchas gracias por todo eres una gran amiga.

David gracias por brindarme tu amistad en todo momento, por ser un gran apoyo moral y por permitirme ser tu asesor en tu tesis de licenciatura, ya que con esto pude ir madurando en el aspecto académico y ser una persona mucho más responsable y dedicado en los proyectos, gracias por tus consejos y por siempre estar dispuesto a ayudarme en mi tesis en cualquier momento.

Uriel por siempre ayudarme en los experimentos y por los buenos momentos que me hiciste vivir en el laboratorio y por el apoyo moral que me brindaste.

Raúl por seguir a mi lado después de muchos años de amistad, por siempre apoyarme en todo momento y ser esa persona que funciona como un pilar en el cual siempre encontraba la fortaleza para seguir luchando y que me ayudo a no dejarme vencer por las adversidades, por siempre estar dispuesto a escucharme en todo momento y por los consejos que me diste a lo largo de la maestría para poder progresar como una persona de bien y porque siempre estuviste a mi lado para compartir los logros y los éxitos que juntos logramos en este año y sobre todo en esta etapa de mi vida, gracias por ser más que un amigo para mí.

Paulina y Bruno gracias por su amistad y por brindarme fortaleza, apoyo moral y por siempre estar dispuestos a ayudarme con experimentos y darme consejos para llevar a cabo los experimentos y ser unos buenos amigos.

Silvia muchas gracias por siempre ser mi apoyo en todo momento, por tener mucha confianza en mi y por seguirme permitiendo ser como un hermano para ti, te agradezco por los consejos, los valores y por esos buenos momentos que pasamos juntos durante los años en que curse la maestría, muchas gracias por ayudarme a crecer como investigador y por siempre estar a mi lado.

Alejandro muchas gracias primo por escucharme en todo momento y por siempre ser una persona de las que nunca se van del lado de uno, sino que siempre están dispuestos a brindar su apoyo.

INDICE

INDICE DE TABLAS.....	9
INDICE DE FIGURAS.....	10
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES.....	15
Nanotecnología	15
Nanomedicina	16
Descripción de las nanopartículas	17
Generalidades de los polisacáridos	18
Generalidades del quitosano	18
Propiedades del quitosano	20
Metodología para la obtención de nanopartículas de quitosano	21
Aplicaciones de nanopartículas de quitosano	23
Administración ocular	23
Administración nasal	24
Administración oral	24
Aplicaciones comunes de las nanopartículas de quitosano	25
Macrófagos	25
Biología de los Macrófagos	25
Quimiotactismo	26
Fases de la respuesta inmune en las que participan los macrófagos	26
Acciones de los macrófagos	27
Vías de activación de Macrófagos	28
Macrófago activado clásicamente (MϕaC)	28
Macrófago activado alternativamente (MϕaA)	29
JUSTIFICACIÓN	32
HIPOTESIS	33
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECIFICOS	34

MATERIALES Y METODOS	35
Purificación del quitosano	35
Análisis mediante Espectrometría de infrarrojo (FR-IR)	36
Síntesis de nanopartículas de quitosano (CtsNps)	36
Caracterización de nanopartículas de quitosano (CtsNps)	36
Tamaño y Potencial Z	36
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	36
Obtención y cultivo de células mononucleares de sangre periférica	37
Grupos Experimentales	37
Análisis de expresión de receptores CD11c, CD14, CD80 y CD86	37
Análisis de perfil de citocinas en monocitos tratados con CtsNps	38
Determinación de la capacidad fagocítica de monocitos tratados con CtsNps purificado y comercial	38
Determinación de iNOS y Arginasa en monocitos diferenciados con nanopartículas de quitosano mediante microscopía confocal.	38
Análisis Estadístico	39
RESULTADOS	40
Análisis de la variación química en muestras de quitosano	40
Determinación de compuestos presentes en muestras de quitosano purificadas	42
Caracterización de las nanopartículas de quitosano (CtsNps)	43
Viabilidad Celular en PBMC	45
Expresión de Marcadores de Diferenciación	46
Análisis de perfil de citocinas	47
Ensayo de Fagocitosis	49
Determinar la expresión de óxido nítrico sintasa inducible y arginasa en monocitos diferenciados con nanopartículas de quitosano mediante microscopía confocal	50
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIÓN	55
PERSPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFIA	57

INDICE DE TABLAS

Tabla1. Determinación de compuestos en muestra de quitosano canada bioscience	31
Tabla2. Determinación de compuestos en muestra de quitosano Sigma-Aldrich®.....	31
Tabla3. Tamaño promedio de nanopartícula.....	32

INDICE DE FIGURAS

Figura1. Estructura química del quitosano.....	9
Figura2. Métodos para la síntesis de nanopartículas de quitosano.....	11
Figura3. Funciones específicas de los estados de activación de macrófagos.....	16
Figura4. Metabolismo de L-arginina.....	18
Figura5. Características moleculares de macrófagos activados.....	20
Figura6. Estrategia experimental para el análisis de la respuesta inmunológica en macrófagos.....	24
Figura7. Espectroscopia FT-IR de absorción perteneciente a muestras de quitosano.....	29
Figura8. Tamaño promedio de nanopartículas mediante dispersión de luz dinámica.....	32
Figura9. Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de quitosano.....	33
Figura10. Viabilidad Celular de PBMC.....	34
Figura11. Evaluación de marcadores de diferenciación en monocitos tratados con nanopartículas de quitosano.....	35
Figura12. Perfil de citocinas pertenecientes a monocitos tratados con nanopartículas de quitosano.....	37
Figura13. Capacidad fagocítica de monocitos tratados con nanopartículas de quitosano.....	38
Figura14. Detección de arginasa e iNOS en monocitos diferenciados mediante microscopia confocal.....	39

ABREVIATURAS

DNA	Acido Desoxirribonucleico
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
nm	Nanómetros
μm	Micrómetros
pDNA	Ácido Desoxirribonucleico plasmídico
siRNA	RNA pequeño de interferencia
PEG	Polietilenglicol
TPP	Tripolifosfato pentasodico
pI	Punto isoeléctrico
CLSM	Microscopia de barrido laser confocal
CD	Clúster de diferenciación
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
M-GSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
NK	Natural Killers
CPA	Células presentadoras de antígeno
LPS	Lipopolisacárido
M ϕ aC	Macrófagos activados por vía clásica
M ϕ	Macrófagos
M ϕ aA	Macrófagos activados por vía alterna
RM	Receptor de manosa
ON	Oxido Nítrico
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
CO ₂	Dióxido de carbono
SFB	Suero Fetal Bovino
PFA	Paraformaldehido
QTS	Quitosano
CtsNps	Nanopartículas de quitosano
CtsNps-Sigma	Nanopartículas de quitosano de sigma
CtsNps-Sigma-P	Nanopartículas de quitosano de sigma puras
CtsNps-CA	Nanopartículas de quitosano Canadá bioscience
CtsNps-CA-P	Nanopartículas de quitosano Canadá bioscience pura
PdI	Índice de polidispersidad

RESUMEN

El quitosano es un polímero biodegradable proveniente del exoesqueleto de los crustáceos, el cual es biocompatible y no tóxico, presenta actividad inmunogénica y se ha utilizado en la síntesis de nanopartículas con actividad biológica, la cual puede depender del grado de purificación del quitosano. En este trabajo se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de quitosano (CtsNps) purificado y no purificado, obtenidas a partir de dos casas comerciales (Sigma-Aldrich® y Canada Bioscience) con el fin de evaluar si estas diferentes nanopartículas pueden generar la misma actividad inmunológica en monocitos aislados de sangre periférica mediante el análisis de perfil de citocinas, actividad fagocítica y marcadores de diferenciación. Las muestras de quitosano fueron purificadas mediante hidrólisis química y posteriormente se analizaron mediante FT-IR observándose la generación de nuevos grupos OH y la detección de grupos NH₂ a una menor longitud de onda en comparación con las muestras no purificadas. Las nanopartículas de quitosano presentaron un tamaño menor a 200 nm con forma esférica y una carga superficial menor a +34 mV. Los monocitos fueron aislados a partir de sangre periférica obtenida de pacientes aparentemente sanos, estas células fueron cultivadas en placas de 6 pozos y posteriormente fueron tratadas con dos concentraciones diferentes de CtsNps (50 y 300 µg) por un tiempo de 72 horas. El medio de cultivo fue recuperado y almacenado a -40°C para el posterior análisis de citocinas. Los monocitos al ser tratados con diferentes CtsNps presentaron cambios morfológicos visibles al microscopio, los niveles de CD14 y CD86 se vieron disminuidos en comparación con los monocitos que no fueron tratados con CtsNps, a la vez estas partículas indujeron la alta producción de IL-8, baja producción de IL-10, IL-12p70 y TNF y la moderada producción de IL-1β e IL-6 dando un indicio de que estas nanopartículas son capaces de activar una respuesta inmunológica primaria en las células. La capacidad fagocítica de los monocitos diferenciados se vio disminuido en comparación con los monocitos no tratados. Finalmente, para determinar el fenotipo celular obtenido una vez que los monocitos se diferenciaban se realizó una inmunofluorescencia para determinar arginasa e iNOS las cuales son enzimas presentes en macrófagos antiinflamatorios y proinflamatorios respectivamente, mediante este ensayo se determinó que la mayoría de los monocitos diferenciados pertenecían a un fenotipo proinflamatorio, debido a que se detectó una alta fluorescencia perteneciente a la enzima iNOS. Con este trabajo de investigación damos a conocer que las nanopartículas de quitosano obtenidas a partir de quitosano purificado presentan una mayor actividad inmunológica en comparación con el quitosano comercial; por lo cual su uso como agente encapsulante, terapéutico o de diferenciación dependerá del tipo de partícula que se utilice.

ABSTRACT

Chitosan is a biodegradable polymer from the exoskeleton of crustaceans, which is biocompatible and non-toxic, has immunogenic activity and has been used in the synthesis of nanoparticles with biological activity, which may depend on the degree of purification of chitosan. In this work, purified and unpurified chitosan nanoparticles (CtsNps) were synthesized and characterized, obtained from two commercial houses (Sigma-Aldrich® and Canada Bioscience) in order to assess whether these different nanoparticles can generate the same immunological activity in Monocytes isolated from peripheral blood by analysis of cytokine profile, phagocytic activity and differentiation markers. The chitosan samples were purified by chemical hydrolysis and subsequently analyzed by FT-IR, observing the generation of new OH groups and the detection of NH₂ groups at a shorter wavelength compared to the unpurified samples. The chitosan nanoparticles presented a size smaller than 200 nm with a spherical shape and a surface charge less than +34 mV. Monocytes were isolated from peripheral blood obtained from apparently healthy patients, these cells were cultured in 6-well plates and subsequently treated with two different concentrations of CtsNps (50 and 300 µg) for a time of 72 hours. The culture medium was recovered and stored at -40 ° C for subsequent cytokine analysis. Monocytes when treated with different CtsNps showed visible morphological changes under a microscope, the levels of CD14 and CD86 were decreased compared to monocytes that were not treated with CtsNps, while being particles induced high production of IL-8, Low production of IL-10, IL-12p70 and TNF and moderate production of IL-1β and IL-6 giving an indication that these nanoparticles are capable of activating a primary immune response in cells. The phagocytic capacity of differentiated monocytes was decreased compared to untreated monocytes. Finally, to determine the cellular phenotype obtained once the monocytes were differentiated, an immunofluorescence was performed to determine arginase and iNOS which are enzymes present in anti-inflammatory and proinflammatory macrophages, respectively, by means of this test it was determined that most of the differentiated monocytes belonged to a proinflammatory phenotype, because a high fluorescence belonging to the iNOS enzyme was detected. With this research work we announce that chitosan nanoparticles obtained from purified chitosan have a higher immunological activity compared to commercial chitosan; Therefore, its use as an encapsulating, therapeutic or differentiation agent will depend on the type of particle used.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de quitosano han despertado un gran interés en la comunidad biomédica debido a que se busca implementarlas como sistemas acarreadores y liberadores de fármacos, debido a que poseen características como son la biodegradación, biocompatibilidad, estabilidad y baja toxicidad, lo que las vuelven como perfectos candidatos para ser administrados en personas con algún padecimiento específico. Adicionalmente, las nanopartículas de quitosano han sido utilizadas para una gran variedad de propósitos inmunológicos incluyendo acarreadores de vacunas de DNA y como adyuvantes para una inmunización efectiva a través de rutas no invasivas. También se ha demostrado que las nanopartículas de quitosano tienen un alto potencial para ser utilizadas como sistemas acarreadores para vacunación por vía oral con antígenos recombinantes de superficie de la hepatitis B.

Estas nanopartículas se han comenzado a utilizar debido a que el polímero de quitosano se sabe que tiene propiedades que pueden generar una respuesta inmunológica en el sistema vivo, sin embargo, la respuesta inmunológica que se llega a activar puede ser baja, por lo cual es necesario el utilizar dosis altas de estas nanopartículas; teniendo como efecto secundario la disminución en la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica. Por lo cual se han realizado procesos de purificación en el quitosano que será implementado como agente terapéutico, esto para generar una potenciación en la respuesta inmunológica y así requerir una menor concentración de quitosano en el sistema vivo, teniendo como consecuencia una disminución en el daño a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

A pesar de que el quitosano se ha comenzado a utilizar como un material para realizar la regeneración de tejido, es necesario evaluar el efecto que las nanopartículas de quitosano comercial y purificado tienen en la diferenciación de monocitos humanos, analizando los niveles de expresión de citocinas que se producen al momento en que los monocitos están en cultivo con las nanopartículas de quitosano y la producción de enzimas características que se encuentran en macrófagos proinflamatorios y antiinflamatorios, teniendo como fin el poder utilizar estas nanopartículas como un agente terapéutico ya sea para la regeneración de heridas o para utilizarse como un protocolo de diferenciación celular.

ANTECEDENTES

Nanotecnología

En los últimos años, el desarrollo de la nanotecnología está encontrando muchas aplicaciones en diversos campos, como por ejemplo la industria textil, la automoción, la energía, la alimentación, el medio ambiente y también la medicina. Las nanoestructuras pueden ofrecer muchas ventajas en el área de la biomedicina: marcapasos más pequeños y seguros, catéteres con recubrimientos antibacterianos y nuevas estructuras para terapia regenerativas. Asimismo, han contribuido en el diagnóstico *in vitro* y en el diagnóstico *in vivo* y en tratamientos en los cuales la nanotecnología puede ofrecer fármacos de liberación controlada, de terapia dirigida y con multifunción (transporte de fármaco, imagen, hipertermia, magnético). Sin embargo, aunque las nanoestructuras en aplicaciones biomédicas pueden mostrar claros beneficios, hay algunos aspectos muy importantes a considerar, como son la toxicidad y su inmunogenicidad. Además, el tamaño nanométrico hace que puedan interactuar mejor con los sistemas biológicos. El potencial que tiene la gran variedad de nanoestructuras en el campo biomédico es enorme, y ofrece una gran diversidad de propiedades biológicas y físico – químicas. Sin embargo, puesto que pueden interactuar y afectar a los sistemas biológicos, es necesaria una compleja y extensa caracterización previa, y llevar a cabo estudios de inmunogenicidad. La nanotecnología es un área multidisciplinaria que involucra el diseño y generación de sistemas funcionales a escala molecular (1 – 100 nanómetros (nm) o más pequeños). El prefijo “nano” se utiliza en ciencia como unidad de medida de longitud, para determinar una milmillonésima parte de un metro, y por tanto 10^{-9} m es 1 nm, que es decenas de miles de veces más pequeño que el grosor de un cabello humano. Los recientes avances de la comunidad científica que permiten observar, controlar y manipular a escala nanométrica, han abierto un nuevo campo de investigación: la nanotecnología. Las posibles aplicaciones de esta nueva ciencia basada en el desarrollo de materiales nanoestructurados y de nuevas herramientas que actúan a este nivel, ha generado un área con gran potencial y con un enorme impacto social y económico.

