



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**CARACTERIZACIÓN Y EFECTO CITOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANOS MODIFICADOS
HIDROFÓBICAMENTE SOBRE CÉLULAS HeLa Y
MDA-MB-231.**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

MARIO EDUARDO ALMADA ORTIZ

Hermosillo, Sonora, México

Septiembre de 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**CARACTERIZACIÓN Y EFECTO CITOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANOS MODIFICADOS
HIDROFOBICAMENTE SOBRE CELULAS HeLa Y MDA-
MB-231.**

T E S I S

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOCENCIAS
presenta:**

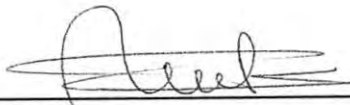
MARIO EDUARDO ALMADA ORTIZ

Hermosillo, Sonora.

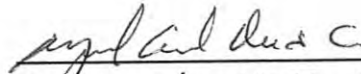
Septiembre del 2013.

APROBACIÓN

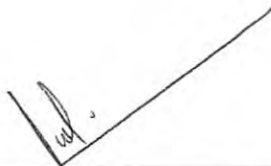
Los Miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada: Caracterización y efecto citotóxico de nanopartículas de quitosanos modificados hidrofóbicamente sobre células HeLa y MDA-MB-231, presentada por **Mario Eduardo Almada Ortiz**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias con especialidad en Biociencias Moleculares.



Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta
Co-Director de tesis



Dr. Miguel Ángel Valdes Covarrubias
Co-Director de tesis



Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán
Sinodal



Dr. Josué Elías Juárez Onofre
Sinodal



Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuru
Sinodal Externo

DEDICATORIA

A mi esposa y mi hijo, quienes son los motores de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo externar mi profundo agradecimiento al Dr. Miguel Ángel Valdés por dirigir mi tesis de maestría, por todos sus consejos, por su apoyo tanto en lo académico como en lo personal, por su disponibilidad, por su alto grado de compromiso como mi director de tesis y por todas sus atenciones hacia mi persona.

Al Dr. Josué Elías Juárez por todo su apoyo a lo largo del desarrollo de toda la parte experimental, tanto en las cuestiones técnicas como teóricas, por su disponibilidad y por todos sus consejos. Agradezco también al Dr. Emmanuel Robles Ávila por sus consejos y su ayuda en la preparación y caracterización de los quitosanos derivatizados. A mis compañeros Hiessu García y Alfonso García por su valioso apoyo en el manejo de cultivos celulares.

A la Dra. María Guadalupe Burboa y al Dr. Luis Enrique Gutiérrez por permitirme trabajar en sus laboratorio y darme la facilidad de utilizar los equipos de los que ellos disponen, así como de su asesoría para lograr desarrollar este trabajo de la manera más adecuada. A la Dra. Irasema Vargas por sus valiosas aportaciones académicas a este trabajo.

A mis padres, sin los cuales yo no podría haber llegado hasta estas instancias, a mi esposa y a mi hijo por su compañía y su amor.

Finalmente agradezco al CONACyT por el apoyo económico brindado a través de la beca de maestría y por los apoyos recibidos por parte del proyecto de investigación con número de registro 151794. Así mismo, extiendo mi agradecimiento al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas y a la Universidad de Sonora por la formación recibida.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
I Introducción.....	1
II Antecedentes.....	3
2.1 Generalidades del cáncer.....	3
2.2 Tratamiento.....	4
2.3 Nanovectores como alternativa emergente para el tratamiento del cáncer.....	5
2.4 Nanopartículas de quitosano como sistemas de liberación controlada.....	10
2.4.1 Generalidades del quitosano.....	10
2.4.2 Nanopartículas de quitosano.....	12
2.4.3 Actividad anticancerígena del quitosano.....	15
2.4.4 Endocitosis de nanopartículas de quitosano.....	17
2.5 Estudio de la interacción nanopartículas-membrana celular con un modelo de membrana	18
III Objetivos.....	22
General.....	22
Particulares.....	22
IV Materiales y Métodos.....	23
4.1 Modificación Hidrofóbica del quitosano.....	23
4.1.1 Caracterización de los quitosanos derivatizados.....	23
4.1.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo.....	23

4.1.1.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹ H).....	24
4.2 Asociación de fluoresceína al quitosano.....	24
4.3 Preparación de nanopartículas.....	24
4.4 Caracterización de nanopartículas.....	24
4.4.1 Medición del tamaño y potencial zeta de las nanopartículas.....	24
4.4.2 Imágenes de Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	25
4.5 Interacción de nanopartículas con un modelo de membrana en la interface aire-agua.....	25
4.5.1 Obtención de isothermas.....	25
4.5.2 Adsorción de las nanopartículas en el modelo de membrana.....	25
4.6 Ensayos con cultivos celulares.....	26
4.6.1 Condiciones de cultivo.....	26
4.6.2 Ensayos citotóxicos.....	26
4.6.3 Imágenes de microscopía de fluorescencia.....	26
4.7 Análisis estadístico.....	27
V Resultados y Discusiones.....	28
5.1 Caracterización de los quitosanos derivatizados.....	28
5.1.1 Espectros de Infrarrojo.....	28
5.1.2 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹ H).....	29
5.2 Caracterización de las nanopartículas.....	31
5.2.1 Tamaño de nanopartículas.....	31

5.2.2 Potencial zeta.....	37
5.2.3 Morfología de nanopartículas.....	39
5.3 Interacción de nanopartículas con el modelo de membrana en la interface aire-agua.....	39
5.4 Imágenes de microscopia de florescencia.....	44
5.5 Efecto citotóxico de las nanopartículas.....	49
VI Conclusiones.....	53
VII Recomendaciones.....	55
VIII Literatura citada.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Micrograffias electrónicas representativas de vasos sanguíneas tumorales, A) Vasos sanguíneos de tamaño venular con grandes espacios intercelulares en el endotelio (Barra= 500 nm) B) vaso sanguíneo tumoral con espacio intercelular de 856 nm (Barra=500 nm) C) abertura endotelial, se observan dos liposomas atravesándola (Barra=300 nm)	7
2	Representación esquemática el transporte pasivo y activo de nanovectores de fármacos quimioterapéuticos hacia los tejidos tumorales	8
3	Tipos de nanovectores para la liberación controlada de fármacos. A) Nanopartículas poliméricas en las cuales el fármaco es conjugado o encapsulado. B) Micelas poliméricas: copolímeros de bloque anfífilicos que forman nanoestructuras con un núcleo hidrofóbico en solución acuosa, este sirve como reservorio para fármacos hidrófobos mientras la parte hidrofílica del copolímero le confiere solubilidad en agua. C) Dendrimeras: macromoléculas poliméricas sintéticas de dimensiones nanométricas compuestas de múltiples monómeros que emergen radialmente de un núcleo central. D) Liposomas: Estructuras autoensambladas compuestas de una bicapa lipídica con un volumen acuoso en el centro. E) Nanopartículas virales: estructuras proteicas de cápsides virales. F) Nanotubos de carbón: cilindros de carbono compuesto de anillos de benceno	9
4	Estructura de la celulosa, la quitina y el quitosano	11
5	Esquema de formación de nanopartículas mediante el método de gelificación inotrópica	13
6	Representación esquemática a) de la balanza de Langmuir y b) de una típica isoterma presión-área (la presión superficial y el área por molécula están en unidades arbitrarias (u.a.))	20
7	Representación esquemática que muestra la penetración de moléculas en una monocapa lipídica	21
8	Espectros infrarrojo de a) quitosano sin modificación (Ch), b) quitosano modificado al 10 % (ChA) y c) quitosano modificado al 30 % (ChB).	29

FIGURA		PÁGINA
9	Espectros $^1\text{H-RMN}$ de a) quitosano sin modificación (Ch), b) quitosano modificado al 10 % (ChA) y c) quitosano modificado al 30 % (ChB).	30
10	Graficas representativas de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de Ch, ChA y ChB suspendidas en agua deionizada.	33
11	Graficas representativas de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de Ch, ChA y ChB suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4).	34
12	Graficas representativas de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de FCh, FChA y FChB suspendidas en agua deionizada.	35
13	Graficas representativas de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de FCh, FChA y FChB suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4).	36
14	Graficas representativas de la distribución del potencial zeta de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB en suspendidas en 1) Agua deionizada (pH~6) o 2) en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4).	38
15	Graficas representativas de la distribución del potencial zeta de las nanopartículas de FCh, FChA y FChB en suspendidas en 1) Agua deionizada (pH~6) o 2) en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4).	38
16	Imágenes de microscopia de fuerza atómica de nanopartículas de de a) quitosano sin modificación (Ch), b) quitosano modificado al 10 % (ChA) y c) quitosano modificado al 30 % (ChB).	40
17	Isotermas presión-área ($\pi - A$) de la monocapa de DPPC en la subfase pura o con la presencia de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB.	41
18	Cambio de presión de la monocapa de DPPC después de la inyección de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB. (La presión inicial de la monocapa fue de 25 mN/m).	43

FIGURA		PÁGINA
19	Imágenes de microscopía de Fluorescencia de las células Arpe-19 después de 4 horas de incubación con las nanopartículas fluorescentes (A) antes y (B) después de incubarlas con una solución de azul de tripan (400 µg/ml). A1 y B1) FCh, A2 y B2) FChA, A3 y B3) FChB.	46
20	Imágenes de microscopía de Fluorescencia de las células HeLa después de 4 horas de incubación con las nanopartículas fluorescentes (A) antes y (B) después de incubarlas con una solución de azul de tripan (400 µg/ml). A1 y B1) FCh, A2 y B2) FChA, A3 y B3) FChB.	47
21	Imágenes de microscopía de Fluorescencia de las células MDA-MB-231 después de 4 horas de incubación con las nanopartículas fluorescentes (A) antes y (B) después de incubarlas con una solución de azul de tripan (400 µg/ml). A1 y B1) FCh, A2 y B2) FChA, A3 y B3) FChB.	48
22	Efecto citotóxico de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB sobre las líneas celulares a) Arpe-19, b) HeLa y c) MDA-MB231.	50

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
1	Tamaño y potencial zeta promedio de los diferentes tipos de nanopartículas suspendidas en Agua deionizada (pH~6) o en solución amortiguadora de Fosfatos 10 mM (pH=7.4), promedio de tres repeticiones independientes	32

RESUMEN

En este trabajo se investigó el efecto de la hidrofobización del quitosano sobre la internalización y citotoxicidad de nanopartículas de quitosano, ambos procesos fueron evaluados sobre células de cáncer de mama (MDA-MB-231), células de cáncer cervicouterino (HeLa) y células no cancerosas (Arpe-19). También se analizó la interacción de las nanopartículas con un modelo de membrana de fosfolípidos (DPPC) en la interface aire-agua. Se realizó un proceso de alquilación para insertar cadenas de 8 carbonos a lo largo de la macromolécula de quitosano obteniéndose un grado de sustitución de 10 y 30 %. Se utilizó Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN) y espectroscopia de infrarrojo (IR) para evaluar el éxito del proceso de alquilación. El tamaño, la forma, y la carga de las nanopartículas se evaluaron mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y potencial zeta, respectivamente. El efecto de la hidrofobicidad sobre las nanopartículas fue la formación de estructuras ligeramente elongadas y el potenciamiento de la interacción de las nanopartículas con las monocapas de DPPC en la interfase aire-agua. Usando microscopía de fluorescencia se observó que las nanopartículas de quitosanos hidrofóbicos no fueron internalizadas por las células no cancerosas pero si por las dos células cancerosas. A pesar de que las nanopartículas de quitosano no modificadas fueron internalizadas por los tres tipos de células, aquellas construidas a partir de los quitosanos modificados mostraron un efecto citotóxico significativamente más alto. El efecto citotóxico sobre las células no cancerosas usadas fue bajo para los tres tipos de nanopartículas probadas.