Para comprender las posibilidades que ofrece esta nueva tecnología es clave saber que las nanoestructuras son mucho más pequeñas que las células humanas (de unas 10 a 20 μ m de diámetro) y que muchos de sus orgánulos. Las nanopartículas son similares, en tamaño, a las grandes macromoléculas biológicas tales como enzimas y receptores. Por ejemplo,

la hemoglobina tiene un diámetro de 5 nm, la bicapa lipídica que rodea a las células es del orden de 6 nm de espesor.

Nanomedicina

Uno de los sectores más sensibles donde se espera que la nanotecnología tenga un gran potencial es el campo biomédico, tanto en el diagnóstico *in vitro* como *in vivo*, en el desarrollo de nuevos materiales para prótesis, suturas, etc., e incluso en terapéutica. Esta nueva ciencia, denominada nanomedicina, ofrece oportunidades únicas para el diseño de nuevos instrumentos clínicos y para mejorar los ya existentes, así como para el desarrollo de nuevos biosensores, pero sobre todo las nanopartículas se han propuesto para ser utilizadas con fines biomédicos debido a su gran versatilidad como transportadores de fármacos, como adyuvantes en vacunas, para la destrucción de células tumorales mediante hipertermia y como agentes de contraste.

En el campo de la detección, la nanotecnología ofrece unas posibilidades inmensas, bien con el uso de nanopartículas solas o combinadas con anticuerpos. Dentro del campo terapéutico, numerosos grupos de investigación están desarrollando nanopartículas con multitud de aplicaciones, como la liberación de fármacos de forma controlada, que destruyan de forma específica células tumorales, que atraviesen la barrera hematoencefálica, que actúen como adyuvantes y permitan el diseño de nuevas vacunas, que posibiliten la utilización de hipertermia o terapia fotodinámica (Koping-Hoggard et al., 2005; Lee et al., 2007; Valdivia Uriac et al., 2007). Su tamaño nanométrico les permite atravesar muchas estructuras e interactuar fácilmente con las biomoléculas en la superficie y en el interior celular. Al poder interactuar con estructuras de una célula viva, como receptores, ácidos nucleicos, factores de transcripción y otras proteínas de señalización, podrían usarse para comprender las complejas redes de señalización y los procesos de transporte que regulan el comportamiento celular y los cambios que sufren durante los procesos de enfermedad.

Las nanopartículas, en comparación con las terapias convencionales, pueden ofrecer importantes ventajas, como son una disminución en los efectos secundarios de los fármacos tradicionales, una mayor versatilidad en el diseño de las formulaciones debido

a que pueden unirse a diversos compuestos tales como fármacos, anticuerpos, péptidos, DNA, hidratos de carbono, etc. (Vicent and Duncan, 2006).

Además, sus propiedades ópticas, eléctricas o magnéticas pueden emplearse para matar células tumorales mediante tratamientos de hipertermia utilizando longitudes de onda dentro del rango del infrarrojo cercano (Hirsch et al., 2003). Mientras que el desarrollo de nuevos nanomateriales no biodegradables está creciendo exponencialmente, aunque con lenta introducción en clínica, numerosos agentes terapéuticos basados en nanopartículas biodegradables, como son los liposomas, los polímeros u otros compuestos, llevan ya tiempo en el mercado.

Descripción de las nanopartículas

Con los avances en la nanotecnología y sus aplicaciones, está claro que los nanosistemas son mejores portadores de fármacos, los cuales ofrecen una variedad de ventajas que incluyen estabilidad mejorada, anticuerpos mejorados y entrega intracelular eficiente para antimicrobianos y vacunas (Laquerriere et al., 2003). Muchas de estas ventajas se derivan de las interacciones de las nanopartículas en la membrana celular y sus efectos inmunomoduladores (Mottram et al., 2007, Storni et al., 2005, Gomez et al., 2006).

Las nanopartículas se caracterizan por tener un tamaño de partícula muy pequeño, actualmente considerado, en el orden de 1 a 100 nm. Existen diversos tipos de materiales estructurados como nanopartículas, nanocristales, nanotubos, nanoalambres, etcétera de composiciones diversas, obteniendo nanomateriales orgánicos e inorgánicos en distintas dimensiones con aplicabilidad multifuncional, que van desde la medicina hasta la electrónica moderna (Guozhong, 2004).

Debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, las nanopartículas son con frecuencia descritas como átomos artificiales (Bhumkar et al., 2007; Colvin et al., 2013; Cheng et al., 2008). Los avances en los procesos de síntesis han permitido el control preciso sobre los parámetros estructurales que gobiernan la formación de las nanopartículas lo que ha permitido adaptar las propiedades de estos átomos artificiales de acuerdo con su uso específico. La síntesis y el ensamblado modular de nanopartículas permiten explotar sus

propiedades únicas, lo que puede llevar a nuevas aplicaciones en catálisis, electrónica, fotónica, magnetismo, así como censado químico y biológico.

Generalidades de los polisacáridos

Los polisacáridos son los polímeros naturales más versátiles debido al amplio espectro de propiedades químicas, físicas y funcionales que confluyen en los organismos vivos, tales como conferir estructura, almacenar energía y otras funciones muchas más especializadas, tales como reconocimiento y adhesión en células eucariontes, señalización y activación de procesos de resistencia en plantas, formación de biopelículas en microorganismos, entre otras. A pesar del elevado tonelaje de polisacáridos que se utilizan como materias primas en las industrias de fibras, textil, papel y alimentos (por ejemplo, derivados de celulosa y almidones) hay cada vez mayor evidencia que sugiere que ciertas familias de polisacáridos poseen propiedades funcionales tales como el biomédico, cosmético y farmacéutico. Es especialmente relevante que algunos de estos biopolímeros combinan propiedades fisicoquímicas como la capacidad de formar sistemas tipo hidrogeles, micro y nanopartículas, con propiedades biológicas como la bio y mucoadhesividad que en su conjunto los hacen particularmente atractivos en la ingeniería y diseño de materiales empleados en ciencias de la salud.

Generalidades del quitosano

El quitosano es un aminopolisacárido obtenido a escala industrial por N – desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los desechos de crustáceos. A lo largo de la década pasada el quitosano se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos y comercialmente en la manufactura de parches cicatrizantes (Higuera-Ciapara et al., 2007) siendo estos los nichos de mercado de mayor crecimiento en el mundo (Orive, G et al., 2005).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. Además, el carácter policatiónico le confiere al quitosano alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas (por ejemplo, insulina,

pDNA, siRNA, heparina, etc.) y antigénicas, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica (Pastor et al., 2004).

El quitosano se ha utilizado ampliamente en la industria de alimentos y está aprobado como aditivo en Japón. Se comercializa en Europa, EUA y en otros países como un atrapador de grasa en formulaciones para reducir el colesterol y el sobrepeso, se ha evaluado en ensayos clínicos como potenciador de la penetración de fármacos por vía nasal (Illum et al., 2001) y como excipiente farmacéutico (Singla et al., 2001).

Se sabe que el quitosano es degradado por varias enzimas, entre ellas las quitinasas y la lisozima presente en superficies mucosas y en suero humano (Hirano, S. et al., 1990, Aiba, S, 1992, Nordtveit et al., 1996) así como por enzimas gástricas como la papaína, pepsina y lipasa A (Roncal et al., 2007). Otras propiedades biológicas han sido ampliamente estudiadas en el quitosano, tanto *in vitro* como en modelos animales, entre ellas cabe mencionar las siguientes: mucoadhesividad (Shruti, C. et al., 2006), biocompatibilidad (Vandevord et al., 2002), baja toxicidad (Aspden et al., 1997), inmunoestimulación (Borges, O., et al., 2007, Zaharoff, D.A. et al., 2007), capacidad para facilitar la absorción de macromoléculas biológicas a través de barreras epiteliales por la apertura transitoria de las uniones estrechas celulares (Smith et al., 2004). Por otra parte, a lo largo de la década pasada se ha dedicado un gran esfuerzo al estudio de las modificaciones químicas del quitosano para, de este modo, explorar su máximo potencial de aplicación. Entre los principales productos derivados, merecen especial mención quitosano trimetilado, tiolado, N, O – carboximetilado y el injertado con polietilen glicol (PEG), los cuales exhiben propiedades mejoradas para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas (van der Merwe et al., 2004). Estas modificaciones son determinantes no sólo en el patrón de solubilidad del quitosano, sino en sus propiedades biológicas y funcionales (Bernkop-Schnúr et al., 2004, Krauland et al., 2004).

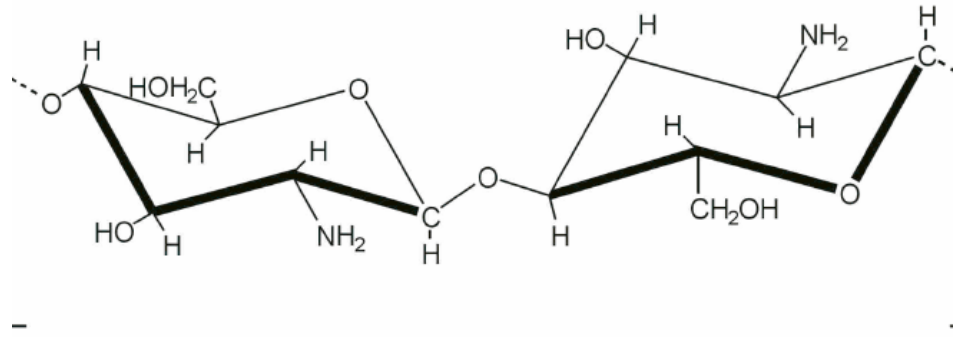


Figura1. Estructura química del quitosano, en ella se observa los grupos amino (NH_2) los cuales son característicos de su estructura química.

Propiedades del quitosano

Algunas de las propiedades funcionales del quitosano son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante (I. Aranaz et al., 2009). Estas propiedades funcionales han promovido su utilización en varios campos distintos como son agricultura, industria y medicina. En agricultura, el quitosano se ha descrito como antiviral en plantas y como aditivo en fertilizantes. Así mismo se ha investigado como agente quelante de metales en agricultura e industria y como agentes filmogénicos en cosmética (E. Agulló et al., 2004).

También ha sido utilizado en la industria papelera, en la textil y en el tratamiento de aguas residuales (H. K., 2000). En la industria alimentaria se puede utilizar como ingrediente funcional y como fibra alimentaria. Además, tiene la capacidad de unirse a grasas, por lo que se utiliza como agente hipocolesterolémico en productos diabéticos (Aranaza et al., 2009). Ha sido altamente utilizado en el campo de la biomedicina debido a su actividad inmunoestimuladora, propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana y antifúngica (Helander et al., 2001) y por su acción como promotor de la cicatrización de heridas (Kumar et al., 2004).

En los últimos años, el estudio del quitosano se ha centrado sobre todo en mejorar la liberación y la absorción de las llamadas biomoléculas terapéuticas, como son los fármacos proteicos (S.A. Agnihotri et al., 2004). Existen resultados contradictorios sobre la mayor eficiencia del quitosano en solución, en polvo o en forma de nanopartículas en la liberación *in vivo*. En general, se ha visto que la eficiencia de la absorción de

macromoléculas en mucosas utilizando nanopartículas de quitosano como vehículo de encapsulación es inferior a la obtenida con formulaciones de quitosano en solución o en polvo (A. M. Dyer et al., 2002).

Metodología para la obtención de nanopartículas de quitosano

Las nanopartículas a base de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo “bottom – up” como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas el fármaco puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida (o semi-sólida). Las metodologías más comunes mediante las cuales es posible preparar nanopartículas a base de quitosano se presentan en la Figura 1. A menudo, se utiliza una combinación de métodos; por ejemplo, entrecruzamiento covalente de la superficie de nanopartículas previamente obtenidas por coacervación. Es importante señalar que, a pesar de la diversidad de métodos documentados (Figura 2) y agentes químicos disponibles para obtener nanopartículas a base de quitosano, sólo unos cuantos de éstos ofrecen potencial real para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas debido al estricto marco regulatorio que deben cumplir los excipientes para la liberación de fármacos.

Dentro de los que mayor atención han recibido, destacan aquellos basados fundamentalmente en el principio de la gelificación iónica del quitosano utilizando tripolifosfato pentasódico (TPP) (Calvo, P. et al., 1997). Entre las ventajas de este sistema cabe destacar que evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos o procesos drásticos como la sonicación, que unido a la naturaleza policationica del quitosano les confieren a estos sistemas la capacidad para asociar de forma eficiente y preservar la estabilidad y bioactividad de macromoléculas terapéuticas contra su degradación. Este sistema ha demostrado alta capacidad de carga de péptidos y proteínas hidrofílicas tales como insulina (Fernández-Urrusuno et al., 1999, Pan et al., 2002, Ma, Z, et al., 2002, Ma, Lim, et al., 2005, Vila, A, et al., 2004). Albúmina sérica de bovino (Xu, Y. et al., 2003, Zhang, H. et al., 2004) y toxoide tetánico (Vila, A., et al., 2004).

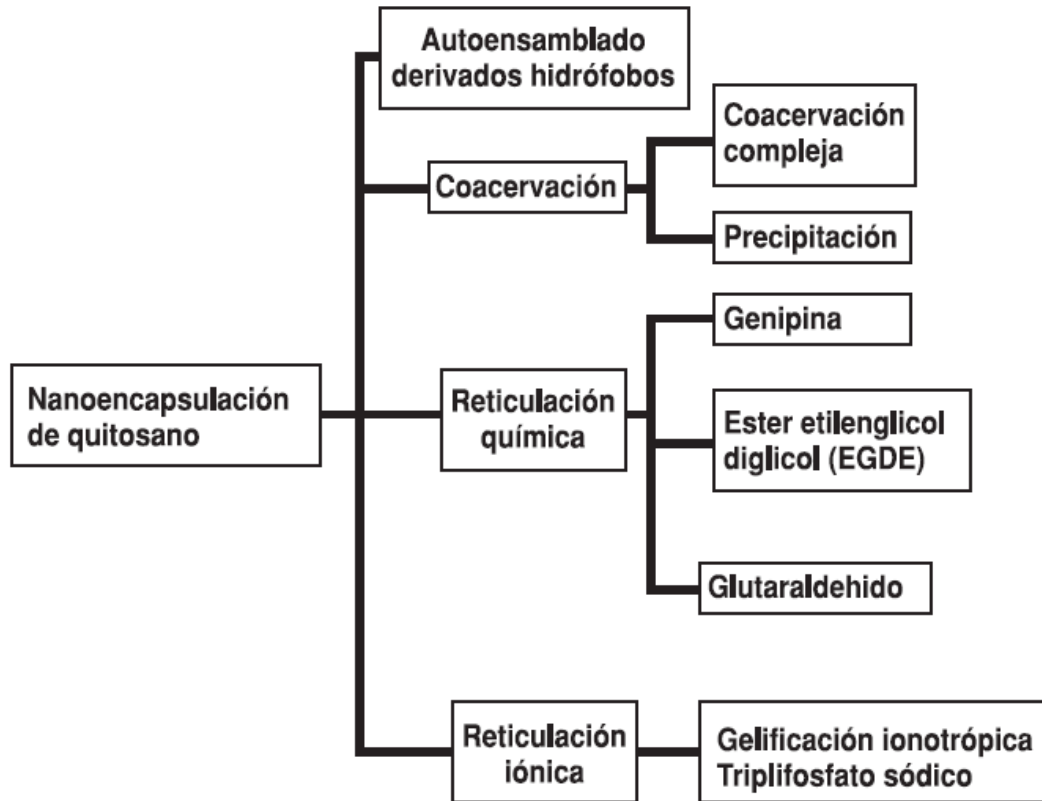


Figura2. Métodos para la preparación de nanopartículas de quitosano. En ella se observan que el método de gelificación ionotrópica se encuentra ubicado en el método de reticulación iónica el cual se considera el mejor método para la obtención de partículas.

La capacidad de carga se ve principalmente afectada por la solubilidad y el pI de la proteína, la carga teórica de ésta, pH y por el peso molecular del quitosano. Otras macromoléculas que se han cargado exitosamente en prototipos de estas nanopartículas incluyen: pDNA, heparina, β -lactoglobulina y péptidos hidrófobos como la ciclosporina A. moléculas pequeñas hidrófilas como glicirrizinato de amonio, también han sido asociadas a estos sistemas.

El mecanismo para la formación de nanopartículas de quitosano – TPP plantea que la gelificación ionotrópica del quitosano ocurre por interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa ($P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$), con los grupos $-NH^{3+}$ del quitosano (Calvo, P., et al., 1997). El tamaño de partícula de este sistema es muy sensible al pH y la fuerza iónica (López-León, T., et al., 2005). A su vez, el efecto de otras condiciones preparativas y de las características intrínsecas del quitosano ha sido

estudiado, con atención a la composición (Xu, Y. et al., 2003, Zhang, H., et al., 2004, Gan, Q., et al., 2005).

En general el tamaño de partícula en este sistema se ha observado que varía en un rango de 100 a 350nm; el potencial zeta se encuentra entre +20 y +50 mV e invariablemente poseen una morfología esférica de acuerdo con la evidencia de microscopía de transmisión electrónica y de fuerza atómica (Kim, B.G. et al., 2006). Dichas características, confieren a las nanopartículas de quitosano propiedades óptimas para la interacción con diversos epitelios.

Aplicaciones de nanopartículas de quitosano

Conociendo sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, el quitosano se ha utilizado en investigación farmacéutica centrada en el desarrollo de vehículos nano particulares innovadores. En este sentido, son de destacar en estos sistemas tanto la capacidad para proteger macromoléculas bioactivas frente a la degradación, como la habilidad para transportarlas a través de las barreras de las mucosas. En consecuencia, su aplicación se ha enfocado al desarrollo de nanovehículos aptos para la administración por vías no invasivas, tales como las mucosas ocular, nasal y oral (Janes, K.A., et al., 2001, Alonso, M.J. et al., 2003, Prego, C., et al., 2005, Sánchez, A. et al., 2006). Adicionalmente, estudios recientes han demostrado la factibilidad de incorporar nanopartículas de quitosano – TPP en micropartículas a base de manitos secadas por aspersión para la administración por vía del epitelio pulmonar (Grenha, A., et al., 2005).

Administración ocular

La eficacia de las nanopartículas de quitosano para prolongar la administración de fármacos a la superficie del ojo ha sido firmemente demostrada. Esto se ha conseguido con CyA como fármaco modelo cuya administración se puede ver beneficiada de una liberación prolongada, toda vez que este fármaco se prescribe para el tratamiento del síndrome de ojo seco severo. Es interesante anotar que las nanopartículas de quitosano fueron capaces de proveer una administración selectiva y prolongada de CyA hacia la mucosa ocular sin comprometer tejidos internos y evitando la absorción sistémica (De Campos, A.M., et al., 2001). En estudios subsecuentes, utilizando quitosano marcado fluorescentemente fue posible demostrar que la adhesión de nanopartículas de quitosano a la córnea y conjuntiva persiste durante más de 24 horas (De Campos, A.M., et al., 2004).

Administración nasal

Las nanopartículas de quitosano han demostrado mejorar el transporte y biodisponibilidad de macromoléculas terapéuticas y antigénicas a través de la mucosa nasal (Köping-Höggard, et al., 2005, Csaba, N., et al., 2006). Los estudios para mejorar la eficacia de nanopartículas para la liberación de macromoléculas por vía nasal se han centrado en dos tipos de macromoléculas: insulina y antígeno de toxoide tetánico. La administración de nanopartículas de quitosano cargadas con insulina por vía nasal en conejo conduce a una disminución significativa de los niveles de glicemia (~ 40%), con respecto a una solución de insulina y quitosano (Fernández-Urrusuno, R., et al., 1999). En otros estudios se ha abordado la respuesta inmune posterior a la administración de nanopartículas cargadas con toxoide tetánico, empleado como un antígeno modelo. Paralelamente, se ha demostrado el potencial de las nanopartículas de quitosano para la administración de plásmidos por vía nasal, con resultados prometedores (Csaba, N., et al., 2004). En general, los resultados de estudios diversos son consistentes con la hipótesis que las nanopartículas de quitosano atraviesan la mucosa nasal y alcanzan las células presentadoras de antígeno. Los mecanismos en virtud de los cuales las nanopartículas de quitosano mejoran el transporte intranasal de macromoléculas terapéuticas, se entienden como una consecuencia de la facilidad de interacción de dichas nanopartículas con el epitelio nasal.

Administración oral

Las nanopartículas de quitosano también han sido ampliamente estudiadas como vehículos para la administración oral de macromoléculas terapéuticas (Cui, F., et al., 2004). En este particular, la administración oral de nanopartículas de quitosano cargadas con insulina a ratas diabéticas resultó en la aparición de una respuesta hipoglucémica en un período de 8 horas posterior a la administración, la cual se prolongó hasta por 24 horas (Pan, Y., et al., 2002). La evidencia experimental de estos y otros estudios es consistente con la hipótesis de que estos sistemas son capaces de adherirse firmemente y traspasar el epitelio intestinal, además de ceder el péptido en forma sostenida al torrente sanguíneo. Esta hipótesis ha sido corroborada por observaciones de microscopia de barrido láser confocal (CLSM) que revelaron que una porción de las nanopartículas es internalizada en cultivos celulares monocapa tipo enterocito Caco-2 y que dicha interacción es aún más importante con células que secretan mucus, MTX-E12 (Behrens, I., et al., 2002). De aquí,

que se haya sugerido que la presencia de mucus favorece la interacción de las partículas con el epitelio subyacente. Aun cuando esta interpretación no puede trasladarse directamente a la situación *in vitro*, se puede aceptar razonablemente que las nanopartículas de quitosano son capaces de conferir protección al péptido frente a la degradación y facilitan la interacción con mucosas absorbentes.

Aplicaciones comunes de las nanopartículas de quitosano

Las nanopartículas de quitosano en la actualidad son utilizadas ampliamente como agentes antibacterianos, vectores de administración de genes y portadores de liberación de proteínas y fármacos, se usan como un potencial adyuvante para vacunas (por ejemplo, la vacuna de la gripe, hepatitis B y paratifoidea de los lechones). También se ha demostrado que el quitosano previene la infección en las heridas y acelera el proceso de cicatrización de las heridas mejorando el crecimiento de las células de la piel, a la vez estas nanopartículas se pueden usar con fines de conservación mientras se envasan alimentos, mientras que en odontología son utilizadas para eliminar las caries. Por último, se ha demostrado que las nanopartículas de quitosano muestran propiedades regeneradoras de la piel cuando se probaron en fibroblastos y queratinocitos, allanando el camino a productos para el cuidado de la piel y el antienvjecimiento.

Macrófagos

Biología de los Macrófagos

Los macrófagos son células del sistema inmune que se forman en respuesta a una infección, tienen las características de ser células grandes, especializadas que reconocen, engullen y destruyen a las células blancas. Se forman mediante la diferenciación de monocitos, uno de los grupos mayores de glóbulos blancos del sistema inmune. Cuando hay daño tisular o infección, los monocitos salen del torrente sanguíneo y se incorporan al tejido u órgano afectado y experimentan una serie de cambios para convertirse en macrófagos. Los macrófagos se pueden modificar para formar diversas estructuras para luchar contra diversos patógenos. De esta manera, los macrófagos proporcionan una primera línea de defensa en la protección del hospedero contra la infección generada por el patógeno.

Los macrófagos presentes en seres humanos tienen un tamaño alrededor de 21 micrómetros de diámetro. Pueden sobrevivir por meses y se encuentran implicados en la inmunidad específica o natural. Este tipo de inmunidad es una inmunidad a largo plazo, se detecta cuando el macrófago digiere un patógeno y presenta el antígeno en su superficie, alertando a otros glóbulos blancos de la presencia de una molécula invasora. Los macrófagos presentan diversos marcadores de superficie, por ejemplo: CD14, CD11b, EMR1, MAC-1/MAC-3, lisozima M y CD68.

Quimiotactismo

La atracción de los fagocitos del sistema de inmunidad natural hacia el foco de infección se puede deber a varios factores: sustancias de origen directamente microbiano y componentes microbianos (p. ej., endotoxinas). La respuesta más aparente a los agentes quimiotácticos es el cambio de morfología. Para llevar a cabo sus funciones, los macrófagos necesitan ser activados por el IFN- γ segregado por los linfocitos T. Los macrófagos activados son más grandes y tienen aumentados la síntesis proteica, el contenido de enzimas lisosomales, la fagocitosis y la capacidad bactericida. Existen otros factores capaces de activar a los macrófagos: IL-1, IL-2, IL-4, TNF, GM-CSF, M-CSF. Esta activación es necesaria para la presentación de antígeno, actividad citotóxica frente a tumores y actividad bactericida.

Fases de la respuesta inmune en las que participan los macrófagos

- a) Defensa inicial frente al patógeno: el macrófago sin activar tiene su capacidad fagocítica basal. Al mismo tiempo secreta citocinas que ayudan a otras células
- b) Presentación de antígeno: actúa como célula presentadora para linfocitos Th, que a su vez se activan secretando citocinas.
- c) Fase efectora el macrófago se activa por citocinas (como el IFN- γ secretados por linfocitos Th), lo cual va a potenciar sus actividades antimicrobianas, antitumorales y de secreción de citocinas.

Las citocinas secretadas por macrófagos en respuesta a componentes microbianos cumplen importantes papeles: la IL-12 y el TNF- α , en sinergia con otros mediadores, mejoran la actividad antimicrobiana inespecífica:

- El TNF- α mejora la capacidad microbicida de PMN neutrófilos y de los propios macrófagos
- El TNF- α junto con la IL-12 provocan que las células NK liberen IFN- γ , el cual aumenta la actividad de los macrófagos
- El TNF- α induce cambios en las superficies de células endoteliales y de fagocitos, que pueden interactuar de modo que los fagocitos se extravasan para acceder al lugar de la inflamación, donde se localiza el foco de infección.

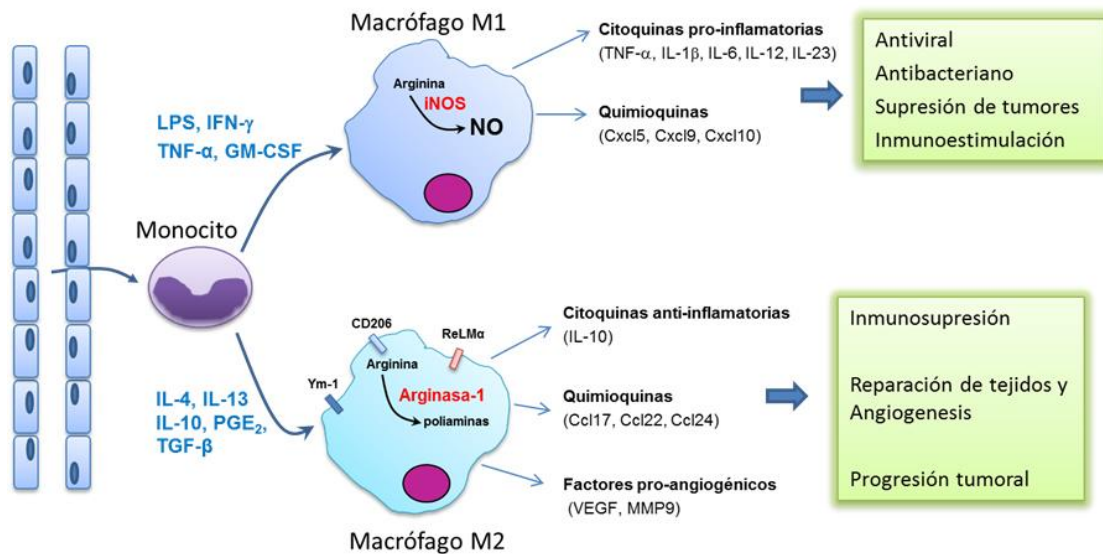


Figura3. Funciones específicas de los estados de activación de macrófagos

Acciones de los macrófagos

Participa en el inicio de la respuesta como CPA, y en la fase tardía como célula inflamatoria, tumoricida o microbicida; además, de sus funciones reguladoras. Los macrófagos y sus productos intervienen en:

- Inflamación y fiebre
- Activación linfocitaria (procesado y presentación de antígeno y producción de IL-1, TNF, IL-10, IL-12)
- Reorganización de los tejidos
- Daños hísticos
- Actividad microbicida
- Actividad tumoricida (acción citotóxica)

Los macrófagos en reposo pueden matar, pero sus capacidades microbicidas pueden mejorar por medio de su activación. Esta activación puede provocarse por: Productos microbianos (LPS) que causan activación directa de monocitos y macrófagos ó activación indirecta (los macrófagos sin activar y las células NK liberan citocinas que a su vez activan a los macrófagos).

Vías de activación de Macrófagos

Macrófago activado clásicamente (M ϕ aC)

Los M ϕ se activan clásicamente en respuesta a la citocina IFN- γ en combinación con el factor de necrosis tumoral (TNF- α) o un estímulo que induce TNF- α (Mosser, 2003). Una de las características principales de esta célula es la inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) la cual actúa sobre L-arginina produciendo óxido nítrico (ON) y citrulina (Hibbs JB Jr, 2002) (Figura 4). La iNOS es inducida en M ϕ a través de las citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ e IL-12. Por otra parte, los M ϕ aC pueden ser identificados por una variedad de criterios funcionales y bioquímicos. Estas células muestran un incremento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) y de moléculas co-estimuladoras. Además, los M ϕ aC tienen mayor capacidad para presentar antígenos y para eliminar patógenos intracelulares. Sin embargo, los M ϕ aC expresan niveles reducidos del receptor de manosa (RM) y se observa que estas células liberan citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-1 (Mosser, 2003, Goerdts, S. 1999).

Estas células migran a los sitios de inflamación donde encuentran a los patógenos y los degrada. Estos M ϕ poseen un marcado incremento en su capacidad para eliminar microorganismos intracelulares y durante varios años este fue el criterio funcional utilizado para definir que un M ϕ estaba activado. Esta muerte está acompañada por un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno. En este contexto, ON actúa como una molécula efectora citotóxica del sistema inmune. Varios estudios demuestran la toxicidad de esta molécula y sus derivados frente a distintos patógenos. Las acciones antimicrobianas han sido atribuidas al ON y también a varios productos de reacción del ON, que comúnmente se denominan intermediarios reactivos del nitrógeno, como por ejemplo el peroxinitrito (Bogdan, C., 2001). Se ha estudiado el rol de iNOS en varias infecciones utilizando ratones *knock out* y se ha demostrado que en algunas de ellas la

actividad de esta enzima es esencial para el control del patógeno. En la infección con *Trypanosoma cruzi* se ha informado que los ratones deficientes de iNOS son altamente susceptibles a la infección (Saeftel, M., et al., 2001), mientras que Cummings y colaboradores, demostraron que iNOS es importante pero no esencial para el control de la infección con este parásito (Cummings, KL., Tarleton, RL., 2004).