ABSTRACT

In this work, we investigate the effect of chitosan hydrophobization on the internalization and cytotoxic effect of chitosan-based nanoparticles on breast cancer cells (MDA-MB-231), cervical cancer cells (HeLa) and non-cancer cells (Arpe-19). We also analyzed the interaction of NPs with a phospholipid (DPPC) membrane model at the air-water interface. An alkylation procedure to insert 8 carbon chains along the chitosan macromolecule with final 10 and 30 % substitution degrees was used. Nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared spectroscopies (IR) were used to evaluate the success and extent of the hydrophobization procedure. Size, shape, and charge of NPs were evaluated by dynamic light scattering (DLS), atomic force microscope (AFM), and zeta potential, respectively. The effect of hydrophobicity on NPs was the formation of slightly elongated structures and the enhancing of the interaction of NPs with a DPPC monolayer at the air-water interface. By using fluorescence images on fluorescein-chitosan NPs, we observed a higher internalization of hydrophobic chitosan NPs in cancer cells in comparison with a low internalization of these NPs in normal cells. Even when non modified chitosan nanoparticles were highly internalized in all cell lines, hydrophobized chitosan nanoparticles showed a significantly higher cytotoxic effect on cancer cells in comparison with a lower effect showed by non-modified chitosan NPs on these cells. The cytotoxic effect on the normal cell line used was low for three sorts of nanoparticles used.

I INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial debido a sus altos índices de mortalidad (Boyle y Levin, 2008). La quimioterapia sigue siendo una de las principales alternativas para el tratamiento de pacientes con cáncer, sin embargo, su eficacia se ve limitada debido a que los fármacos utilizados presentan una serie de efectos adversos dada su nula selectividad (Feng y Chien, 2003; Tan *et al.*, 2009). Otra deficiencia encontrada durante la quimioterapia está relacionada con la farmacocinética y la biodisponibilidad de los medicamentos administrados; después de la administración de los quimioterapéuticos hay un incremento brusco de los niveles de estos en el cuerpo, seguido por una rápida disminución, esto da como resultado fuertes efectos adversos al principio y posteriormente insuficiencia terapéutica (Hryniuk, 1987). Además, aun cuando los niveles de los fármacos en el cuerpo son elevados, la concentración de estos en el sitio del tumor es, de cualquier manera, inadecuada, esto hace necesaria la aplicación de dosis más altas con un aumento concomitante de los efectos adversos (Sinha *et al.*, 2006).

El uso de nanopartículas como sistemas de liberación controlada de quimioterapéuticos ofrece una novedosa alternativa para superar estas limitaciones. Este tipo de sistemas explotan, entre otras cosas, la arquitectura defectuosa de los vasos sanguíneos presentes en los tumores sólidos, esto provoca un aumento en la permeabilidad vascular en ese sitio; además, los tejidos tumorales carecen de un sistema linfático funcional, esto impide la eliminación adecuada de macromoléculas que pueden estar presentes en el espacio intersticial del tumor. Todo esto da como resultado una distribución selectiva de las nanopartículas hacia los tejidos tumorales mejorando la biodistribución de los fármacos transportados (Peer *et al.*, 2007).

El quitosano es un candidato ideal para ser usado como sistema de liberación controlada debido a sus características fisicoquímicas. Es un polímero lineal compuesto de monómeros de glucosamina y N-acetilglucosamina unidos por enlaces β (1-4). El quitosano es obtenido a partir de la desacetilación parcial de la quitina, un polisacárido natural encontrado en el exoesqueleto de crustáceos tales como cangrejos y camarones (Patel *et al.*, 2010). Se ha reportado que el quitosano posee actividad proapoptótica sobre ciertas líneas celulares

cancerosas (Hasegawa *et al.*, 2001; Takimoto *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008) y que quitosanos con cierto grado de hidrofobicidad son más citotóxicos (Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2011).

El uso de quitosanos modificados hidrofóbicamente para preparar nanopartículas potencialmente podrían mejorar la eficiencia de asociación y la cinética de liberación de ciertos fármacos anticancerígenos, este comportamiento ya ha sido reportado, por ejemplo, en el caso de la insulina (Robles *et al.*, 2012). Además, dichas modificaciones hidrofóbicas podrían aumentar el efecto citotóxico de las nanopartículas preparadas a partir de esos quitosanos derivatizados y de esa manera hipotéticamente actuar de manera sinérgica con las moléculas cargo aumentando su eficacia antitumoral.

Una vez las nanopartículas, utilizadas como sistemas de liberación controlada de quimioterapéuticos, alcanzan el sitio del tumor vía el direccionamiento pasivo como resultado del potenciamiento del efecto de permeabilidad y retención (efecto EPR por sus siglas en inglés), estas pueden liberar las moléculas cargo en el espacio extracelular o pueden ser endocitadas por las células tumorales con la potencial liberación de los fármacos en el citoplasma. Por esto es importante caracterizar de qué manera interactúan las nanopartículas con las células y en particular con las membranas celulares para tener un entendimiento más completo del comportamiento de dichas nanopartículas cuando sean utilizadas como sistemas de liberación de quimioterapéuticos (Peetla *et al.*, 2009; Iversena *et al.*, 2011).

Por otro lado, la complejidad de las membranas celulares hace difícil el estudio de las interacciones físicas, químicas y biológicas entre estas y medicamentos o sistemas de liberación controlada. Sin embargo, tales estudios se pueden facilitar mediante la obtención *in vitro* de bicapas lipídicas que mimeticen una membrana biológica. Estos modelos de membrana incluyen, entre otros, a las monocapas lipídicas formadas utilizando la balanza de Langmuir (Dynarowicz *et al.*, 2001).

El objetivo de este trabajo consiste en desarrollar nanopartículas preparadas a partir de quitosanos derivatizados con cadenas alquilo de 8 carbonos con diferentes grados de sustitución para evaluar el efecto citotóxico sobre células cancerosas y su interacción con un modelo de membrana en la interfase aire-agua.

II ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del cáncer.

El término cáncer, desde el punto de vista médico, hace referencia a una serie de enfermedades complejas que comparten ciertas características entre sí, en particular a nivel celular. Hay más de 100 distintos tipos de cáncer y se pueden encontrar diferentes subtipos dentro de ellos, sin embargo, todos ellos se caracterizan por una proliferación descontrolada de células inmortales que adquieren la capacidad para diseminarse a cualquier parte del cuerpo y producir tumores secundarios (Boyle y Levin, 2008).

El vasto catálogo de tipos de cáncer que se presentan, básicamente, comprende la manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que, de manera colectiva, determinan el crecimiento anormal de células para formar tumores malignos. 1) Las células cancerosas no requieren señales de crecimiento exógenas para pasar de un estado quiescente a un estado proliferativo activo, es decir, son autosuficientes para producir sus propias señales de crecimiento. 2) Las células cancerosas son insensibles a las señales externas que detienen el crecimiento, muchos o quizá todos los tipos de cáncer presentan alteraciones en alguna parte de la vía de regulación de la proteína retinoblastoma (pRB) que a su vez regula la función del factor de transcripción E2F, el cual es esencial para la expresión de múltiples genes involucrados en la transición de la fase G1 a la fase S en el ciclo celular. 3) Las células cancerosas son capaces de evadir la apoptosis, cerca del 50 % de los tipos de cáncer humanos presentan mutaciones en el gen supresor de tumores p53, el cual es un regulador proapoptótico que desencadena la apoptosis ante daños irreparables en el ADN. 4) Las células cancerosas pueden proliferar de manera ilimitada dado que han superado lo que se conoce como senescencia celular, el mecanismo principal que se presenta es la sobreexpresión de la enzima telomerasa. 5) Las células cancerosas tienen la capacidad para secretar moléculas que promueven la formación de vasos sanguíneos en la región del tumor. 6) Las células cancerosas pueden desprenderse del tumor primario e introducirse en el torrente sanguíneo o en el sistema linfático para posteriormente migrar a eventualmente cualquier parte del cuerpo y producir

tumores secundarios, este proceso es conocido como metástasis y es el causante del 90 % de las muertes por cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

La organización mundial de la salud estimó que en el año 2008 cerca de 12.4 millones de personas fueron diagnosticadas con algún tipo de cáncer y en ese mismo año 7.6 millones de personas murieron por esta causa. Además se espera que para el 2030 se detecten 20 millones de casos y 12.9 personas mueran por algún tipo de cáncer si el índice de incidencia anual no cambia. Estas cifras sitúan al cáncer como uno de los problemas de salud más importantes en el mundo con una alta incidencia pero, sobre todo, con índices de mortalidad muy elevados (Boyle y Levin, 2008).

2.2 Tratamiento.

Posiblemente uno de los factores determinantes para que los índices de mortalidad de pacientes con cáncer sean tan elevados es que no se cuenta con los tratamientos lo suficientemente eficaces para combatir la enfermedad. A pesar de los importantes avances en este campo, como el aumento del arsenal terapéutico y el desarrollo de regímenes de tratamiento más adecuados con una subsecuente disminución de la mortalidad, el problema sigue siendo básicamente el mismo, la amplia gama de efectos secundarios que presentan los tratamientos disponibles limita mucho la dosis que puede ser administrada y por lo tanto disminuye su eficiencia terapéutica (Praetorius y Mandal, 2007).

Actualmente se cuenta con dos herramientas terapéuticas esenciales para el tratamiento del cáncer; la radioterapia y la quimioterapia, ambas limitadas por la cuestión descrita en el párrafo anterior. La remoción quirúrgica del tumor seguida por radioterapia o quimioterapia para eliminar las células cancerosas remanentes es el régimen de tratamiento más utilizado y con mejores resultados en muchos tipos de tumores (Tan *et al.*, 2009).

El problema del cáncer se ha abordado desde diferentes perspectivas, unas meramente mercadotécnicas como la promoción para el desarrollo de una cultura que permita el diagnóstico temprano del cáncer, esto es de particular importancia en el caso del cáncer de mama, cervicouterino y de próstata. En el ámbito científico se está investigando con el objetivo de desarrollar técnicas que permitan mejorar el diagnóstico, sobre todo en etapas

tempranas, las técnicas de diagnóstico molecular son un ejemplo de ello; se han buscado nuevos compuestos que puedan ser utilizados como quimioterapéuticos que no sean tan agresivos contra los tejidos normales, los ensayos biodirigidos utilizando plantas y organismos marinos como fuente de estos compuestos son abundantes en la literatura (Marchiò y Reis-Filho, 2008; Merina *et al.*, 2012).

Otra de las estrategias para mejorar el tratamiento contra el cáncer es la modificación de los compuestos quimioterapéuticos actuales para aumentar su eficiencia así como disminuir sus efectos adversos. La nanotecnología ofrece un panorama bastante alentador en este respecto, el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos utilizando complejos nanoestructurados presenta una serie de ventajas, incluyendo una mejor biodistribución con una subsecuente disminución de los efectos adversos de dichos fármacos (Peer *et al.*, 2007).

2.3 Nanovectores como alternativa emergente para el tratamiento del cáncer.

Los agentes quimioterapéuticos convencionales, generalmente administrados vía intravenosa, se distribuyen en todo el cuerpo del paciente tratado y esto tiene dos implicaciones importantes; por un lado, la concentración del fármaco en el sitio del tumor es muy baja, y por otro, la poca o nula selectividad celular provoca una serie de efectos adversos y toxicidad sistémica. Lo primero hace necesaria la administración del fármaco en cantidades bastante grandes para permitir que la concentración en el sitio del tumor sea adecuada, pero lo segundo limita la cantidad de fármaco que puede ser administrada (Sinha *et al.*, 2006).

La administración de los fármacos quimioterapéuticos a través de complejos nanoestructurados provee una manera de superar las limitaciones de los fármacos administrados de manera libre, las características fisicoquímicas de estos complejos y las condiciones fisiológicas propias del tejido tumoral, provocan una mejora significativa en la biodistribución de los fármacos con una subsecuente disminución de los efectos adversos y la toxicidad sistémica (Brigger *et al.*, 2002).