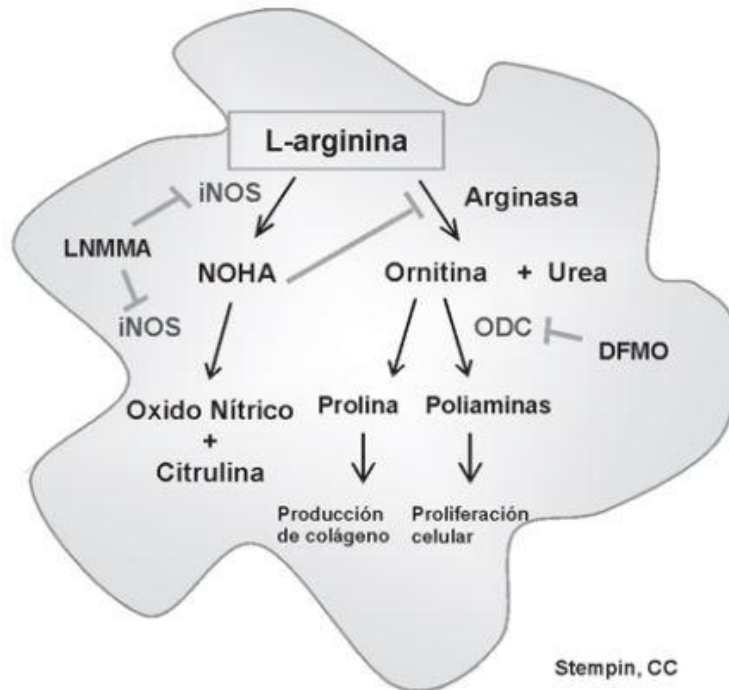


Figura4. Metabolismo de L-arginina. En M ϕ , L-arginina puede ser metabolizada por dos vías diferentes. Por un lado, es oxidada por la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS), inducida por citocinas Th1, para generar óxido nítrico (ON) y citrulina.

Macrófago activado alternativamente (M ϕ aA)

En 1990, mientras se examinaba la regulación de la expresión del RM, Gordon y col, observaron que una manera eficiente de inducir la expresión de este receptor era tratar los M ϕ con IL-4. Los autores arribaron a la conclusión de que los M ϕ tratados con IL-4 asumían un “fenotipo de activación alternativa”. Esto representó la primera descripción de los M ϕ que exhibían señales de activación, claramente diferentes a las de los activados clásicamente. Estudios subsecuentes de Goerdt y Orfanos (Goerdt, S., Orfanos, CE, 1999), han clasificado a esta célula como un M ϕ regulador, con diversos roles biológicos diferentes a los del M ϕ aC. Además, se demostró que también la IL-13 puede activar alternativamente a los M ϕ , debido a que esta citocina comparte una cadena del receptor

con el de IL-4 (Gordon, S., 2003). También se ha visto que la generación de M ϕ aA ocurre como resultado de la captura de células apoptóticas (Freire-de-Lima, CG, et al., 2000).

Los M ϕ aA, en contraste con los M ϕ aC, fallan en producir ON a partir de L-arginina, en virtud de la inducción de la enzima arginasa (Modelell, M., et al., 1995) y estos M ϕ tienen comprometida su capacidad para eliminar patógenos intracelulares. A través de arginasa se produce urea y ornítina, y luego poliaminas y prolina (Goerdts, S., Orfanos, CE, 1999) (Figura 4).

Estos M ϕ exhiben una incrementada capacidad de endocitosis y fagocitosis. Sin embargo, no son eficientes células presentadoras de antígenos y, en muchas instancias, inhiben la proliferación de las células T. La actividad supresora de estos M ϕ alcanza a células T activadas por mitógenos, las cuales muestran una respuesta proliferativa y secretoria significativamente disminuida en presencia de M ϕ aA (Schebesch, C., et al., 1997, Loke, P., et al., 2000). Las citocinas características producidas por estos M ϕ aA son la IL-10, el receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA) y TGF- β (Gordon, S., 2003).

Por otra parte, varios estudios han dilucidado la expresión diferencial de genes en M ϕ aA. Se han identificado genes que codifican para una lectina secretoria (Ym1) y para arginasa, como los más frecuentemente incrementados en M ϕ tratados con IL-4 (Weich, JS., et al., 2002). Además, se ha demostrado que en M ϕ aA, durante la infección con *Brugia malayi*, los genes inducidos más abundantemente son Ym1 y FIZZI, el cual codifica para una proteína que es secretada (Loke, P., et al., 2002). Estudios recientes en esta población celular han comenzado a focalizar su función potencial en la curación de heridas y angiogénesis. Los M ϕ aA producen altos niveles de fibronectina y proteínas asociadas a la matriz extracelular (Gratchev, A., et al., 2001). La inducción de arginasa en estas células puede llevar a la biosíntesis de poliaminas y prolina, promoviendo el crecimiento celular, la formación de colágeno y la reparación de tejidos (Figura 5). Además, la producción de citocinas anti-inflamatorias podría frenar el proceso inflamatorio inducido por los M ϕ aC (Hesse, M., et al., 2001). Asimismo, la capacidad de los M ϕ aA de suprimir la proliferación de las células T explica su presencia en la placenta y el pulmón de individuos sanos (Goerdts, S., Orfanos, CE, 1999). También se han encontrado en sitios

inmunoprivilegiados, sugiriendo que los M ϕ A protegen a los \acute{o} rganos y tejidos circundantes de la respuesta inmune da \acute{n} ina (Gordon, S., 2003).

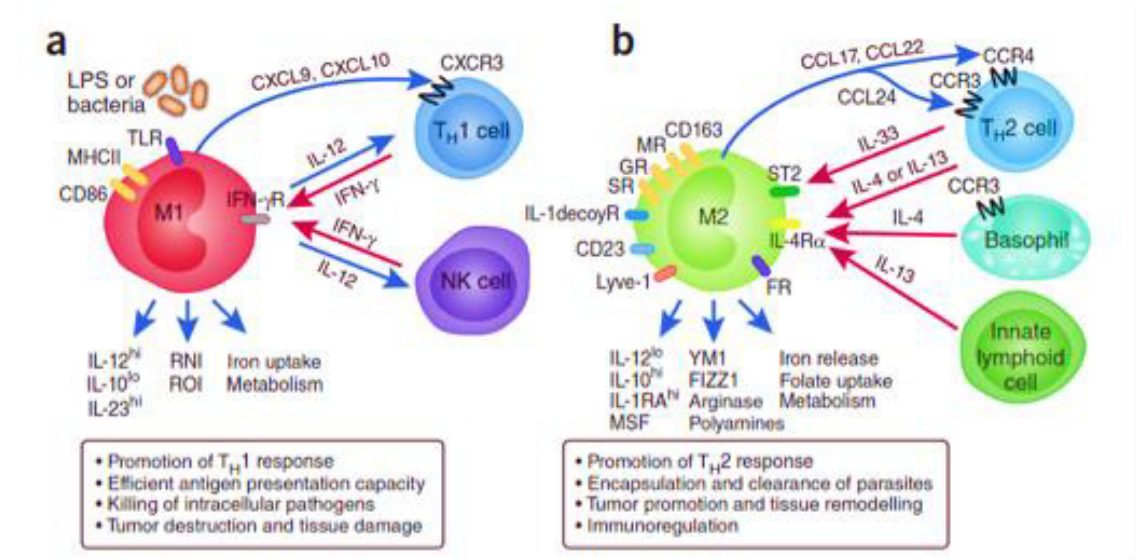


Figura5. Características moleculares de macrófagos activados por vía clásica y vía alterna. Los macrófagos M1 (a) se encuentran involucrados en procesos de fagocitosis, presentación de antígeno y destrucción de células tumorales, mientras que los macrófagos M2 (b) se encuentran involucrados en procesos de inmunoregulación, reparación de tejido y encapsulación de parásitos.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que las actividades biológicas de las nanopartículas de quitosano utilizadas en terapias medicas dependen del grado de purificación del quitosano, es necesario evaluar si utilizando nanopartículas de quitosano obtenidas a partir de quitosano purificado, se tiene la misma actividad inmunológica en comparación con las nanopartículas de quitosano provenientes de quitosano comercial.

HIPOTESIS

La eliminación de productos presentes en el quitosano mediante un proceso de purificación afectara la activación de una respuesta inmunológica en monocitos en monocitos en comparación con el quitosano comercial.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de nanopartículas de quitosano purificado y comercial en la respuesta inmunológica de monocitos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar las variaciones químicas del quitosano purificado mediante espectroscopia de infrarrojo
2. Obtener y caracterizar nanopartículas a partir de quitosano comercial y purificado mediante tamaño, forma y carga superficial
3. Evaluar la expresión de los marcadores CD11c, CD14, CD80 y CD86 en monocitos tratados con nanopartículas de quitosano comercial y purificado
4. Determinar el perfil de citocinas en monocitos diferenciados tratados con nanopartículas de quitosano comercial y purificado.
5. Evaluar la capacidad fagocítica de monocitos diferenciados tratados con nanopartículas de quitosano comercial y purificado
6. Determinar la producción de óxido nítrico sintasa inducible y arginasa en monocitos diferenciados con nanopartículas de quitosano mediante microscopía confocal.

MATERIALES Y METODOS

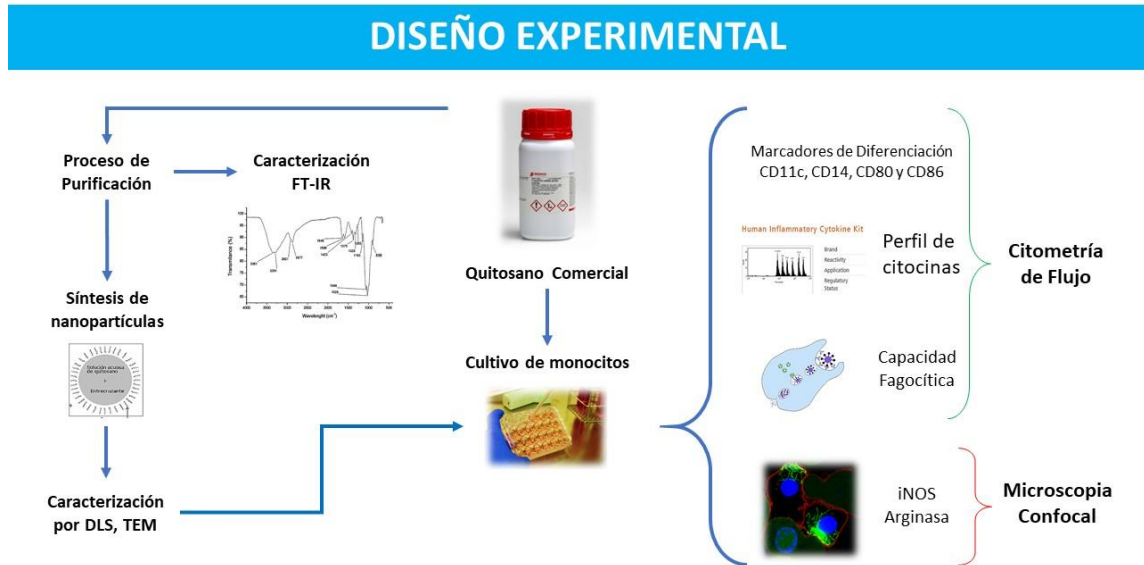


Figura6. **Estrategia experimental para el análisis de la respuesta inmunológica en macrófagos.** El experimento se dividirá en dos secciones, la parte in vitro correspondiendo a los análisis de citocinas, marcadores de diferenciación y fagocitosis, mientras que en la parte in vivo se analizará la población de macrófagos en tejido.

Purificación del quitosano

Para el proceso de purificación de las muestras de quitosano, utilizamos una relación 1:1 (p/v) de las diferentes marcas de quitosano (Sigma-Aldrich® y Canada Bioscience) los cuales se solubilizaron mediante agitación magnética en NaOH 1M independientemente durante un tiempo de 2 horas a 70°C. Después de eso, se realizó un filtrado utilizando un embudo buchner con el que se recuperó el quitosano solubilizado, las muestras se secaron a 40°C durante 12 horas una vez que fueron lavadas con agua destilada. Las muestras, una vez secas, se solubilizaron en ácido acético con una concentración de 0.1M, posteriormente se filtraron a través de papel, se ajustó el pH a las soluciones filtradas a 8.0 recuperando así el material precipitado y se lavó la muestra con agua desionizada, las muestras de quitosano fueron secadas a 40°C durante 24 horas.

Análisis mediante Espectrometría de infrarrojo (FR-IR)

Para identificar la naturaleza de los enlaces químicos entre los átomos, se realizó un análisis infrarrojo con transformado de Fourier (FT-IR). Los espectros de FTIR se registraron en un Perkin Elmer Spectrum. Todos los espectros se obtuvieron en el rango de 400 – 4000 cm^{-1} .

Síntesis de nanopartículas de quitosano (CtsNps)

Se preparó una solución de quitosano con una concentración de 1mg/ml usando ácido acético al 0.4M y homogenizada mediante agitación magnética por tiempo de 1 hora a 600 rpm, posteriormente se ajustó el pH a 5.5 usando NaOH 1M, después la solución se centrifugó durante 10 minutos a 800 rpm (este proceso fue para sedimentar cualquier residuo de quitosano no disuelto). Por otra parte, se disolvió tripolifosfato de pentasodio (TPP) en agua desionizada (2mg/ml) y se utilizó como agente entrecruzante. La síntesis se llevó a cabo homogenizando constantemente la solución de quitosano a 600 rpm durante 24 horas mediante agitación magnética, agregando 3 ml de TPP por goteo constante (volumen total). Al final del proceso, se obtuvo una solución de color opalescente y se esterilizó durante 10 minutos con luz ultravioleta (UV).

Caracterización de nanopartículas de quitosano (CtsNps)

Tamaño y Potencial Z

El tamaño se determinó mediante dispersión de luz dinámica y se utilizó la electroforesis doppler láser para determinar el potencial Z utilizando el equipo de nanosizer NS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Las muestras de nanopartículas se cargaron en una celda capilar para espectrofotometría y se analizaron a 25°C.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las nanopartículas de quitosano se montaron uniformemente en una cinta adhesiva de carbono la cual se encontraba acoplada a una porta muestra para SEM y se procedió a analizar las muestras. El análisis de microscopia electrónica de barrido se realizó en colaboración con la Facultas de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (FIME).

Obtención y cultivo de células mononucleares de sangre periférica

Los linfocitos se utilizaron para los ensayos de viabilidad y para la determinación del perfil de citocinas, así como la evaluación de marcadores, con la finalidad de analizar la respuesta inmunológica generada por las nanopartículas de quitosano. Estos linfocitos se obtuvieron a partir de muestras de sangre periférica de individuos aparentemente sanos. Las muestras se adquirieron mediante punción venosa y la sangre se recogió en tubos con heparina, posterior a esto se realizó un gradiente de sangre y polimorfoprep el cual se centrifugo a 1600 rpm durante un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente para obtener finalmente un sistema multifacético (plasma, PBMC (contenido en un anillo blanco), polimorfoprep y eritrocitos). Solo el anillo blanco fue tomado, las células obtenidas se lavaron con PBS 1x durante un tiempo de 10 minutos a 1600 rpm, se realizó un segundo lavado bajo las mismas condiciones. Después de esto, las células mononucleares se cultivaron en placas de poliestireno de 6, 12 y 24 pozos a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante un periodo de siete días utilizando medio de cultivo RPMI-1640 con SFB al 10%.