Los vasos sanguíneos presentes en tumores sólidos, a diferencia de los que se encuentran en tejidos normales, poseen una arquitectura defectuosa con espacios intercelulares más grandes de lo normal, es decir, estos vasos sanguíneos son porosos, esto provoca un aumento en la

permeabilidad vascular; además, los tejidos tumorales carecen de un sistema linfático funcional, situación que impide la eliminación adecuada de macromoléculas que pueden estar presentes en el espacio intersticial del tumor. Se ha reportado que el tamaño efectivo de los poros en el endotelio vascular en muchos tumores sólidos es de entre 200 y 900 nm; en la Figura 1 se observan tres micrografías electrónicas representativas de vasos sanguíneos tumorales (Hobbs *et al.*, 1998; Maeda, 2001; Torchilin, 2007).

Cuando partículas de un tamaño del orden de la longitud de los poros reportados en la vasculatura de tumores sólidos son administradas vía intravenosa y permanecen en el torrente sanguíneo el tiempo suficiente, estas tenderán a acumularse de manera pasiva en el espacio intersticial del tumor debido a su imposibilidad de atravesar la barrera endotelial de vasos sanguíneos de tejidos sanos donde los espacios inter-endoteliales tienen un tamaño efectivo de 6-7 nm; además, debido a la carencia de un drenaje linfático adecuado en el sitio del tumor, dichas partículas aumentarán su concentración en ese lugar (Figura 2). En general, muchas partículas poliméricas se acumulan en tejidos tumorales a concentraciones de 5 a 10 veces más altas que las concentraciones en el plasma 24 horas después de la inyección intravenosa y, frecuentemente a niveles 10 veces más altos que en tejidos normales. Este fenómeno se conoce como el potenciamiento del efecto de permeabilidad y retención (EPR, por sus siglas en inglés) (Hobbs *et al.*, 1998; Maeda, 2001).

Es aquí donde la nanotecnología encuentra un importante campo de aplicación a la medicina. El desarrollo de sistemas de liberación controlada de quimioterapéuticos de un tamaño del orden de los nanómetros ha sido el objeto del esfuerzo de un sinnúmero de investigadores en las últimas décadas y, como resultado se han obtenido una serie de complejos de este tipo como liposomas, micelas y nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbón, dendrímeros, nanopartículas virales, entre otros (Figura 3). Además del transporte pasivo de estos nanovectores hacia los tejidos tumorales proporcionado por el efecto EPR, estos sistemas pueden ser funcionalizados con diversos ligandos específicos para receptores que comúnmente se sobreexpresan en células cancerosas y de esta manera proveerles una mayor selectividad hacia este tipo de células. Esto se conoce en la literatura científica como transporte activo (Figura 2), y existen abundantes reportes del uso de moléculas como ciertos

anticuerpos monoclonales o moléculas como la transferrina o el ácido fólico con este propósito (Peer *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2008).

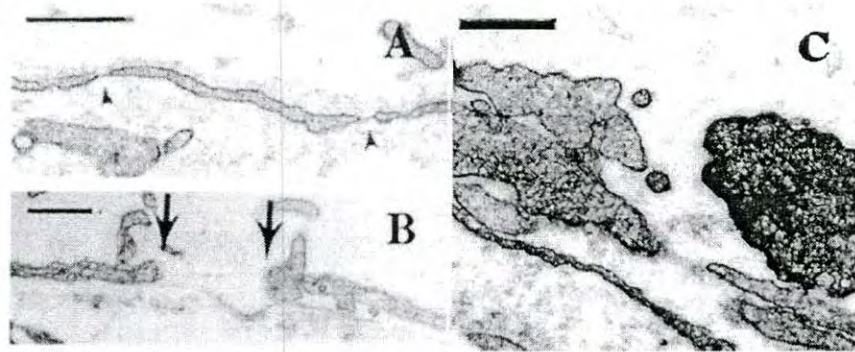


Figura 1. Micrografías electrónicas representativas de vasos sanguíneos tumorales, A) Vasos sanguíneos de tamaño venular con grandes espacios intercelulares en el endotelio (Barra= 500 nm) B) vaso sanguíneo tumoral con espacio intercelular de 856 nm (Barra=500 nm) C) abertura endotelial, se observan dos liposomas atravesándola (Barra=300 nm) (Hobbs *et al.*, 1998).

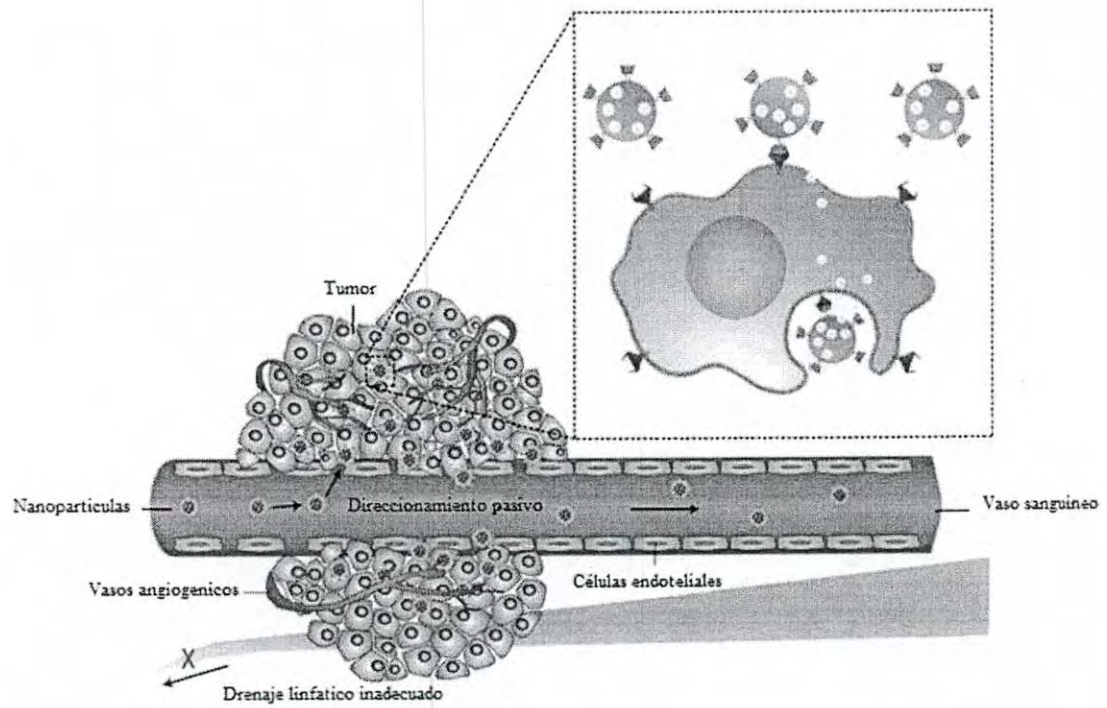


Figura 2. Representación esquemática el transporte pasivo y activo de nanovectores de fármacos quimioterapéuticos hacia los tejidos tumorales (Peer *et al.*, 2007).

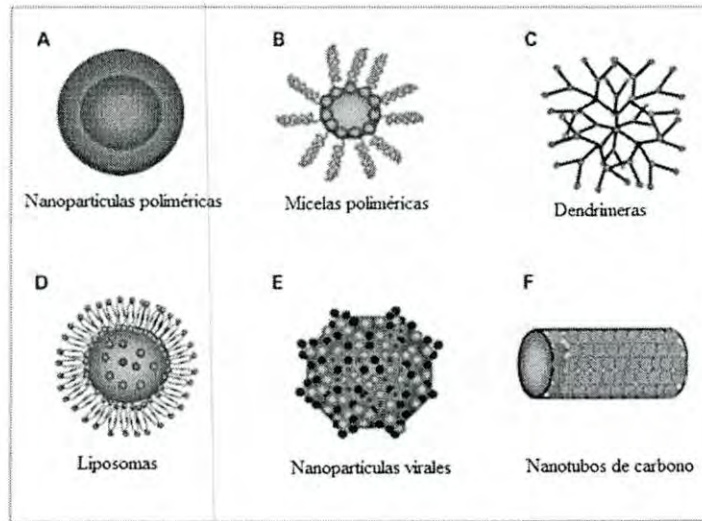


Figura 3. Tipos de nanovectores para la liberación controlada de fármacos. A) Nanopartículas poliméricas en las cuales el fármaco es conjugado o encapsulado. B) Micelas poliméricas: copolímeros de bloque anfífilicos que forman nanoestructuras con un núcleo hidrofóbico en solución acuosa, este sirve como reservorio para fármacos hidrófobos mientras la parte hidrofílica del copolímero le confiere solubilidad en agua. C) Dendrimeras: macromoléculas poliméricas sintéticas de dimensiones nanométricas compuestas de múltiples monómeros que emergen radialmente de un núcleo central. D) Liposomas: Estructuras autoensambladas compuestas de una bicapa lipídica con un volumen acuoso en el centro. E) Nanopartículas virales: estructuras proteicas de cápsidas virales. F) Nanotubos de carbono: cilindros de carbono compuesto de anillos de benceno (Cho *et al.*, 2008).

2.4 Nanopartículas de quitosano como sistemas de liberación controlada.

2.4.1 Generalidades del quitosano

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza solo superado por la celulosa, está compuesto por N-acetilglucosaminas unidas por enlaces β (1-4), es obtenida principalmente del exoesqueleto de crustáceos, estructuralmente es idéntica a la celulosa excepto por la presencia del grupo acetoamida (-NHCOCH₃) en la posición C2 del anillo de piranosa. El quitosano es obtenido a partir de la desacetilación parcial de la quitina y comprende a una familia de copolímeros formados por los monómeros N-acetilglucosamina y glucosamina (Figura 4), el porcentaje de monómeros de glucosamina con respecto al total de monómeros del polímero es referido como el porcentaje o el grado de desacetilación; en términos generales se considera como quitosano a los polímeros que poseen un porcentaje de desacetilación mayor al 50 % (Dutta *et al.*, 2004; Shaji *et al.*, 2010).

La quitina es altamente hidrofóbica y por lo tanto insoluble en agua, el quitosano es hidrosoluble dependiendo del pH de la solución. El quitosano presenta características de un polication y posee grupos aminos muy reactivos, lo cual le da una mayor versatilidad que la quitina; también posee una serie de propiedades biológicas que lo hacen un candidato ideal para ser utilizado en aplicaciones biomédicas, es biocompatible, biodegradable a constituyentes que normalmente se encuentran en el cuerpo humano, se adhiere de manera agresiva a membranas celulares y bacterianas, posee actividad antibacteriana, antifúngica y antitumoral (Dutta *et al.*, 2004).

El quitosano es degradado por una serie de enzimas que se encuentran en el cuerpo humano tales como lisosima, di-N-Acetilquitobiasa, N-Acetil-beta-glucosaminidasa y quitotriosidasa. Estudios recientes en conejos y perros han mostrado que los signos de toxicidad inician a dosis por arriba del rango de 5-50 mg/Kg/día cuando es administrado vía inyección subcutánea, por otro lado, se observaron mínimos efectos tóxicos cuando el quitosano fue administrado vía oral a dosis entre 1-15 g/Kg /día en modelos de ratas y ratones durante un periodo mayor a 3 meses. Además, dosis orales de hasta 6.75 g/día han sido administradas vía oral en humanos voluntarios sin efectos clínicos relevantes (García-Fuentes y Alonso, 2012).

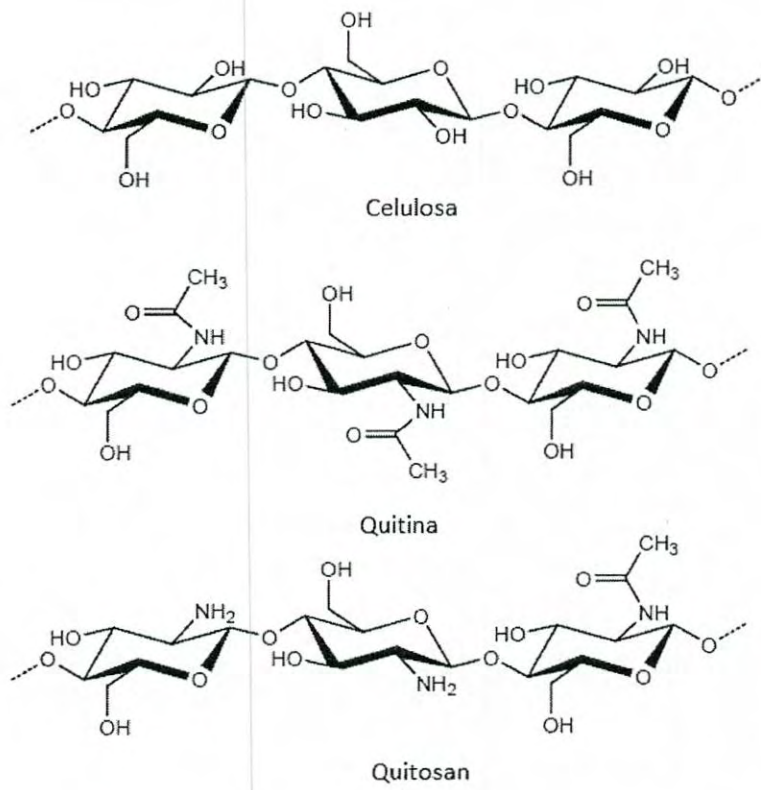


Figura 4. Estructura de la celulosa, la quitina y el quitosano (Dutta *et al.*, 2004).

2.4.2 Nanopartículas de quitosano.

Existen varios métodos para la construcción de nanopartículas a partir de quitosano, sin embargo, el más utilizado es el de gelificación inotrópica dado que es relativamente sencillo, rápido y no se requieren condiciones extremas. El mecanismo de formación de las nanopartículas se basa en interacciones electrostáticas entre los grupos aminos del quitosano y un polianión, comúnmente el tripolifosfato pentasódico (TPP); una solución del polianión es añadida gota a gota a una solución de quitosano bajo agitación magnética a temperatura ambiente provocando la formación de nanogeles de manera espontánea (Figura 5) (Tiyaboonchai, 2003).

Existen muchos reportes en la literatura acerca de nanopartículas de quitosano utilizadas para encapsular diversos fármacos; en esta sección no se pretende hacer una revisión exhaustiva de los artículos relacionados con este tema, sino más bien, mencionar algunos trabajos representativos que provean la base para el desarrollo del presente trabajo.

El primer reporte del uso de la técnica de gelificación inotrópica fue hecho por Calvo *et al* (1997). Ellos prepararon nanopartículas de diversos tamaños variando la relación entre la concentración final de quitosano y TPP, obtuvieron nanopartículas de tamaños de entre 263.8 ± 23.6 a 745.5 ± 74.6 nm dependiendo de la relación molar entre ambos, una relación de 5:1 quitosano:TPP rindió el tamaño más pequeño (263.8 ± 23.6 nm). Ellos utilizaron albumina de suero bovino como molécula modelo para estudiar el uso potencial de las nanopartículas para ser utilizadas como sistemas de liberación controlada de proteínas, reportan que se logró encapsular 51 mg de proteína en 100 mg de nanopartículas y que la liberación de la proteína se mantuvo constante durante 6 días.

Janes *et al.* (2001) prepararon nanopartículas mediante esta misma técnica para encapsular doxorrubicina, las nanopartículas fueron formadas a un pH de 4.7 al cual la doxorrubicina está cargada positivamente ($pK_a = 8.2$) y existe una repulsión electrostática entre ella y el quitosano, tuvieron una eficiencia de encapsulación de solo 9.1 ± 2.2 % con una carga teórica (gramos de doxorrubicina en relación a los gramos del quitosano) del 10 %.

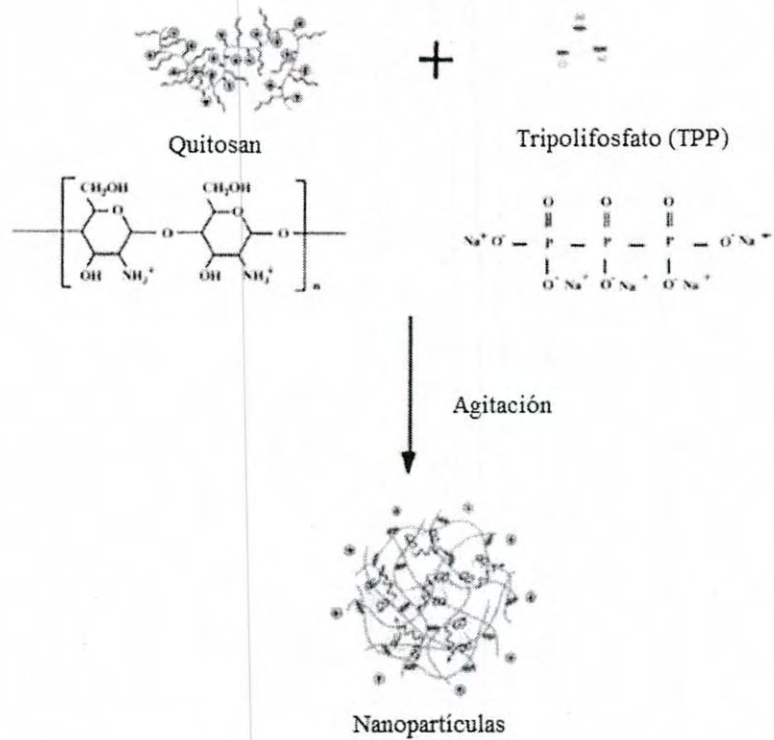


Figura 5. Esquema de formación de nanopartículas mediante el método de gelificación inotrópica (Trapania *et al.*, 2009).

Ellos mejoraron la eficiencia de asociación agregando dextrano sulfatado, que posee carga negativa, junto con doxorubicina durante la formación de las nanopartículas, con esta estrategia lograron aumentar la eficiencia de asociación a 21.9 ± 2.5 %. En los estudios de liberación de doxorubicina en las nanopartículas donde se había incorporado el dextrano sulfatado se observó una liberación brusca del 17 % de doxorubicina en las primeras 2 horas de incubación seguido por 4.5 % durante los siguientes dos días.

Mehrotra *et al.* (2011) prepararon nanopartículas de quitosano por gelificación inotrópica, las cubrieron con polietilenglicol (PEG) y asociaron el quimioterapéutico convencional lomustina. La mayor eficiencia de asociación que lograron fue de 98.0 ± 1 %, los estudios de liberación mostraron que, en el mejor de los casos, se liberó cerca del 50 % de lomustina asociada a las nanopartículas en un lapso de 6 h y esto sucedió cuando las nanopartículas fueron cubiertas con PEG, sin embargo, estas partículas tuvieron un tamaño demasiado grande (543 ± 1.3 y 762 ± 0.9 nm), en las otras formulaciones la liberación de la molécula fue alrededor de 60 a 80 % durante el mismo periodo. La liberación fue controlada por difusión y esta era limitada por la presencia de PEG, esto explica la menor liberación observada en las partículas cubiertas.

Robles *et al.* (2012) utilizaron quitosanos hidrofobizados con diferentes cadenas alquilo y diferente grado de sustitución para preparar nanopartículas por gelificación inotrópica y asociar la proteína insulina, con esta estrategia se logró mejorar la eficiencia de asociación de la proteína alcanzando hasta 96 ± 3 % para un quitosano hidrofobizado con una cadena de 8 carbonos y grado de sustitución del 50 %. Además, las cadenas hidrofóbicas presentes en todos los quitosanos modificados mejoraron la cinética de liberación de la insulina disminuyendo la liberación brusca característica de este tipo de sistemas.

Uno de los principales problemas por resolver en este tipo de nano vectores es el control de la liberación de los fármacos asociados a ellos, esto es de particular importancia en el caso de las nanopartículas de quitosano preparadas por gelificación inotrópica dado que las moléculas pueden difundir relativamente fácil en la matriz polimérica, sobre todo en los casos donde se usan moléculas relativamente pequeñas y en los que la interacción entre ellas y las nanopartículas no es tan fuerte. Como se detalló en los párrafos anteriores esto se ha tratado de resolver, por un lado, aumentando la interacción entre el quitosano y los fármacos, y por otro,

limitando su difusión en la matriz polimérica; una de las aproximaciones más prometedoras para aumentar la asociación y a la vez mejorar la cinética de liberación, sin sacrificar el tamaño de las nanopartículas, es el uso quitosanos hidrofobizados como los reportados por Robles *et al.* (2012)

2.4.3 Actividad anticancerígena del quitosano.

El uso del quitosano como polímero constructor de nanopartículas para la administración de agentes quimioterapéuticos, además de las ventajas de biocompatibilidad inherentes a él, ofrece la alternativa de poseer actividad biológica *per se*, incluyendo actividad anticancerígena; los posibles mecanismos involucrados en dicha actividad incluyen interferencia en el metabolismo celular, inhibición del crecimiento e incluso inducción de la apoptosis. Dadas estas características particulares del quitosano, los nanovectores preparados a base de este polímero podrían, además de mejorar la biodistribución de los quimioterapéuticos convencionales con todas las ventajas que esto implica, proveer actividad antitumoral suplementaria que potencialmente implicaría una mejoría en el tratamiento quimioterapéutico, (Wang *et al.*, 2011).

Hasegawa *et al.* (2001) reportaron que las moléculas de quitosano tienen la capacidad para promover la apoptosis en células de cáncer de vejiga vía la activación de la caspasa 3, ellos demostraron que el aumento en la actividad de esta caspasa en las células tratadas con el polímero fue igual al mostrado por células tratadas con doxorubicina, un proapoptótico convencional.

Takimoto *et al.* (2004) corroboraron la inducción de la apoptosis vía la cascada de las caspasas en el mismo tipo de células tratadas con quitosano y además mostraron que la actividad de la caspasa 8 incrementa mientras la actividad de la caspasa 9 no es afectada por el tratamiento; ambas son iniciadoras de la cascada de las caspasas solo que la primera inicia la cascada por la vía extrínseca y la segunda por la intrínseca. Estos resultados sugieren que el quitosano interactúa con algunos receptores de muerte celular en la superficie de las células en lugar de ejercer un efecto dentro de las mismas. Otro resultado interesante mostrado por estos autores es que las moléculas de quitosano inducen la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R1), un receptor de muerte celular; esto es importante porque la combinación

del quitosano con anticancerígenos convencionales que inducen la apoptosis podría potenciar el efecto de los fármacos.

Lee *et al.* (2002) reportan el efecto citotóxico de varios quitosanos derivatizados con diferente grado de hidrofobicidad sobre varias líneas celulares y muestran que el efecto citotóxico de las moléculas de quitosano incrementó conforme el grado de hidrofobicidad era mayor. El quitosano derivatizado que presentó el mayor efecto citotóxico fue el dietilaminoetil quitosano (quitosano con un grupo $(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ sustituyendo al hidrogeno del grupo hidroxilo del carbono C6 de los monómeros de glucosamina y N-acetilglucosamina). Posteriormente ellos mostraron que el dimetilaminoetil quitosano ejerce un fuerte efecto citotóxico sobre células HeLa por medio de la inducción de la apoptosis y observaron que hubo un incremento significativo en los niveles de expresión de las caspasas 3, 8 y 9. También reportan un incremento significativo en los niveles de expresión de las proteínas p53 y Bax y una disminución en la expresión de la proteína Bcl-2.