Grupos Experimentales

Para esta sección, se realizaron cuatro grupos experimentales: 1) monocitos tratados con CtsNps sintetizadas a partir de quitosano purificado, 2) monocitos tratados con CtsNps sintetizadas a partir de quitosano comercial (Sigma-Aldrich® y Canada Bioscience). 3) monocitos con RPMI-1640 10% SFB y 4) monocitos con PMA el cual funciona como un control positivo de diferenciación.

Análisis de expresión de receptores CD11c, CD14, CD80 y CD86

Una vez que los monocitos se diferenciaron, el medio fue retirado de la placa para obtener las células adheridas. Los monocitos fueron tratados con acutasa para despegarlos de la placa y, se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm, las células se resuspendieron en PBS 1x. Posterior a esto se agregaron 2 µl de cada anticuerpo (anti-CD11c humano, CD14, CD80 y CD86) y fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo condiciones de oscuridad total. Posteriormente se llevó a cabo un lavado con PBS 1x y las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo (BD accuri™ C6).

Análisis de perfil de citocinas en monocitos tratados con CtsNps

Una vez que los monocitos se trataron con CtsNps obtenidas a partir de quitosano purificado y comercial, se midió la producción de citocinas mediante el kit de citocinas inflamatorias humanas (BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit) para la determinación de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF las cuales se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el equipo BD Accuri™ C6.

Determinación de la capacidad fagocítica de monocitos tratados con CtsNps purificado y comercial

Después de siete días de cultivo, las células se lavaron con PBS 1x (1200 rpm / 10 minutos), posteriormente fueron lavadas con RPMI-1640 sin SFB durante un tiempo de 10 minutos mediante agitación con micropipeta, realizado esto se agregaron 300 μ l de solución FITC-dextran a cada una de las muestras y se incubaron durante 6 horas a 37°C. Como controles positivos y negativos se utilizaron macrófagos incubados con FITC-dextran a 37°C y 4°C respectivamente. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos y se lavaron con PBS 1x, se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el equipo BD Accuri™ C6.

Determinación de iNOS y Arginasa en monocitos diferenciados con nanopartículas de quitosano mediante microscopia confocal.

Se aislaron monocitos de sangre periférica y posteriormente se cultivaron en placas de 6 pozos (1.5×10^6 células por pozo) con medio RPMI-1640 sin SFB por un tiempo de 24 horas, pasando este tiempo, el medio fue cambiado por RPMI-1640 con SFB 10% y se dejó en condiciones de cultivo por 24 horas, posteriormente se adicionaron los tratamientos de CtsNps comercial y purificado (concentraciones de 50 y 300 μ g/mL) a los monocitos adheridos por un tiempo total de 72 horas. Posterior a este tiempo se retiró el medio de cultivo que contenía el tratamiento de CtsNps. Las células fueron lavadas con PBS 1x por 5 minutos, después las células se fijaron con PFA 4% frío (300 μ L por pozo) y se incubaron durante 20 minutos en agitación constante, se retiró el PFA y se agregó 1 mL de buffer FACS 2% para realizar lavados – repitiendo este proceso dos veces. Para realizar la permeabilización de la célula se agregaron 300 μ L de buffer tritón 0.1% y se incubaron las placas en agitación constante a temperatura ambiente por un tiempo de 20 minutos, posterior a esto se realizaron lavados con buffer FACS 2% a temperatura ambiente por un tiempo de 15 minutos (agitación constante). El bloqueo se realizó

agregando 300µL de buffer FACS 2% por un tiempo de 25 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Terminado el proceso se agregó el anticuerpo primario a cada uno de los pozos de cultivo (Arginasa e iNOS, en una concentración de 1:500) y se incubaron las placas de cultivo por un tiempo de 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron tres lavados con FACS 2% en agitación por un tiempo de 15 minutos, después se agregó el anticuerpo secundario en una relación de 1:100 (PE para marcar arginasa y Rojo Texas para marcar iNOS) y se incubaron las placas de cultivo por un tiempo de 2 horas, se volvieron a realizar lavados con FACS 2% y se agregó el marcaje DAPI (tinción de núcleo) por un tiempo de 30 minutos, finalmente se realizaron lavados con FACS2% para eliminar el excedente de marcaje y se procedió a analizar las muestras utilizando microscopia confocal.

Análisis Estadístico

Las variables evaluadas se presentaron como el promedio, la desviación estándar y la diferencia entre los tratamientos y el grupo de control, esto se evaluó mediante un análisis de varianza ($p < 0.05$), se utilizó el software GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

Análisis de la variación química en muestras de quitosano

En la figura 6A se muestra el espectro de absorción correspondiente a las cuatro muestras de quitosano analizadas (QTS-Sigma, QTS-SigmaP, QTS-CA y QTS-CAP) en las cuales se presenta una mejor definición de las bandas de absorción correspondientes al grupo funcional característico del quitosano, las muestras que fueron tratadas con un proceso extra de purificación (QTS-CAP y QTS-SigmaP) en comparación con las muestras comerciales. Fue posible detectar los grupos OH a 3434 cm^{-1} , NH a 3254 cm^{-1} , CH a 2890 cm^{-1} , NH_2 a 1621 cm^{-1} , grupo piranosico a 1150 cm^{-1} y el grupo COC a 1090 cm^{-1} (Hernández et al., 2009). En el espectro de FT-IR perteneciente a las muestras de quitosano purificado, se observó un desplazamiento a una longitud de onda más corta de 1621 cm^{-1} a 1610 cm^{-1} en la banda de absorción correspondiente al grupo NH_2 en comparación con las muestras comerciales, tal como se observa en la figura 6B.

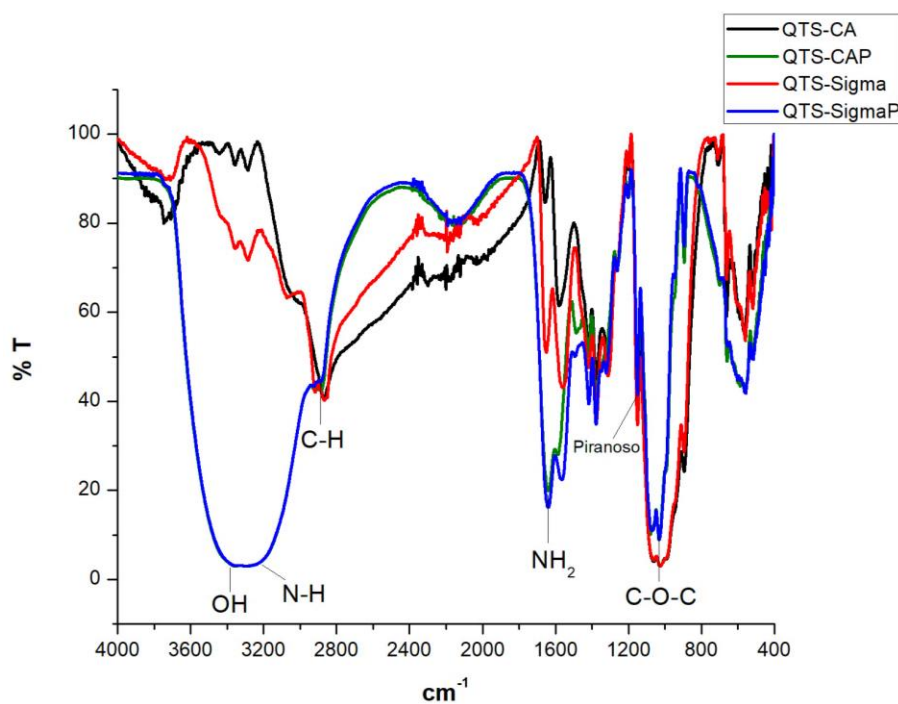


Figura7A. Espectroscopía FT-IR de absorción perteneciente a muestras comerciales de quitosano (Sigma-Aldrich® y Canada Bioscience). En el espectro de absorción se puede apreciar los seis grupos característicos del quitosano, observándose ligeras variaciones en el grupo NH_2 de las muestras purificadas identificadas como: Qts-SigmaP (banda azul) y QTS-CAP (banda verde) en comparación con las muestras comerciales: Qts-Sigma (banda roja) y Qts-CA (banda negra).

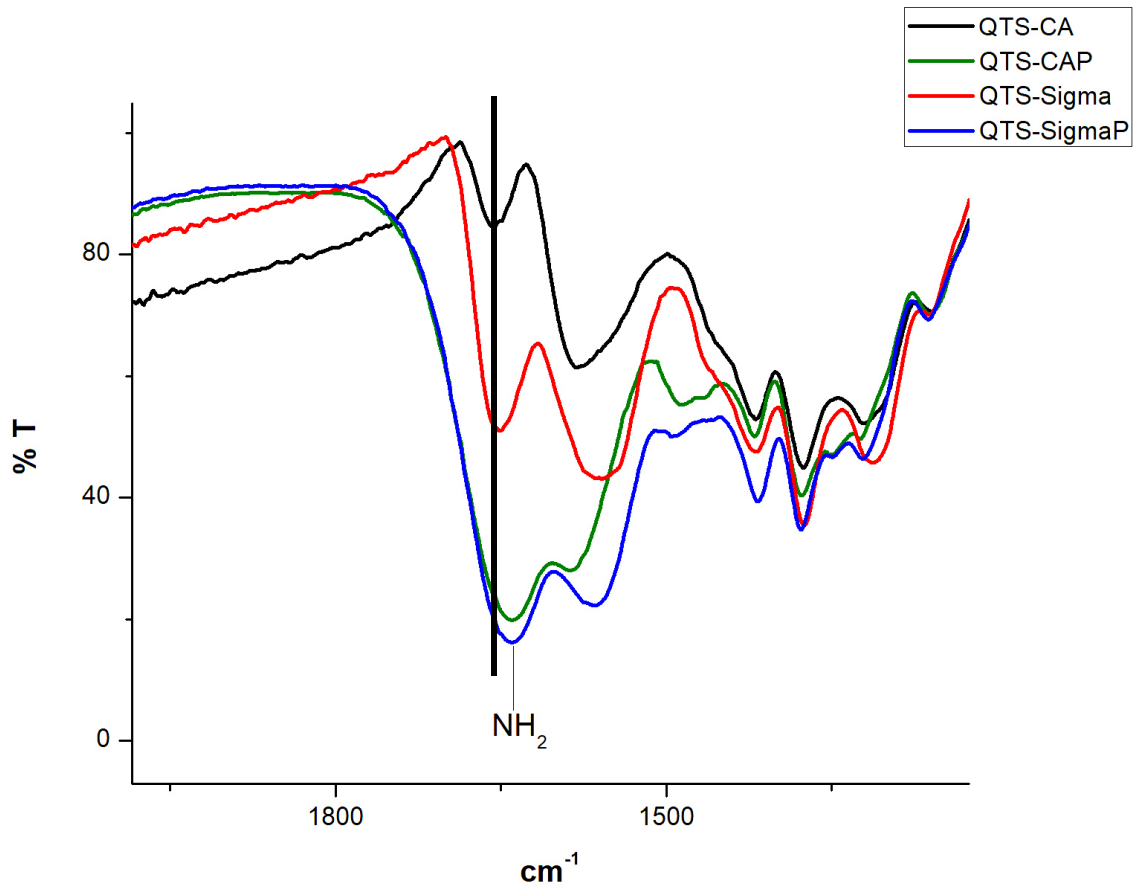


Figura7B. **Espectroscopía de FT-IR perteneciente a las dos marcas comerciales de quitosano.** En el espectro de infrarrojo se puede apreciar un corrimiento de las bandas de absorción a una menor longitud de onda, correspondiendo a las dos muestras de quitosano comerciales con un proceso extra de purificación, identificadas como Qts-CAP (banda verde) y Qts-SigmaP (banda azul).

Determinación de compuestos presentes en muestras de quitosano purificadas

Se realizó una cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas con ionización por impacto electrónico para determinar los compuestos presentes en los sobrenadantes de las muestras de quitosano purificadas mediante hidrolisis alcalina.

Tabla1. Compuestos determinados en sobrenadantes pertenecientes a muestras de quitosano de la marca Canada Bioscience

Sobrenadante primer lavado		Sobrenadante segundo lavado	
Compuesto	%	Compuesto	%
Etanol	82.35	Éter dimetílico	0.41
Oxígeno	17.65	Oxígeno	1.05
		2,2-Dimethoxypropane	98.55

Tabla2. Compuestos determinados en sobrenadantes pertenecientes a muestras de quitosano de la marca Sigma-Aldrich®

Sobrenadante primer lavado		Sobrenadante segundo lavado	
Compuesto	%	Compuesto	%
Etanol	79.33	Éter dimetílico	0.48
Furfural	3.53	Oxígeno	1.03
Oxígeno	17.14	2,2-Dimethoxypropane	98.49

Caracterización de las nanopartículas de quitosano (CtsNps)

Las CtsNps obtenidas de las diferentes muestras de quitosano mostraron un tamaño entre 120 y 190 nm, así como una gran variación en el potencial Z y un índice de polidispersidad de 0.2 a 0.3 que indica que se obtuvo una solución de nanopartículas homogéneas ($PDI > 0.5$ se considera como una solución polidispersa). Los tamaños promedio, el índice de polidispersidad y el potencial Z perteneciente a los cuatro tipos de nanopartículas se muestran en la tabla 1.

Tabla3. Tamaño medio de nanopartículas en intensidad y potencial zeta de CtsNps-Sigma, CtsNps-Sigma-P, CtsNps-CA y CtsNps-CA-P

Nanopartícula	Diámetro		Potencial zeta (mV)
	Tamaño (nm)	Índice de polidispersidad	
CtsNps-CA	177	0.3	3
CtsNps-CA-P	126	0.3	7
CtsNps-Sigma	180	0.3	31.4
CtsNps-Sigma-P	138	0.2	16.4

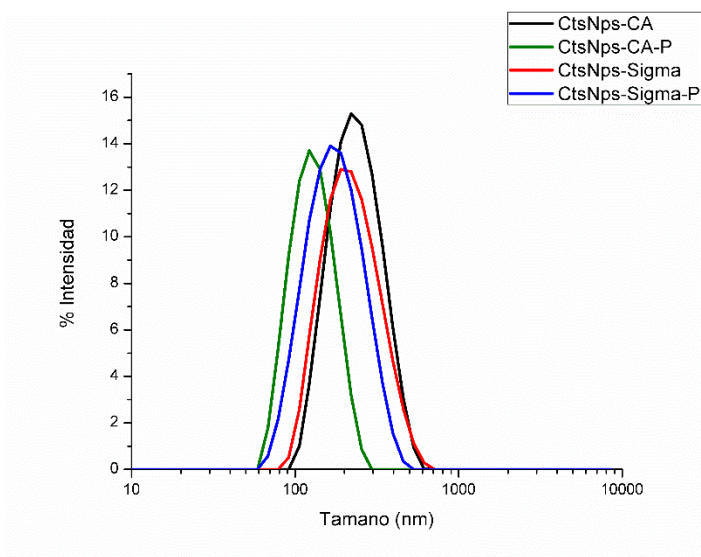


Figura8. **Tamaño promedio de nanopartículas por DLS.** Los tamaños promedio de las nanopartículas de quitosano oscilaron entre 120 – 190 nm, siendo las nanopartículas purificadas CtsNps-CA-P (banda verde) y CtsNps-Sigma-P (banda azul) las que presentaron un menor tamaño en comparación con las nanopartículas comerciales CtsNps-Sigma (banda roja) y CtsNps-CA (banda negra).