Karagozlua *et al.* (2010) reportaron que una serie de oligosacáridos de quitosano derivatizados, incluyendo un derivado con un grupo dietilaminoetil, inducen apoptosis en una línea celular de cáncer gástrico, el dietilaminoetil quitosano también mostro una regulación positiva de la expresión de p53 y Bax y una regulación negativa de Bcl-2.

El efecto citotóxico de nanopartículas de quitosano también ha sido mostrado previamente. Qi *et al.* (2005a) evaluaron la actividad citotóxica de nanopartículas de quitosano de un tamaño de 40, 70 y 100 nm y observaron un fuerte efecto citotóxico sobre tres líneas celulares cancerosas, sin embargo, no observaron efecto citotóxico sobre una línea celular no cancerosa. Este grupo de investigación también reportó que nanopartículas de quitosano de un tamaño de 65 nm ejercen un fuerte efecto citotóxico sobre una línea celular de cáncer gástrico en la cual se observaron predominantes rasgos necróticos (Qi *et al.*, 2005b). Luo *et al.* (2010) mostraron que nanopartículas de succinil quitosano de un tamaño de 40 nm poseen un fuerte efecto citotóxico sobre una línea celular cancerosa, las células mostraron rasgos tanto de necrosis como de apoptosis, ellos sugieren que los dos procesos se dan de manera sincronizada por efecto de las nanopartículas.

2.4.4 Endocitosis de nanopartículas de quitosano.

Una vez las nanopartículas, utilizadas como sistemas de liberación controlada de quimioterapéuticos, alcanzan el sitio del tumor vía el direccionamiento pasivo como resultado del efecto EPR, estas pueden liberar las moléculas que transportan en el espacio extracelular o pueden ser endocitadas por las células tumorales con la potencial liberación de los fármacos en el citoplasma.

El proceso de endocitosis de nanopartículas depende del tipo de célula y varía grandemente en relación al tamaño, carga y otras propiedades de superficie de las nanopartículas. Se ha demostrado que nanopartículas de un rango de tamaño de 20-50 nm son endocitadas de manera más rápida que nanopartículas más grandes. Por otro lado, dado que las membranas celulares poseen carga negativa, las nanopartículas cargadas positivamente presentan una interacción más fuerte con la membrana y son endocitadas con más facilidad. En un estudio con células HeLa usando nanopartículas con igual tamaño pero unas cargadas positivamente y otras cargadas negativamente, se observó que la endocitosis de las nanopartículas positivas fue dos veces mayor que la de las nanopartículas negativas (Iversena *et al.*, 2011).

En el caso particular del quitosano, se ha mostrado que las moléculas solo interactúan con la membrana celular mientras que las nanopartículas si son internalizadas e incluso han sido observadas dentro del núcleo celular. Dado que el quitosano posee grupos aminos protonables, bajo ciertas condiciones de pH, las nanopartículas preparadas a base de este polímero tienden a tener una carga positiva, esto potencialmente permite que se produzcan interacciones electrostáticas entre estas y las membranas celulares posibilitando la endocitosis. Por otro lado, dado que las moléculas no poseen una forma propicia, estas solo interactúan con las membranas celulares pero no son endocitadas (Huang *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2009).

Se ha mostrado que tanto el peso molecular como el grado de desacetilación del quitosano afectan el proceso de endocitosis de las nanopartículas preparadas a partir de este polímero, en un estudio se observó que la capacidad de endocitosis de nanopartículas de quitosano decreció conforme el peso molecular y el grado de desacetilación del polímero disminuyeron, este comportamiento se debió a que esas características del quitosano modulaban el potencial zeta de las nanopartículas (Huang *et al.*, 2004).

2.5 Estudio de la interacción nanopartículas-membrana celular con un modelo de membrana.

La complejidad de las membranas celulares hace difícil el estudio de las interacciones físicas, químicas y biológicas entre estas y medicamentos o sistemas de liberación controlada, por esta razón se han desarrollado diversas membranas artificiales que mimetizan las bicapas lipídicas naturales. Estos modelos de membrana incluyen, entre otros, los liposomas y las monocapas lipídicas (Peetla *et al.*, 2009). En este apartado solo se discutirá el uso de monocapas lipídicas dado que es el modelo de membrana que se utilizara en este trabajo.

Las monocapas lipídicas pueden ser formadas en la superficie del agua o de soluciones amortiguadoras usando una balanza de Langmuir. Un esquema de la balanza de Langmuir es mostrado en la figura 6 (a). El equipo consiste de un contenedor, usualmente fabricado de materiales inertes como el teflón, en el cual se coloca la subfase, que puede ser agua o alguna solución amortiguadora, las barreras son capaces de moverse sobre la superficie de la subfase. El principio fundamental de esta técnica es la medición de la presión superficial (π):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

Donde γ_0 representa la tensión superficial de la subfase limpia y γ corresponde a la tensión superficial de la subfase cubierta.

En un experimento rutinario, una cantidad conocida de un compuesto anfifílico disuelto en un solvente orgánico y volátil es depositada en la superficie de la subfase, después de la evaporación del solvente, cuando las cabezas polares se encuentran en contacto con la subfase y las colas hidrófobas están orientadas hacia el aire, las barreras móviles se cierran de manera que comienzan a comprimir la monocapa. La técnica usada comúnmente para caracterizar una monocapa de Langmuir es la isoterma presión-área ($\pi - A$), la cual es una gráfica del cambio de presión como función del área disponible para cada molécula del compuesto anfifílico en la superficie de la subfase (Dynarowicz *et al.*, 2001).

Una típica isoterma presión-área es mostrada en la figura 6 (b), cuando el área por molécula es muy grande, la monocapa se comporta de manera similar a un gas en dos dimensiones, en este estado “gaseoso” (G) las moléculas están muy separadas entre sí y se considera que no

interactúan unas con otras. Cuando el área de la monocapa es reducida por la compresión producida por las barreras, las moléculas están más cerca unas de otras y comienzan a interactuar, esta región es conocida como el estado “líquido” (L). A menor área las moléculas están muy juntas y asumen una orientación vertical, esta etapa es conocida como el estado “sólido” o “cristalino” (C), si la monocapa se comprime aún más ocurre el colapso. Dependiendo del compuesto anfifílico utilizado otras fases tales como las de líquido expandido (LE), líquido condensado (LC), intermedio (I) y sólido condensado (SC) pueden aparecer (Dynarowicz et al., 2001).

La adsorción de varios materiales (proteínas, medicamentos, surfactantes o sistemas de liberación controlada) en las biomembranas desencadena importantes procesos bioquímicos de interés biomédico. Los estudios de adsorción llevados a cabo usando la balanza de Langmuir permiten investigar la interacción entre estos materiales y las membranas biológicas, para lograrlo, la monocapa se comprime hasta una determinada presión y los compuestos a evaluar son depositados en la subfase monitorizándose los cambios de presión durante determinado tiempo (Figura 7) (Maget-Dana, 1999).

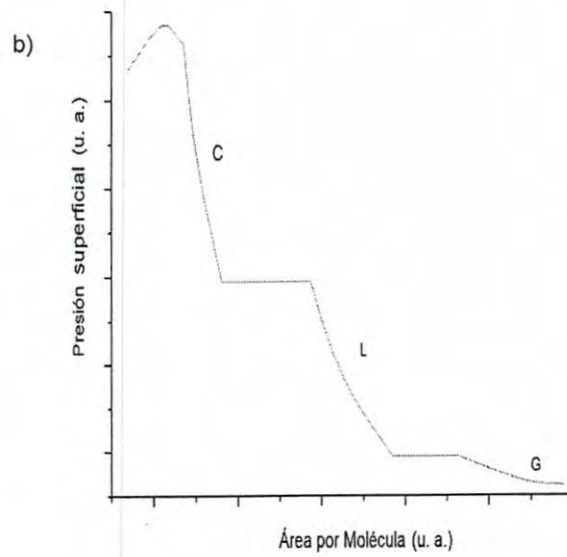
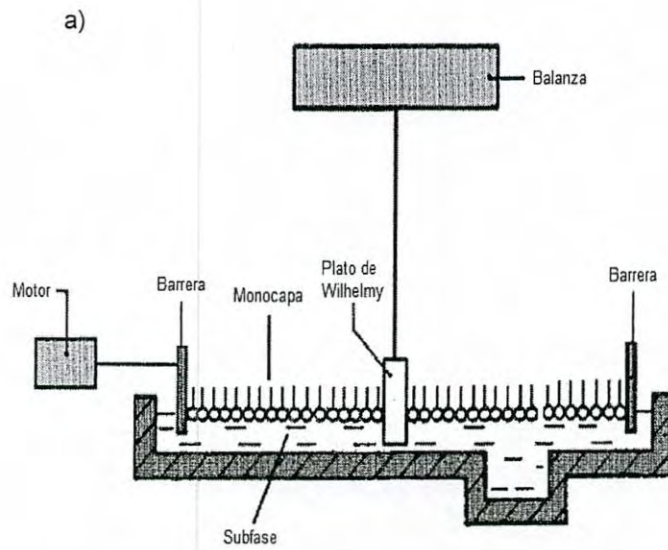


Figura 6. Representación esquemática a) de la balanza de Langmuir y b) de una típica isoterma presión-área (la presión superficial y el área por molécula están en unidades arbitrarias (u.a.)) (Dynarowicz *et al.*, 2001).

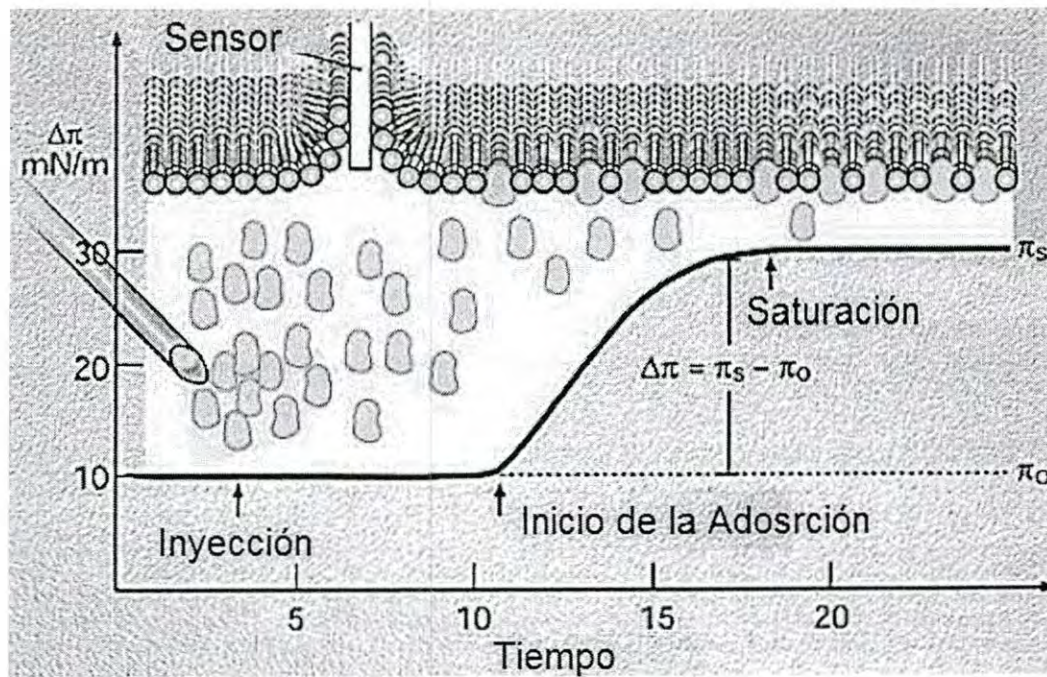


Figura 7. Representación esquemática que muestra la penetración de moléculas en una monocapa lipídica.¹

¹<http://www.kibron.com/Products/DeltaPi/DeltaPi.html>

III OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el efecto de la hidrofobización del quitosano sobre la actividad citotóxica de nanopartículas preparadas a partir de él sobre las células cancerosas HeLa y MDA-MB-231.

3.2 Particulares

a) Preparar quitosanos modificados hidrofóbicamente sustituyendo el 10 y 30 % de los grupos aminos de la macromolécula del quitosano con cadenas alquilo de 8 carbonos.

b) Preparar nanopartículas de un tamaño de 200-300 nm utilizando los quitosanos hidrofóbicos.

c) Caracterizar el tamaño, la carga y la morfología de las nanopartículas preparadas.

d) Estudiar la interacción de las nanopartículas de los quitosanos hidrofóbicos con un modelo de membrana artificial.

e) Visualizar la endocitosis de nanopartículas de los quitosanos hidrofóbicos.

E) Evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas preparadas a partir de los quitosanos hidrofóbicos sobre las células cancerosas HeLa y MDA-MB-231.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Modificación hidrofóbica del quitosano.

Se utilizó un quitosano de un peso molecular promedio de 250,000 g/mol y un grado de desacetilación del 86 % (Protasan UP B 80/20, Novamatrix); los quitosanos derivatizados fueron obtenidos por medio de una reacción de aminación reductiva siguiendo la metodología descrita previamente por Desbrières *et al* (1996). Este procedimiento produce un enlace covalente entre el grupo aldehído de un sustrato y los grupos aminos del quitosano, los sustratos usados en el presente trabajo fueron moléculas de octilaldehído. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: 1 g de quitosano fue disuelto en 55 ml de ácido acético (0.2 M), se adicionaron 18 ml de etanol para permitir que el aldehído se mantuviera disuelto y el pH se ajustó a 5.1 para impedir la precipitación del quitosano. Se agregó la cantidad adecuada de octilaldehído disuelto en 18 ml de etanol para obtener los quitosanos modificados al 10 y al 30 %, después se adiciono un exceso (1.17 g) de cianohidrobórato de sodio (NaCNBH_4). La mezcla fue agitada durante 24 h a temperatura ambiente y el quitosano derivatizado fue precipitado con etanol, el precipitado fue lavado varias veces con mezclas de etanol/agua incrementando el contenido de etanol de 70 a 100 % v/v. El producto fue dializado contra agua por tres días y luego liofilizado. En este trabajo el quitosano no modificado, el quitosano modificado al 10 % y el quitosano modificado al 30 % serán referidos como Ch, ChA y ChB, respectivamente.

4.1.1 Caracterización de los quitosanos derivatizados.

4.1.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo. Los espectro de infrarrojo de los diferentes quitosanos fueron obtenidos en un instrumento Perkin-Elmer® modelo Spectrum GX, cada espectro es el promedio de 16 corridas detectando la transmitancia en el rango de $400\text{-}4,000\text{ cm}^{-1}$ con una resolución espectral de 4 cm^{-1} , los espectros resultantes fueron analizados con el software Spectrum v.10. Las muestras de quitosano se mezclaron con KBr para posteriormente formar una pastilla y finalmente ser sujetas a las respectivas mediciones.

4.1.1.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H). Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón se obtuvieron en un instrumento Bruker® (modelo Avance 400) operando a 400 MHz. Las muestras se prepararon disolviendo 5 mg de los diferentes quitosanos en 0.5 mL de una mezcla de DCl /D₂O (2 %, v/v) a pH 3.2.

4.2 Asociación de fluoresceína al quitosano

La unión covalente de moléculas de fluoresceína al quitosano fue hecha de acuerdo al método descrito por Huang *et al.* (2004) Se disolvieron 100 mg de Ch, ChA y ChB en 100 ml de ácido acético 0.1M (pH≈3), se adicionaron 100 ml de metanol seguido por 3.5 ml de una solución de isotiocianato de Fluoresceína (2 mg/ml) en metanol. La mezcla se mantuvo en agitación constante por 16 h, el producto final fue precipitado con una solución de NaOH 0.5 N, el precipitado fue resuspendido en ácido acético (0.1 M), dializado contra agua por tres días para finalmente ser liofilizado. Los quitosanos etiquetados con fluoresceína serán referidos como FCh, FChA y FChB.

4.3 Preparación de nanopartículas.

Las nanopartículas de quitosano fueron preparadas usando el método de gelificación inotrópica descrito por Calvo *et al.* (1997) Se disolvieron 4 mg de quitosano (Ch, ChA o ChB) en 6 ml de ácido acético 0.1 M (pH 4.2), se adicionaron 1.6, 2.4 y 1.5 ml de una solución de tripolifosfato pentasodico (1 mg/ml) a las soluciones de Ch, ChA y ChB, respectivamente. Las mezclas se mantuvieron en agitación por 30 min, las nanopartículas fueron precipitadas a 13, 000 rpm durante 30 min y se resuspendieron en agua deionizada. Las nanopartículas de FCh, FChA y FChB fueron preparadas bajo las mismas condiciones.

4.4 Caracterización de nanopartículas.

4.4.1 Medición del tamaño y potencial zeta de las nanopartículas. El tamaño promedio y el potencial zeta de las nanopartículas preparadas fueron determinados por dispersión dinámica de luz y velocimetría Doppler, respectivamente, usando un Nano ZS (Nanoseries, Malvern Instruments, UK). Las nanopartículas fueron suspendidas en agua (pH≈6) o en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4) y las mediciones se llevaron a cabo a 25°C. Se

realizaron tres mediciones independientes y los resultados son reportados como la media \pm desviación estándar.

4.4.2 Imágenes de Microscopia de Fuerza Atómica (AFM). Las imágenes de las nanopartículas fueron obtenidas con un microscopio de fuerza atómica JEOL (JSPM 4210, Japan) usando el modo de no contacto, la suspensión de nanopartículas fue diluida y colocada en una mica, una vez seca esta, las imágenes fueron obtenidas usando un cantiléver de silicón NSC15 (MicroMash, USA).

4.5 Interacción de nanopartículas con un modelo de membrana en la interface aire-agua.

4.5.1 Obtención de isothermas. Las isothermas de DPPC fueron obtenidas usando una balanza de Langmuir (Nima Technologies, Ltd., Coventry, England, Langmuir-Blodgett trough, Model type 611), la presión superficial $\pi = \gamma_0 - \gamma$ fue medida usando el método del plato de Wilhelmy. Se preparó una solución de DPPC en cloroformo a una concentración de 1 mg/ml y se depositaron 50 μ l de esa solución en la subfase usando una microjeringa Hamilton, la subfase contenía solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4) pura o con suspensiones de la nanopartículas construidas de Ch, ChA y ChB a una concentración de 5 μ g/ml. Las nanopartículas fueron depositadas en la subfase y se permitió su difusión por 30 min, luego se depositó la solución de DPPC y transcurridos 30 min se obtuvieron las isothermas con una velocidad de la barrera de 20 cm^2/min . La temperatura fue mantenida a 25° C usando un circulador de agua (Cole-Palmer, 1268-24, USA) (Peetla *et al.*, 2009).

4.5.2 Adsorción de las nanopartículas en el modelo de membrana. Para los experimentos de adsorción se colocaron 50 μ l de la solución de DPPC (1 mg/ml) en la subfase (pH 7.4), una vez evaporado el cloroformo, la monocapa fue comprimida hasta alcanzar una presión de 25 mN/m, 30 min después de alcanzar dicha presión se inyectaron las soluciones de nanopartículas en la subfase a una concentración final de 10 μ g/ml y se monitorizo el cambio de presión durante 2 h (Peetla *et al.*, 2009).

4.6 Ensayos con cultivos celulares.

4.6.1 Condiciones de cultivo. Se utilizó la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa y la línea celular no cancerosa Arpe-19. Las células HeLa y Arpe-19 fueron mantenidas en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomycin y 2.5 µg/ml de anfotericina, mientras que las células MDA-MB-231 fueron cultivadas en DMEM con las mismas condiciones pero con 15 % de suero fetal bovino. Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C, 5 % de CO₂ y una humedad del 90 %.

4.6.2 Ensayos citotóxicos. El efecto citotóxico de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB fue determinado por medio del método de reducción del MTT. Se inocularon 50 µl de una suspensión celular (2×10^5 células/ml) en cada pozo de una placa de 96 pozos, después de 24 h de incubación se agregaron 50 µl de una suspensión de nanopartículas (suspendidas en agua deionizada), las concentraciones resultantes de nanopartículas fueron 12.5, 25, 50 y 100 µg/ml. La citotoxicidad fue medida después de 48 h de incubación agregando 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) a cada pozo, las placas fueron incubadas por 4 h y transcurrido este tiempo los cristales de formazan formados fueron solubilizados agregando 150 µl de isopropanol ácido, las muestras fueron agitadas y la densidad óptica fue medida a 570 nm. La viabilidad celular relativa fue determinada por la cantidad de MTT metabolizada a formazan y calculada como porcentaje de viabilidad comparada con el control (solo agua deionizada) (Loh *et al.*, 2010).

4.6.3 Imágenes de microscopía de fluorescencia. Las células fueron cultivadas en cubreobjetos hasta alcanzar la confluencia, las nanopartículas etiquetadas con fluoresceína, suspendidas en agua deionizada, fueron agregadas para obtener una concentración final de 300 µg/ml, después de 4 h de incubación las células fueron lavadas de manera exhaustiva con buffer de fosfatos salino (PBS) e incubadas por 1 min con 1 ml de una solución de azul de tripan (400 µg/ml). Las células fueron lavadas de nuevo y fijadas con una solución de formaldehído al 4 % por 10 min. Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos limpios usando una solución de Glicerol/PBS (9:1) y las células fueron observadas en un microscopio

de fluorescencia (Leica DM4000 B LED, © Leica Microsystems, Germany) usando un filtro con λ_{ex} de 490 nm y λ_{em} de 520 nm (Loh *et al.*, 2010).

4.7 Análisis estadístico.

Los resultados del efecto citotóxico fueron analizados por medio de un ANOVA de tres vías y comparaciones múltiples (Prueba de Tukey); El tamaño y el potencial zeta de nanopartículas fueron analizados con un ANOVA de dos vías y comparaciones múltiples (Prueba de Tukey). Un valor de p menor de 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

V RESULTADOS Y DISCUSIONES.

5.1 Caracterización de los quitosanos derivatizados

5.1.1 Espectros de Infrarrojo. Como se muestra en la figura 8, los espectros de infrarrojo corroboran el éxito de la modificación hidrofóbica del quitosano. Se observan bandas características del quitosano incluyendo una señal amplia localizada entre 4000 y 3000 cm^{-1} que está asociada con el estiramiento de los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$, una banda localizada a 1640 cm^{-1} correspondiente a los enlaces $\text{C}=\text{O}$ de las amidas secundarias y una serie de señales en el rango de 1158-896 cm^{-1} pertenecientes a la estructura del polisacárido, incluyendo los estiramientos de los enlaces $\text{C}-\text{O}$ de los alcoholes secundarios, al igual que $\text{C}-\text{O}$ y $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de los enlaces glucosídicos y de éteres cíclicos (Coates, 2000; Mobarak y Abdullah, 2010; Bobu *et al.*, 2011).

Los espectros de los quitosanos modificados hidrofóbicamente (Figura 8. b y c) muestran diferencias marcadas en relación al quitosano nativo, en ambos casos, se observa una disminución de la amplitud de la banda entre 4000 y 3000 cm^{-1} que puede deberse a la disminución de la capacidad del polímero para formar puentes de hidrogeno debido a la presencia de las cadena alifáticas. Aparece una banda a 1453 cm^{-1} perteneciente al doblamiento de los enlaces $\text{C}-\text{H}$ del grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), se observa también un aumento en la intensidad de las señales a 2930 y 2875 cm^{-1} pertenecientes a los estiramientos de los grupos metilo ($-\text{CH}_3$) y metileno y la aparición de otra señal a 1560 cm^{-1} que puede asignarse a las aminas secundarias (Tien *et al.*, 2003; Robles *et al.*, 2012). Además, se observa de manera cualitativa que la intensidad de estas señales está directamente relacionada con el grado de sustitución del quitosano.