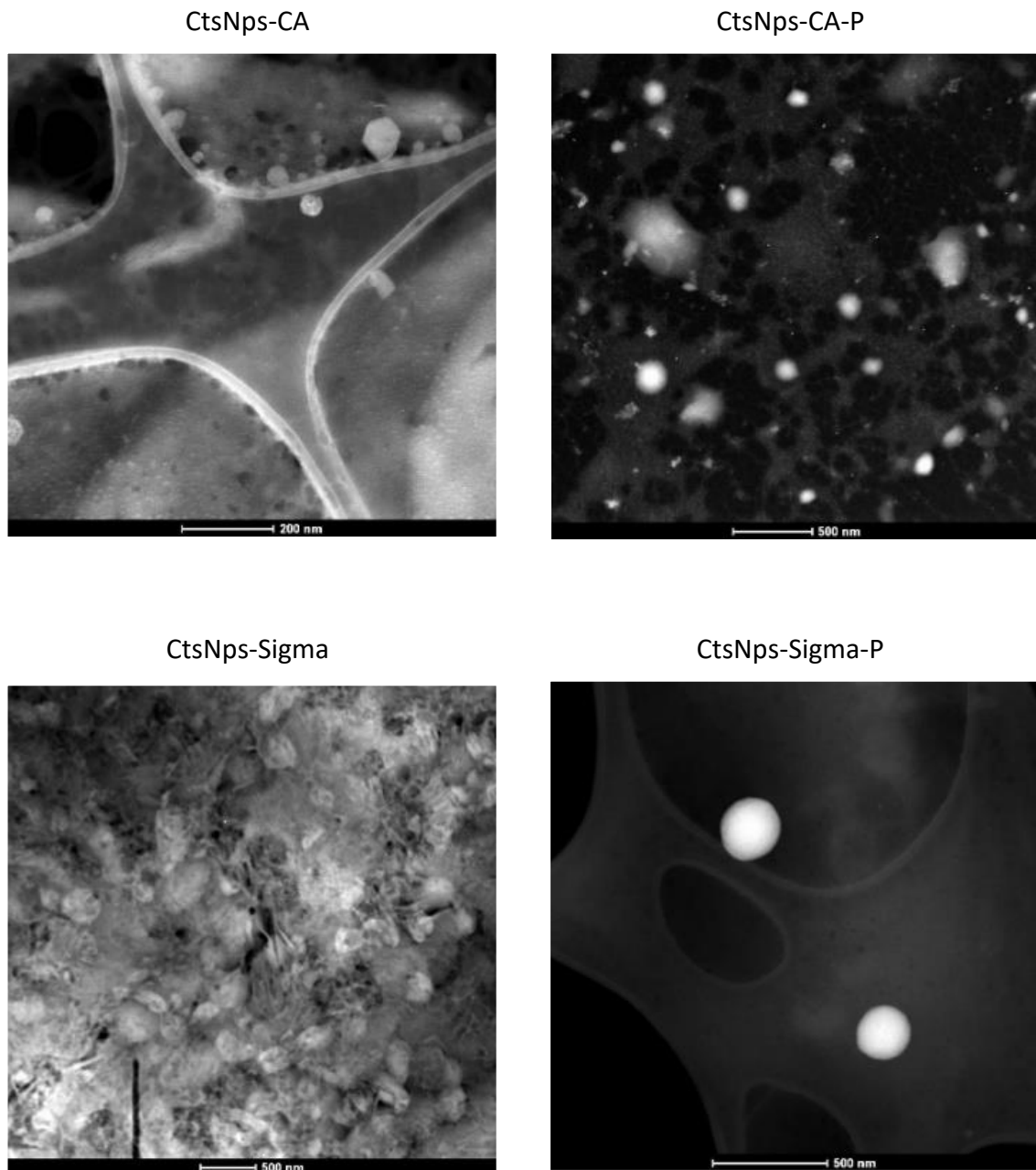


Figura9. **Microscopia Electrónica de Transmisión de nanopartículas de quitosano.** En las microscopias se puede observar la forma esférica que presentaron las nanopartículas de quitosano, así como el tamaño el cual es inferior a 300 nm (utilizando una escala de 500 nm).

Viabilidad Celular en PBMC

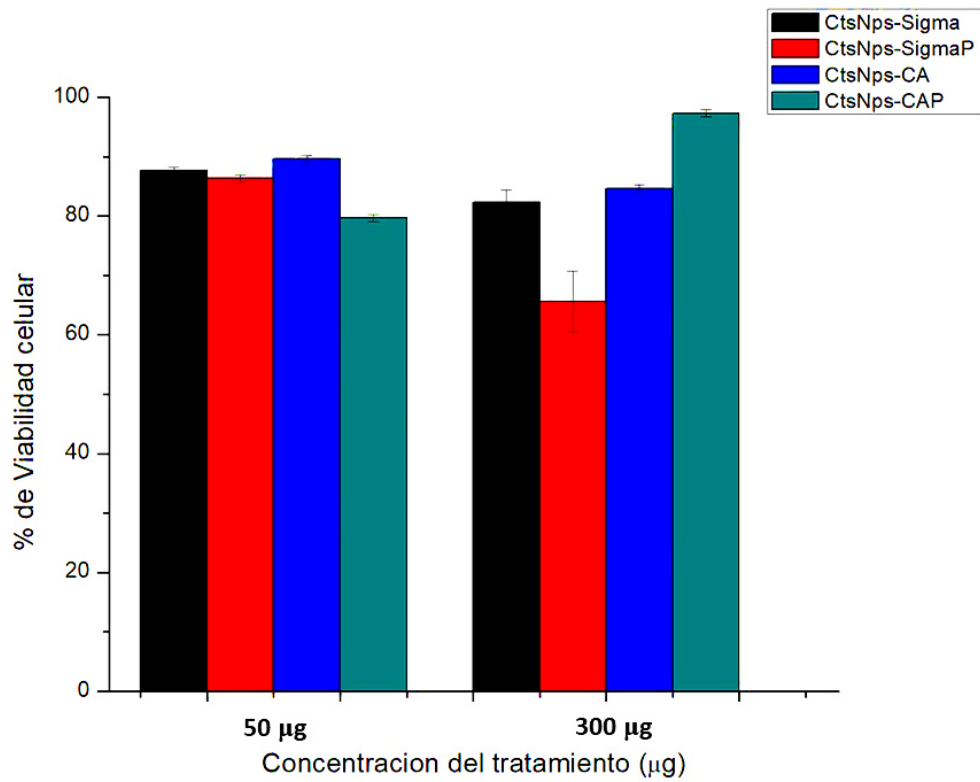


Figura10. Viabilidad celular correspondiente a células mononucleares de sangre periférica, tratadas con diferentes nanopartículas de quitosano por un tiempo total de 24 horas.

Expresión de Marcadores de Diferenciación

Se observó una alta expresión de los marcadores CD11c y CD86 en el cultivo de monocitos tratados con las concentraciones de 50 y 300 μg de CtsNps, sin embargo, se observó una disminución en la expresión de los marcadores CD14 y CD80, los cuales son marcadores característicos de monocitos; lo que nos indicaría que se está llevando a cabo una diferenciación celular hacia macrófagos, validando esto mediante el incremento de los marcadores CD11c y CD86 los cuales se encuentran en células presentadoras de antígeno.

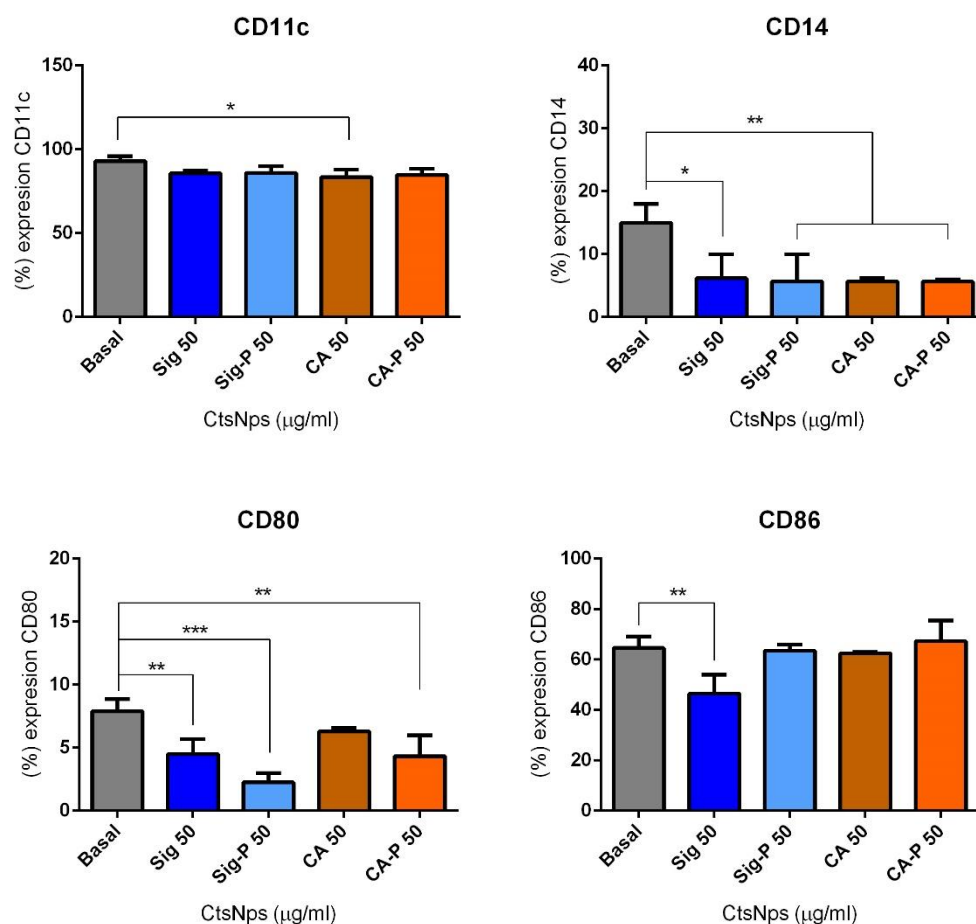


Figura11A. **Evaluación de marcadores de diferenciación en monocitos tratados con nanopartículas de quitosano.** Los monocitos se trataron con diferentes CtsNps con una concentración de 50 μg a un tiempo de 72 horas, observándose una diferencia significativa para los marcadores CD11c (Basal vs CA 50), CD14 (Basal vs todos los tratamientos) y CD80 (Basal vs Sig-P 50, Sig 50 y CA-P 50) ($p < 0.05$).

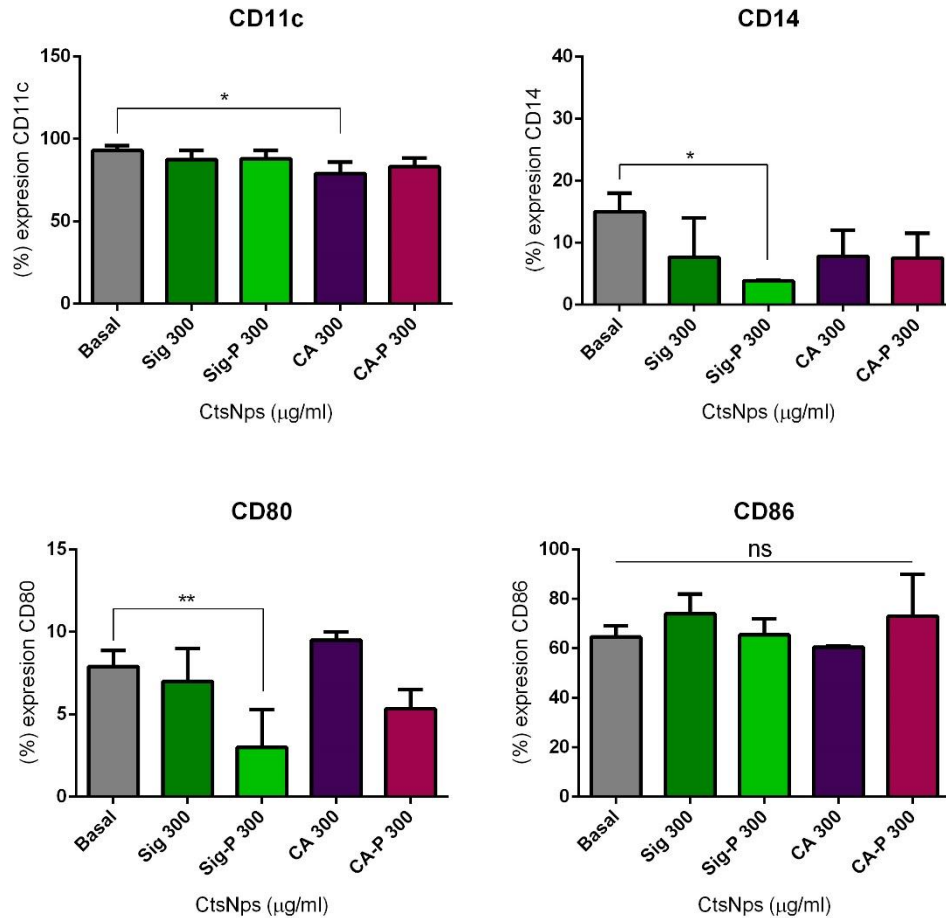


Figura11B. **Evaluación de marcadores de diferenciación en monocitos tratados con nanopartículas de quitosano.** Los monocitos se trataron con diferentes CtsNps con una concentración de 300µg a un tiempo de 72 horas, observándose una diferencia significativa para los marcadores CD11c (basal vs CA-300), CD14 y CD80 (Basal vs Sig-P 300) ($p < 0.05$).

Análisis de perfil de citocinas

Mediante citometría de flujo, se observó que el perfil de citocinas obtenido en los monocitos tratados con las diferentes nanopartículas de quitosano comercial y purificado, no generaron un perfil proinflamatorio, ya que los tratamientos no generaron una alta producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF en comparación con los macrófagos tratados con lipopolisacárido (1µg/ml).