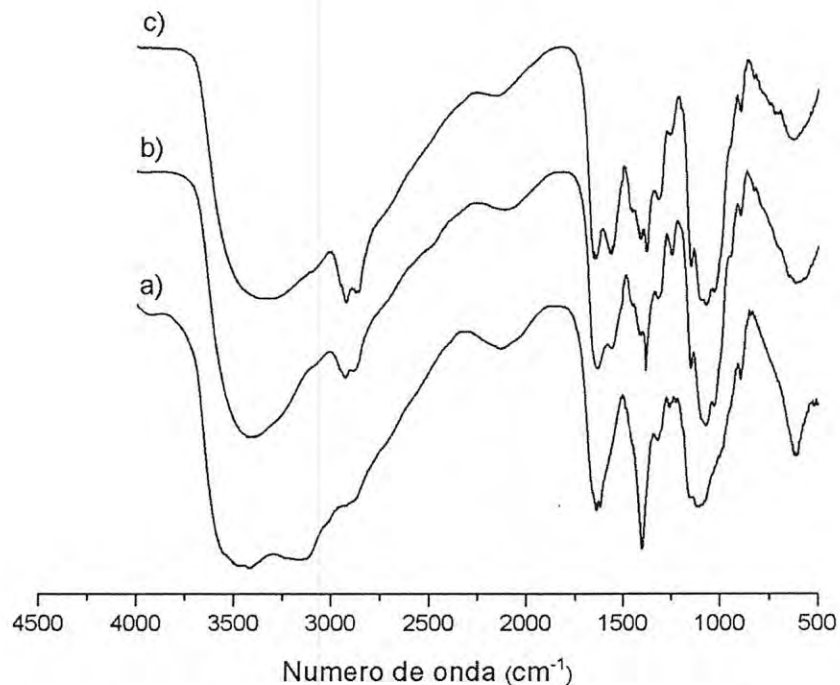


Figura 8. Espectros infrarrojo de a) quitosano sin modificación (Ch), b) quitosano modificado al 10 % (ChA) y c) quitosano modificado al 30 % (ChB).

5.1.2 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{H-RMN}$). Los espectros de $^1\text{H-RMN}$ de Ch, ChA y ChB son mostrados en la figura 9. Los picos a 1.8 ppm pueden ser asignados a los tres protones del grupo acetilo de los monómeros de N-Acetilglucosamina (NHCOCH_3), mientras que se consideró que las señales a 2.9 ppm y entre 3.3-3.8 ppm corresponden a los hidrógenos unidos al carbono C2 y a los carbonos C3, C4, C5 y C6 del anillo glucopiranososa, respectivamente. Los picos a 4.3 y 4.6 ppm fueron asignados a los protones unidos al carbono C1 de los residuos de glucosamina y N-acetilglucosamina, respectivamente (Mobarak y Abdullah, 2010).

En lo que respecta a los quitosanos derivatizados se observa claramente la aparición de ciertos picos característicos que pueden ser asociados a la presencia de la cadena alifática unida al quitosano, dichas señales aparecen a 0.6 ppm, 1.0 ppm y 1.44 ppm y fueron asignadas a los hidrógenos del grupo metilo ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{(CH}_2\text{)}_6-\text{CH}_3$), a los hidrógenos del grupo metileno ($\text{NH}-\text{CH}_2-\text{(CH}_2\text{)}_6-\text{CH}_3$) y a los hidrógenos del carbono unido covalentemente al nitrógeno ($\text{NH}-\text{CH}_2-\text{(CH}_2\text{)}_6-\text{CH}_3$), respectivamente (Tien *et al.*, 2003; Bobu *et al.*, 2011; Robles *et al.*, 2012). La intensidad de los últimos picos está directamente relacionada con el grado de sustitución del quitosano y se puede observar de manera clara una mayor intensidad en el caso ChA que en el de ChB.

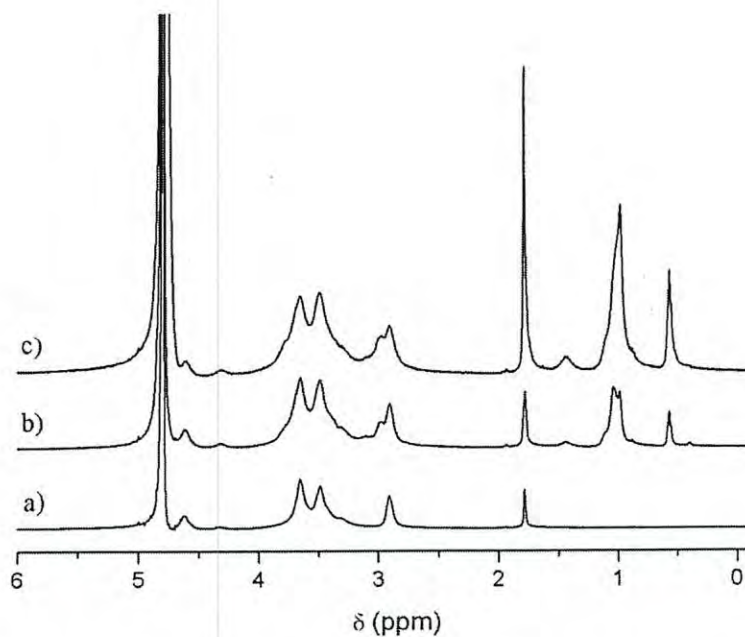


Figura 9. Espectros ^1H -RMN de a) quitosano sin modificación (Ch), b) quitosano modificado al 10 % (ChA) y c) quitosano modificado al 30 % (ChB).

5.2 Caracterización de las nanopartículas

5.2.1 Tamaño de nanopartículas. El tamaño promedio de las nanopartículas preparadas a partir de Ch, ChA, ChB, FCh, FChA y FChB, suspendidas en agua deionizada o en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4) se muestra de manera resumida en la tabla 1, también se muestran algunas graficas representativas de las distribuciones de tamaño de las mismas (Figuras 10-13). El tamaño promedio de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB suspendidas en agua deionizada fue de 159 ± 11 , 190 ± 38 y 200 ± 50 nm, respectivamente.

Cuando las mismas nanopartículas son suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) parece haber un incremento de tamaño; en este caso el tamaño es de 260 ± 58 , 227 ± 47 y 253 ± 25 nm, para las nanopartículas de Ch, ChA y ChB, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas solo en el caso de las nanopartículas preparadas a partir de Ch ($p < 0.05$). Resultados similares fueron observados por Loh *et al.* (2010) ellos reportan un incremento de tamaño de hasta 13 veces cuando las nanopartículas de quitosano están suspendidas a pH 7.4 en relación a cuando están a un pH de 6, ellos sugieren que este resultado podría deberse a un fenómeno de agregación de las nanopartículas. Aquí parece que este no es el caso puesto que el incremento de tamaño no es tan considerable.

Los resultados obtenidos en el caso de las nanopartículas de Ch son inesperados y no concuerdan con lo reportado por López-León *et al.* (2005); ellos realizaron un estudio del efecto del pH sobre el tamaño de las nanopartículas y reportan una disminución en el tamaño cuando el pH aumenta de 4 a 7, la explicación es que conforme aumenta el pH disminuye el grado de ionización de los grupos aminos del quitosano y consecuentemente la cantidad de agua dentro de la matriz polimérica. Más estudios son necesarios para corroborar los resultados obtenidos en el presente trabajo en relación a este aumento de tamaño en las nanopartículas de Ch.

También se puede observar que la presencia de la molécula de fluoresceína aparentemente no afecta de manera considerable el tamaño de las nanopartículas, se observa un ligero incremento en el tamaño de las nanopartículas de FCh en relación a las de Ch cuando están

suspendidas a un pH de 6, sin embargo, a pH de 7 el tamaño de ambas es muy similar. Huang *et al.* (2004) obtuvieron nanopartículas etiquetadas con fluoresceína de un tamaño promedio de 195 ± 1.6 nm, similares a las obtenidas en el presente trabajo para FCh y FChA, aparentemente las nanopartículas de FChB tienden a ser más grandes debido a la presencia de las cadenas alifáticas.

Nanopartículas	En Agua Deionizada (pH~6)		En Fosfatos 10 mM (pH=7.4)	
	Tamaño (nm)	Potencial Zeta (mV)	Tamaño (nm)	Potencial Zeta (mV)
Ch	159±11 ^a	33.5±1.6 ^a	260±58 ^b	3.8±0. ^c
ChA	190±38 ^{a,b}	31.9±4.61 ^a	227±47 ^{a,b}	4.54±0.6 ^c
ChB	200±50 ^{a,b}	32.7±0.64 ^a	253±25 ^b	4.86±0.7 ^c
FCh	216±28 ^{a,b}	25±0.7 ^b	259±26 ^b	3.89±0.1 ^c
FChA	188±34 ^{a,b}	21.6±0.9 ^b	218±24 ^{a,b}	5.15±0.2 ^c
FChB	262±28 ^b	23.26±1.0 ^b	236±15 ^{a,b}	6.42±0.1 ^c

Tabla 1. Tamaño y potencial zeta promedio de los diferentes tipos de nanopartículas suspendidas en Agua deionizada (pH~6) o en solución amortiguadora de Fosfatos 10 mM (pH=7.4), promedio de tres repeticiones independientes. Valores de tamaño o potencial zeta con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

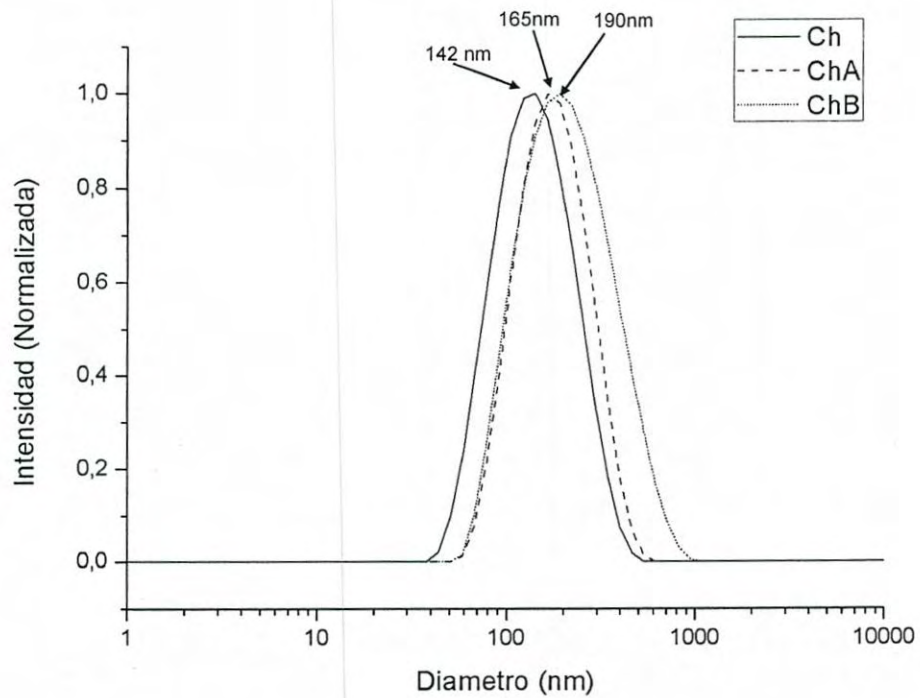


Figura 10. Gráficas representativas de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de Ch, ChA y ChB suspendidas en agua deionizada (pH~ 6).