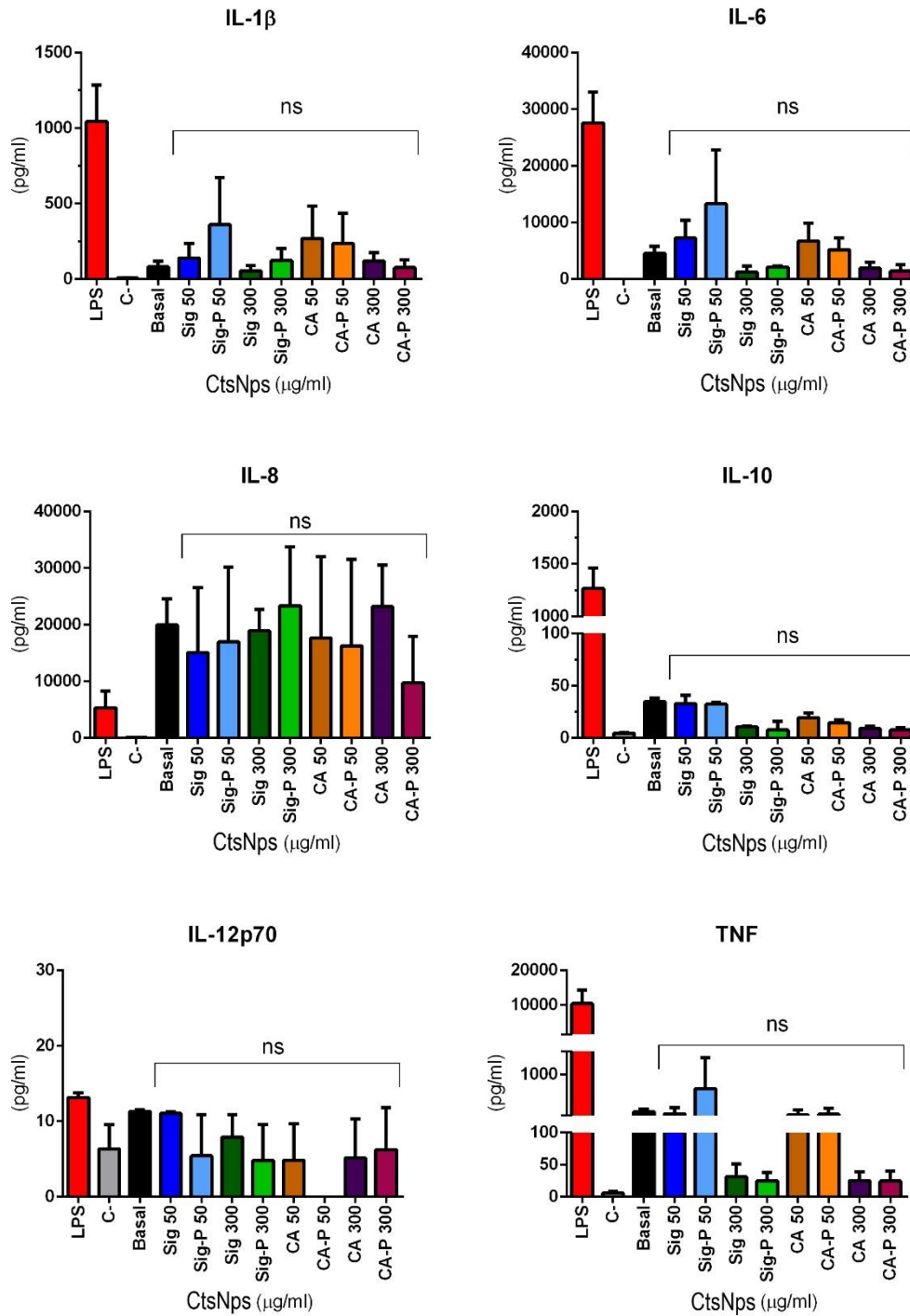


Figura12. **Perfil de citocinas perteneciente a monocitos tratados con CtsNps.** Los monocitos se trataron con diferentes CtsNps observándose que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos de CtsNps comerciales y purificadas con las concentraciones de 50 y 300 μg/ml, con lo cual el perfil generado por los tratamientos corresponde a un perfil antiinflamatorio ($p < 0.05$).

Ensayo de Fagocitosis

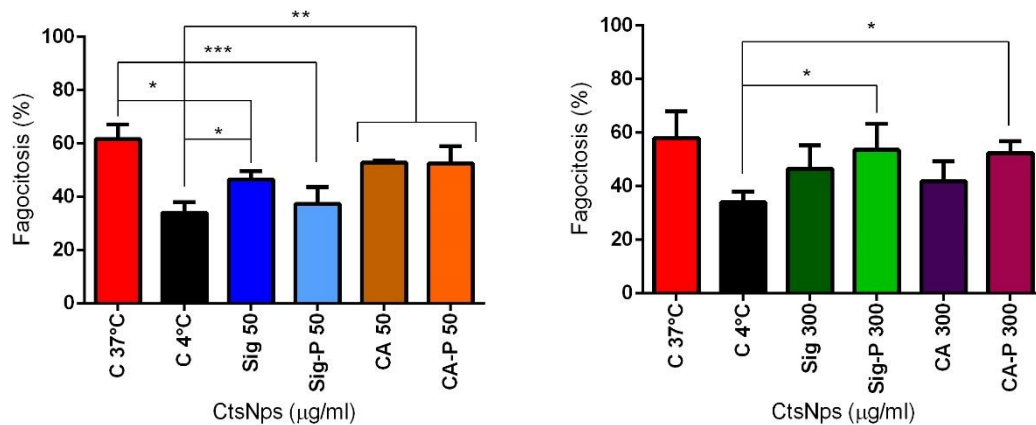


Figura12. **Capacidad fagocítica de monocitos tratados con CtsNps.** Los macrófagos se trataron con dos concentraciones diferentes de CtsNps (50 y 300µg/ml) por un tiempo de 72 horas, observándose que las nanopartículas purificadas mostraron afectar mayormente la capacidad fagocítica de las células ($p < 0.05$).

La capacidad fagocítica de los monocitos se vio afectada en su mayoría por los tratamientos correspondientes a las CtsNps purificadas las cuales generaron una disminución en la capacidad fagocítica con respecto al grupo control de 37°C, siendo el tratamiento de Sig-P 50 el que mostro una menor capacidad fagocítica (40%) en comparación con el grupo control a 37°C el cual mostro una fagocitosis de 60%.

En cuanto a los tratamientos de 300µg/ml (comercial y purificado) no se observó una diferencia significativa comparando con el grupo control a 37°C por lo cual estas concentraciones no causaron una disminución notoria en la capacidad fagocítica de los macrófagos. Con lo cual podemos decir que los macrófagos obtenidos mediante las CtsNps es un fenotipo M2 – antiinflamatorio.

Determinar la expresión de óxido nítrico sintasa inducible y arginasa en monocitos diferenciados con nanopartículas de quitosano mediante microscopía confocal

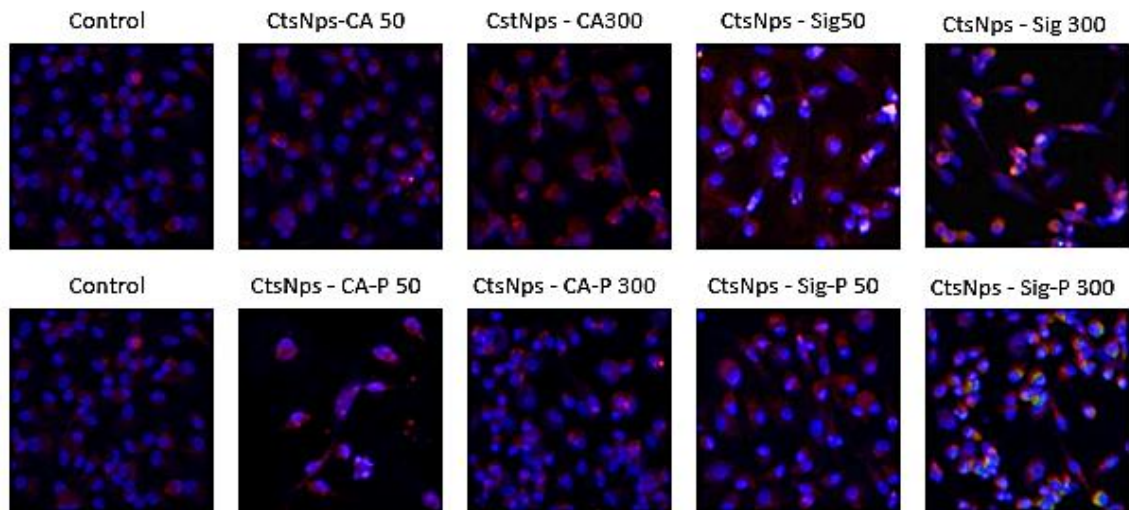


Figura14. **Detección de arginasa e iNOS mediante microscopia confocal en monocitos tratados con CtsNps a concentraciones de 50 y 300µg/mL.** Se observó una mayor producción de iNOS (representado en rojo) en monocitos tratados con CtsNps, en comparación con el grupo control, la producción de iNOS no fue modificada por el CtsNps comercial y purificado, la producción de arginasa (representado en verde) solo se detectó en monocitos tratados con CtsNps – Sig a una concentración de 300µg.

La producción de iNOS se incrementó en los macrófagos que se trataron con CtsNps purificadas, siendo más apreciable este efecto en la concentración de 50µg/mL y en menores cantidades a 300µg/mL, no se detectaron altas cantidades de arginasa en los monocitos tratados con CtsNps, mientras que en el grupo control se detectaron bajas cantidades de iNOS, por lo cual la producción de estas enzimas es dependiente de la concentración del tratamiento.

DISCUSIÓN

Los polisacáridos son los polímeros naturales más versátiles debido al amplio espectro de propiedades químicas, físicas y funcionales que confluyen en los organismos vivos, tales como conferir estructura, almacenar energía y diversas funciones más especializadas, como reconocimiento y adhesión en células eucariotas, señalización, etc. Algunos de estos biopolímeros combinan propiedades fisicoquímicas como la propiedad de formar sistemas tipo hidrogeles, micro y nanopartículas, con propiedades biológicas como la biocompatibilidad y mucoadhesividad que en su conjunto los hacen particularmente atractivos en el área de ingeniería y diseño de materiales para emplearse en ciencias de la salud. De estos materiales, el quitosano es uno de los polímeros que se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos y comercialmente en la manufactura de parches cicatrizantes (Higuera-Ciapara et al., 2007), siendo estos los nichos de mercado de mayor crecimiento en el mundo (Orive, G et al., 2005).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. Además, el carácter policationico le confiere al quitosano una alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas (por ejemplo: insulina, DNA, siRNA, heparina, etc.) y antigénicas, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica (Pastor et al., 2004). En este trabajo se sintetizaron y caracterizaron cuatro tipos de nanopartículas de quitosano (CtsNps), las cuales se obtuvieron de quitosano comercial proveniente de dos casas comerciales (Sigma-Aldrich® y Canada Bioscience), llevándose a cabo un proceso extra de purificación del quitosano, con la finalidad de evaluar su efecto en un cultivo primario de monocitos.

Los dos quitosanos comerciales fueron purificados mediante el proceso de hidrolisis alcalina y posteriormente analizados mediante FT-IR, corroborando esto con el incremento de grupos OH en las muestras purificadas (Qts-CAP y Qts-SigmaP) así como el corrimiento del grupo NH₂ a una menor longitud de onda (Figura 6A y 6B), observándose una mejor definición de la banda debido al proceso químico al cual fueron sometidos las muestras de quitosano (Hernández, E et al., 2009). Los cuatro tipos de CtsNps fueron sintetizadas mediante la técnica de gelación iónica. la cual nos permitió

obtener nanopartículas de quitosano con un tamaño promedio de 120 – 190 nm con un índice de polidispersidad de 0.2, carga superficial catiónica - potencial Z: +3 – +31 mV – (Tabla 3) y forma esférica (Figura 8). Se decidió utilizar este tamaño de nanopartícula debido a que las nanopartículas con tamaños inferiores a 275 nm tienen una mejor absorción en las mucosas, en el tejido epitelial y una mejor distribución en el tráfico intracelular (Panyam, V et al., 2003), demostrando una absorción arterial tres veces mayor en comparación con las nanopartículas más grandes en un modelo de arteria carótida ex vivo (Prabha, S et al., 2002). Permittiéndonos que las nanopartículas de quitosano tuvieran una mejor interacción con los monocitos aislados. Por otra parte, el índice de polidispersidad (PdI) obtenido en el presente trabajo nos demostró que la distribución poblacional de nuestras nanopartículas es de tamaño homogéneo, debido a que se a descrito que las nanopartículas que poseen PdI menores a 0.3 son consideradas como sistemas cuya distribución poblacional es de tamaño homogéneo (Shahrooz Saremi et al., 2011).

Otro de los aspectos que mejoraron la interacción de nuestras CtsNps con los monocitos, fueron las cargas positivas en la superficie de las nanopartículas, siendo una característica ideal para incrementar el grado de interacción entre las nanopartículas y los componentes cargados negativamente presentes en las membranas celulares mediante atracciones electrostáticas, potenciando así el proceso de internalización de componentes exógenos (Jin et al., 2009).

Con la finalidad de comprobar la diferenciación celular de los monocitos tratados con los diferentes tipos de CtsNps, se evaluaron los marcadores de membrana CD11c , CD14, CD80 y CD86, el primero de ellos es una proteína transmembranal de tipo I, tiene altos niveles de expresión en monocitos, granulocitos, células dendríticas, macrófagos y algunas células B; a la vez induce la activación celular (Dyer, KD et al., 2011), mientras que el CD14 actúa como un co-receptor (junto con el TLR-4 y MD-2) para la detección de lipopolisacáridos bacterianos (LPS) y patrones moleculares asociados a patógenos, como el ácido lipoteicoico (Kelley, SL et al., 2013). CD80 y CD86 son marcadores celulares que pertenecen a la familia de proteínas B7 y su acción consiste en la adhesión de las células T con las células presentadoras de antígenos (APCs), siendo moléculas co-

estimuladoras y su interacción con su ligando determinará si el linfocito T responderá frente a los antígenos, se encuentra en diferentes tipos de células, incluyendo células B, macrófagos, CD, etc. (Luque, I et al., 2000).

En el presente estudio los monocitos fueron tratados con dos concentraciones diferentes de CtsNps – 50 y 300 μ g/mL – por un tiempo de 3 días (Figura 10A y 10B), observándose que las CtsNps purificadas (Sig-P y CA-P) a una baja concentración (50 μ g/mL) mostraron un mayor grado de diferenciación, lo anterior se comprobó mediante la disminución en el porcentaje de expresión de CD14 (5%) en comparación con los monocitos no tratados con CtsNps los cuales expresaron una mayor cantidad de CD14 (18%), esto es atribuido a que el CD14 es un marcador de linaje monocítico, el cual conforme se van diferenciando van perdiendo la expresión de dicho marcador, *Buchacher y colaboradores en 2015*, observaron que al cultivar monocitos aislados de sangre periférica y ser expuestos a LPS, obtenían como resultado la diferenciación a macrófagos, los cuales mostraban una disminución del CD14 y una disminución de CD11 en macrófagos M1 y un incremento en macrófagos M2 (Buchacher et al., 2015). Por último, el equipo de trabajo de McNally demostró que, al cultivar monocitos aislados de sangre periférica sobre placas recubiertas con quitosano, se inducía un proceso de diferenciación a macrófago, observando una disminución en la expresión de CD14, CD80 y un incremento en la expresión de CD86 (McNally and Anderson, 2015), correspondiendo lo anterior con nuestros resultados, por lo cual podemos decir que las CtsNps purificadas sintetizadas en este trabajo logran inducir el proceso de diferenciación monocito a macrófago inmaduro de una manera más efectiva en comparación con las CtsNps comerciales.

Para complementar la caracterización de los macrófagos se determinó la liberación de citocinas proinflamatorias para definir el tipo de polarización que se presentó en el macrófago. Los monocitos tratados con las CtsNps purificado presentaron una mayor producción de citocinas en comparación con los monocitos tratados con las partículas comerciales, siendo la IL-1 β , IL-6 y TNF las que se produjeron en mayores cantidades (Figura 11), sin embargo, no tuvieron una alta producción en comparación con el grupo control – el cual fue tratado con LPS, por lo cual podemos decir que las partículas inducen

una respuesta inmunológica primaria sin llegar a desembocar en un perfil proinflamatorio, esto debido a que la citocina mediadora antiinflamatoria (IL-10) presentó una baja producción en los macrófagos tratados con las CtsNps purificadas, esto también fue observable en la IL-12p70, con estos resultados podemos intuir en que el fenotipo obtenido de macrófagos en este estudio pertenece a un macrófago antiinflamatorio o M2, dado que si correspondiera a un macrófago M1, los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF tendrían que estar similares al grupo tratado con LPS, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Buchacher en 2015, quien observó que al obtener un fenotipo de macrófago M1 se obtiene una alta producción de IL-1 β , IL-6, IL-12p70 y TNF, al igual que una regulación a la alta de IL-10 (Buchacher et al., 2015).

Se realizó un ensayo de FITC-dextran (Figura 12) el cual permitió corroborar que las células tratadas con 50 $\mu\text{g/mL}$ de CtsNps purificadas presentaron una disminución en su capacidad fagocítica en comparación con el grupo control a 37°C (células sin tratamiento) y con los macrófagos tratados con 300 $\mu\text{g/mL}$, los cuales presentaron una actividad del 60 y 45% respectivamente, mientras que las CtsNps purificadas (50 $\mu\text{g/mL}$) presentaron una actividad del 35%, esto pudiendo ser un indicador de que la polarización de macrófagos mediante las CtsNps generan macrófagos inmaduros, y un posible fenotipo antiinflamatorio (M2), corroborando lo anterior mediante la baja producción de citocinas proinflamatorias, sin embargo, existen reportes como el de Jiang en 2017 quien determinó que al exponer macrófagos murinos (RAW264.7) a diferentes concentraciones de nanopartículas de quitosano (tamaño de 250 nm) la capacidad fagocítica de estas células disminuye, esto puede atribuirse al tamaño de partícula debido a que la vía de endocitosis mediada por caveolas contribuye principalmente a las partículas con diámetros < 80nm, ya que las vesículas endocíticas caveolar tienen aproximadamente 50 – 80nm de diámetro. Por lo tanto, la endocitosis mediada por clatrina y la fagocitosis se consideran como mecanismos potenciales para la captación de CtsNps (Jiang, Li Qun et al., 2017).

Con todo lo anteriormente mencionado, las CtsNps purificadas podrían implementarse como un inductor de diferenciación, para lograr obtener el tipo de célula presentadora de antígeno que sea requerido para una terapia determinada.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de quitosano proveniente de quitosano purificado, observando que estas nanopartículas presentaron una mayor reactividad en las células en comparación con las nanopartículas obtenidas a partir de quitosano comercial, las cuales fueron capaces de inducir un proceso de diferenciación en los monocitos, siendo la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ la que indujo un mejor efecto.

Las nanopartículas de quitosano purificado (50 $\mu\text{g/mL}$) indujeron a la vez la producción de citocinas como IL-1 β , IL-6 y TNF, sin embargo, estas cantidades no fueron suficientemente altas como para inducir un fenotipo proinflamatorio, esto debido a que los monocitos que se diferenciaron a una célula presentadora de antígeno, posiblemente sea una célula inmadura, razón por la cual la capacidad fagocítica de estas células no se ve incrementada por las nanopartículas de quitosano, sino disminuida.

Finalmente, con este estudio damos a conocer que el quitosano en forma de nanopartícula puede tener funciones diferentes dependiendo del grado de purificación que estas presenten, viendo su mayor efecto en el grado de diferenciación, lo cual nos ayuda a implementarlas como un protocolo de diferenciación de monocitos, llegando a obtener la célula presentadora de antígeno que se requiera.

PERSPECTIVAS

1. Determinar el porcentaje de expresión de los marcadores de diferenciación CD68 y CD83 en monocitos tratados con CtsNps.
2. Realizar cocultivos de macrófagos diferenciados y linfocitos T para evaluar la capacidad de presentar antígeno a células T.
3. Determinar el efecto de las nanopartículas de quitosano purificadas y no purificadas en células endoteliales y fibroblastos.

BIBLIOGRAFIA

1. A.M. Dyer, M. Hinchcliffe, P. Watts, J. Castile, I. Jabbal-Gill, R. Nankervis, A. Smith, L. Illum, Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 19 (7) (2002) 998-1008.
2. Aiba, S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 14: 225-228.
3. Alonso, M.J. & Sanchez, A. (2003) The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 55: 1451-1463.
4. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, Functional Characterization of Chitin and Chitosan, *Current Chemical Biology* 3 (2) (2009) 203-230.
5. Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S.S. & Illum, L. (1994) Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* 11: 1358-1361.
6. Aspden, T.J., Mason, J.D. & Jones, N.S. (1997) Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci.* 86: 509-513.
7. Bernkop-Schnürch, A., Guggi, D. & Pinter, Y. (2004). Thiolated chitosans: development and in vitro evaluation of a mucoadhesive, permeation enhancing oral drug delivery system. *J. Control. Release.* 94: 177-86.
8. Bhumkar, D.R., Joshi, H.M., Sastry, M. & Pokharkar, V.P. (2007) Chitosan reducedgold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharm. Res.* 24: 1415-1426.
9. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2: 907-16.
10. Borges O., Borchard, G., De Sousa, A., Junginger, H.E. & Cordeiro-da-Silva, A. (2007) Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers. *Int. J. Pharm.* 337: 254-264.
11. Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1997) Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63: 125-132.

12. Cheng, Y.; Samia, A.; Meyers, J.; Panagopoulos, I.; Fei, B.; Burda, C. Highly efficient drug delivery with gold nanoparticles vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer. *Journal of American Chemical Society*, 2008, 130, 10643-10647.
13. Colvin, V.; Mittleman, D. *Nanotechnology: The Basics*. Rice University, 2013. <https://class.coursera.org/nanotech-001>.
14. Cummings KL, Tarleton RL. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* 2004; 72: 4081-9.
15. Csaba, N., Garcia-Fuentes, M. & Alonso, M.J. (2006). The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 3: 463-478.
16. De Campos, A.M., Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2001) Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporine A. *Int. J. Pharm.* 224: 159-158.
17. E. Agulló, R. Mato, C. Peniche, C. Tapia, A. Heras, J. San Román, W. Arquélles, F. Goycoolea, A. Mayorga, J. Nakamatsu, A.P. de Abram, Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú, 2004.
18. Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 16: 1576-1581.
19. Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C. & McCarron, P. (2005) Modulation of Surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloid Surface B.* 44: 65-73.
20. Gomez, S.; Gamazo, C.; Roman, B. S.; Vauthier, C.; Ferrer, M.; Irache, J. M. Development of a novel vaccine delivery system based on Gantrez nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2006, 6, 3283–3289.
21. Goerdt S, Orfanos CE. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 1999; 10: 137-42.
22. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 23-35.

23. Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, et al. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand J Immunol* 2001; 53: 386-92.
24. Grenha, A., Seijo, B. & Remuñán-López C (2005) Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25(4/5): 427-434.
25. Guozhong Cao, *Nanostructures & Nanomaterials*, 1era Ed. Imperial College Press. University of Washington, USA, 63 (2004).
26. H.K. No, S.P. Meyers, Application of chitosan for treatment of waste-waters, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 163 (2000) 1-28.
27. Helander, E. Nurmiaho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller, Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 71 (2001) 235-244.
28. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 2001; 167: 6533-44.
29. Hibbs JB Jr. Infection and nitric oxide. *J Infect Dis* 2002; 185: Suppl 1, S9-17.
30. Higuera-Ciapara, I., Toledo-Guillén, A.R. & Goycoolea F.M. (2007) Tendencias en propiedad intelectual y orientación de mercado para la quitina y quitosano. En: Argüelles-Monal W M, Campana S and Mada A, *Proceedings of the IV Iberoamerican Chitin Symposium*. Iberoamerican Chitin Society, Natal, Brasil.
31. Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y. & Nonaka, I. (1990) Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration. En: Gebelein G. G. y Dunn R.L. *Progress in Biomedical Polymers*. Nueva York, Plenum Press, 283- 289.
32. Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, et al. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:13549-54.
33. Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N. & Davis, S.S. (2001). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 51: 81-96.

34. Janes, K.A. & Alonso, M.J. (2003) Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* 88: 2769-2776.
35. Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J.X. & Kissel, T. (2000) Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 147-60.
36. Kim, B.G. & Kang, I.J. (2006) Chitosan nanoparticles for the effective vaccine delivery system. *NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2006. Technical Proceedings.* 2: 388-391.
37. Köping-Hoggard M, Sánchez A, Alonso MJ. Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Rev Vaccines.* 2005;4:185-96.
38. Köping-Höggard, M., Sanchez, A. & Alonso M.J. (2005). Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Rev. Vaccines.* 4: 185-196.
39. Kotze, A. F., Lueßen, H. L., de Leeuw, B. J., de Boer, A. G., Verhoef, J. C. & Junginger, H. E. (1998). Comparison of the effect of different chitosan salts and Ntrimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *J. Control. Release.* 51: 35-46.
40. Kotze, A.F., De Leeuw, B.J. & Luessen, H.L. (1997) Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across the intestinal epithelium: In vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 159: 243-253.
41. Krauland, A.H., Guggi, D. & Bernkop-Schnürch, A. (2004) Oral insulin delivery: the potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetic rats. *J. Control. Release.* 95: 547-555.
42. Laquerriere, P.; Grandjean-Laquerriere, A.; Jallot, E.; Balossier, G.; Frayssinet, P.; Guenounou, M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. *Biomaterials* 2003, 24, 2739–2747.
43. Lee JH, Huh YM, Jun YW, Seo JW, Jang JT, Song HT, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med.* 2007;13:95

44. Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, E.H. & Junginger, H.E. (1992). In-vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. J. Pharm.* 78: 43-48.
45. Loke P, MacDonald AS, Robb A, Maizels RM, Allen JE. Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2669-78.
46. Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M, Allen JE. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol* 2002; 3: 7.
47. López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L. & Bastos-González, D. (2005) Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J. Colloid Interf. Sci.* 283: 344-351.
48. Ma, Z., Lim, T.M. & Lim, L.Y. (2005) Pharmacological activity of peroral chitosan- insulin nanoparticles in diabetic rats. *Int. J. Pharm.* 293: 271-280.
49. Mottram, P. L.; Leong, D.; Crimeen-Irwin, B.; Gloster, S.; Xiang, S. D.; Meanger, J.; Ghildyal, R.; Vardaxis, N.; Plebanski, M. Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: Formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. *Mol. Pharmaceutics* 2007, 4, 73–84.
50. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/ arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1101-4.
51. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 209-12.
52. Nordtveit, R.J., Våurn, K.M. & Smidsrød, O. (1996). Degradation of partially N-acetylated chitosan with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydr. Polym.* 29: 163-167.
53. Orive, G., Carcaboso, A.M., Hernández, R.M., Gascón, A.R. & Pedraz J.L. (2005) Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules. *Biomacromolecules.* 6:927-931.

54. Pan, Y., Li, Y., Zhao, H., Zheng, J., Xu, H., Wei, G., Hao, J. & Cui, F. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 249: 139-147.
55. Pastor, A. (2004) *Quitina y Quitosano. Obtención, Caracterización y Aplicaciones.* Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima, Perú.
56. Peluso, G., Petillo, O., Ranieri, M., Santin, M., Ambrosia, L., Calabró, D., Avallone, B. & Balsamo, G (1994). Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials.* 15: 1215-1220.
57. Porporatto, C., Bianco, I.D. & Correa, S.G. (2005) Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. *J. Leukocyte Biol.* 78: 62-69.
58. Prego, C., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) The potential of chitosan for the oral administration of peptides. *Expert Opin. Drug Del.* 2: 843-854.
59. Roncal, T., Oviedo, A., López de Armentia, I., Fernández L. & Villarán, M.C. (2007) High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. *Carbohydr. Res.* 342: 2750-2756.
60. S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan based micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Controlled Release* 100 (2004).
61. Saefel M, Fleischer B, Hoerauf A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 2001; 69: 2252-9.
62. Saito, H., Wu, X., Harris, J. M. & Hoffman, A. S. (1997) Graft copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and chitosan. *Macromol. Rapid Commun.* 18: 547-50.
63. Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2006) Nanoparticulate carriers for ocular drug delivery' in Torchilin V, *Nanoparticles as Drug Carriers*, London World Scientific-Imperial College Press, 649-674.
64. Schebesch C, Kodelja V, Muller C, et al. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. *Immunology* 1997; 92: 478-86.

65. Schipper, N.G.M., Olsson, S., Hoostraate, A.J., De Boer, A.G., Vårum, K.M. & Artursson, P. (1997) Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.* 14: 923-929.
66. Shruti, C., Saiqa, M., Jasjeet, K., Zeemat, I. & Sushma, T. (2006). Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 1021-1032.
67. Singla, A.K. & Chawla, M. (2001) Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53(8): 1047-1067.
68. Smith, J., Wood, E. & Dornish, M. (2004) Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm. Res.* 21: 43-49.
69. Storni, T.; Kündig, T. M.; Senti, G.; Johansen, P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57, 333–355.
70. Thanou, M., Verhoef, J. C., Verheijden, J. H. M. & Junginger, H. E. (2001). Intestinal Absorption of Octreotide Using Trimethyl Chitosan Chloride: Studies in Pigs. *Pharm. Res.* 18: 823-828.
71. Valdivia Uriac JG, Ibarra García MR, Fernández Pacheco R, Vilorio A, Higuera T, Laborda A, et al. Estudio experimental sobre quimioterapia focalizada en riñón mediante campo magnético y administración intravenosa de nanopartículas ferrocarrónicas. *Arch Esp Urol.* 2007;60:5-14.
72. van der Merwe, S. M., Verhoef, J. C., Verheijden, J. H. M., Kotze, A. F. & Junginger, H. E. (2004) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58: 225-235.
73. Vandevord, P.J., Matthew, H.W.T., Desilva, S.P., Mayton, L., Wu, B. & Wooley, P.H. (2002) Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J. Biomed. Mat. Res.* 59(3): 585-590.
74. Vicent MJ, Duncan R. Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol.* 2006;24:39-47.
75. Vila, A., Sánchez, A., Janes, K.A., Behrens, I., Kissel, T., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (2004). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57: 123-131.

76. Welch JS, Escoubet-Lozach L, Sykes DB, Liddiard K, Greaves DR, Glass CK. TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2002; 277: 42821-9
77. Xu, Y. & Du, Y. (2003) Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 250: 215-226.
78. Zaharoff, D.A., Rogers, C.J., Hance, K.W., Schlom, J. & Greiner, J.W. (2007) Chitosan solution enhances the immunoadjuvant properties of GM-CSF. *Vaccine*. 25: 8673-8686.
79. Zhang, H., Oh, M., Allen, C. & Kumacheva, E. (2004) Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacromolecules*. 5: 2461-2468.
80. Jin H, Heller DA, Sharma R, Strano MS. (2009). Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: Single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *Am Chem Soc Nano* 3: 149-158.
81. Shahrooz Saremi, Fatemeh Atyabi, Seyedeh Parinaz Akhlaghi, Seyed Nasser Ostad and Rassoul Dinarvand. Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel: preparation, in vitro and ex vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 119-128.
82. Buchacher, T., Ohradanova-Repic, A., Stockinger, H., Fischer, M. B., & Weber, V. (2015). M2 polarization of human macrophages favors survival of the intracellular pathogen chlamydia pneumoniae. *PLoS ONE*, 10(11), 1–16.
83. Jiang, L. Q., Wang, T. Y., Webster, T. J., Duan, H. J., Qiu, J. Y., Zhao, Z. M., ... Zheng, C. L. (2017). Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: Intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 6383–6398.