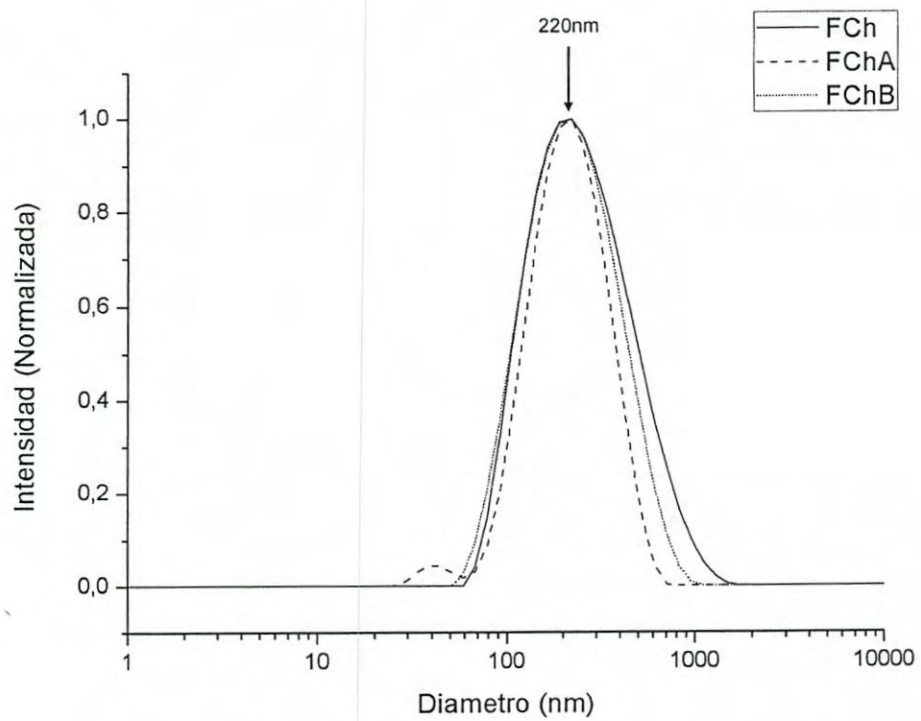


Figura 11. Gráficas representativas de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de Ch, ChA y ChB suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4).

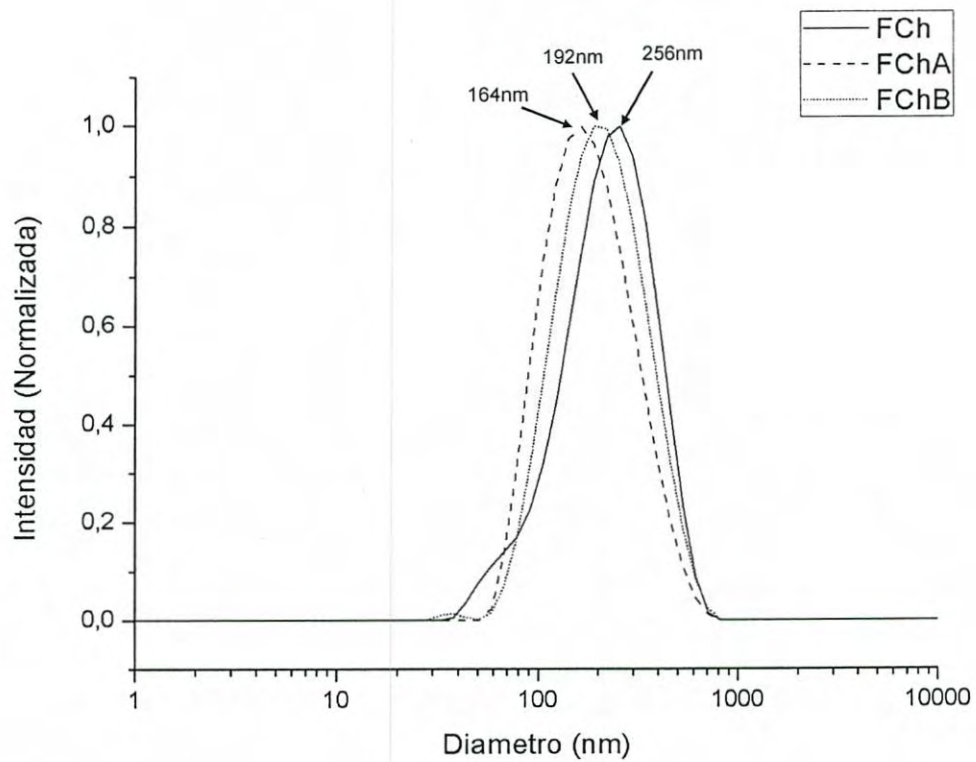


Figura 12. Graficas representativas de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de FCh, FChA y FChB suspendidas en agua deionizada (pH~6).

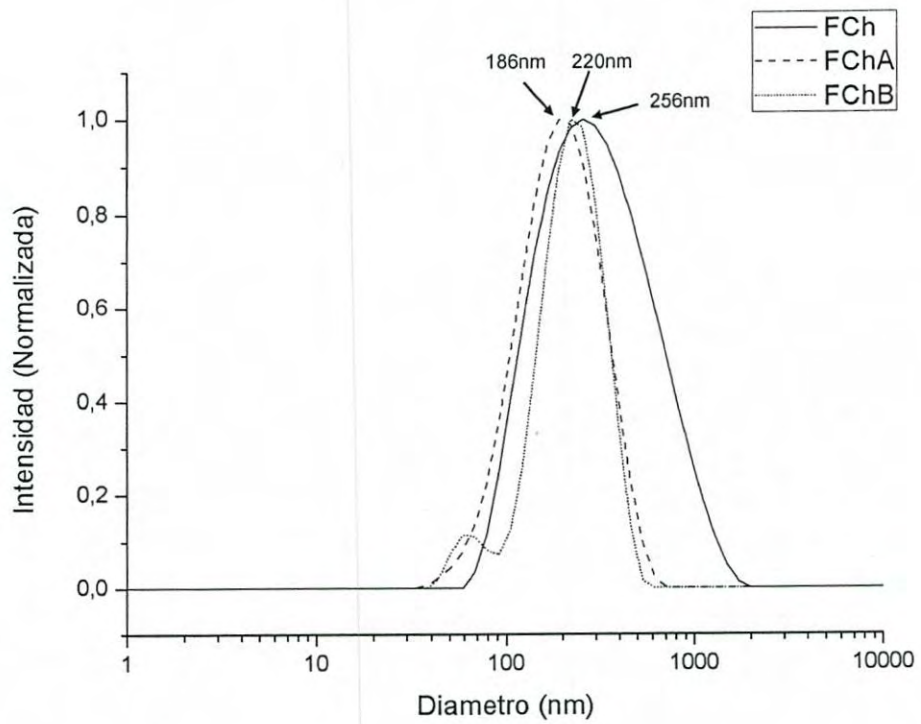


Figura 13. Gráficas representativas de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de FCh, FChA y FChB suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4).

Ellos también reportan que nanopartículas preparadas a partir del quitosano no etiquetado presentan un tamaño de 223.2 ± 4.31 nm, es decir, la presencia de las moléculas de fluoresceína en el quitosano provocó una disminución en el tamaño de las nanopartículas preparadas, esto es contrario a lo observado en el presente trabajo, ya que, sobre todo en el caso de Ch, la presencia de las moléculas de fluoresceína provoca un aumento del tamaño promedio de las nanopartículas.

5.2.2 Potencial zeta. Los resultados del potencial zeta son mostrados en la tabla 1, mientras las figuras 14 y 15 muestran algunas distribuciones representativas del potencial zeta de los diferentes tipos de nanopartículas. Se observa claramente que el potencial zeta entre las nanopartículas de Ch, ChA y ChB no varían mucho cuando estas están suspendidas en agua deionizada, las tres presentan un potencial zeta de alrededor de 30 mV. Cuando las nanopartículas son suspendidas a un pH de 7.4 se observa una disminución considerable en el potencial zeta en los tres tipos de nanopartículas. Es interesante notar que la presencia de las cadenas alquilo no altera de manera importante el potencial zeta en ninguno de los dos medios probados. La disminución del potencial zeta cuando el pH incrementa de 6 a 7.4 concuerda con lo reportado por López-León *et al.* (2005); ellos mostraron que las nanopartículas de quitosano presentan un potencial zeta de alrededor de 30 mV a pH bajo y desciende conforme aumenta el pH pasando por un punto isoeléctrico alrededor de 7.5, con una inversión del signo por arriba de este punto.

También se observa claramente que la presencia de las moléculas de fluoresceína provocan una ligera disminución del potencial zeta de las nanopartículas suspendidas en agua deionizada, esto puede deberse a la disminución de grupos aminos protonables debido a que participan en el enlace covalente entre el quitosano y la fluoresceína, sin embargo, el potencial zeta de las nanopartículas con fluoresceína suspendidas en la solución de fosfatos es muy similar al de las nanopartículas no etiquetadas. Huang *et al.* (2002) reportan una disminución similar del potencial zeta de nanopartículas de quitosano debido a la presencia de moléculas de fluoresceína, ellos obtuvieron un potencial zeta de 47.8 ± 0.6 mV en el caso de las nanopartículas no etiquetadas y uno de 35.5 ± 3.1 mV en el caso de los quitosanos con fluoresceína.

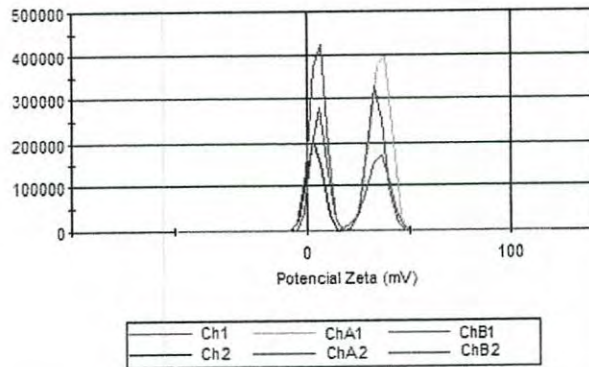


Figura 14. Graficas representativas de la distribución del potencial zeta de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB suspendidas en 1) Agua deionizada (pH~6) o 2) en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4).

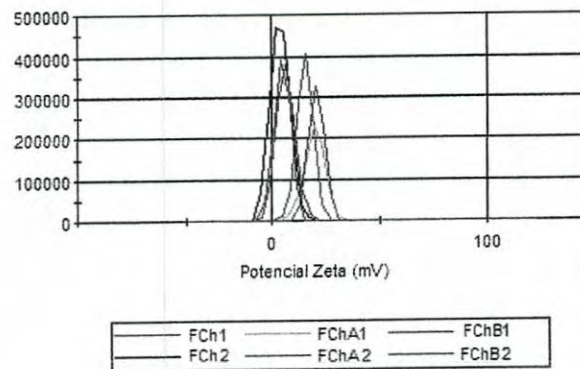


Figura 15. Graficas representativas de la distribución del potencial zeta de las nanopartículas de FCh, FChA y FChB suspendidas en 1) Agua deionizada (pH~6) o 2) en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4).

5.2.3 Morfología de nanopartículas. Las imágenes de microscopia de fuerza atómica de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB son mostradas en la figura 16. Las nanopartículas de Ch muestran una forma esférica y conforme aumenta el grado de hidrofobicidad del quitosano las nanopartículas tienden a tomar una forma más elongada, tal comportamiento ha sido reportado anteriormente por Robles *et al.* (2012).

5.3 Interacción de nanopartículas con el modelo de membrana en la interface aire-agua.

En la figura 17 se observan las isotermas de DPPC usando como subfase una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 7.4) pura o con 5 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartículas preparadas a partir de Ch, ChA y ChB. El área extrapolada en la fase condensada (obtenida trazando una línea tangente en la región de la presión más elevada e intersectando el eje x) muestra un incremento de 53 $\text{Å}^2/\text{molécula}$ cuando se usa la subfase pura a 59, 94 y 90 $\text{Å}^2/\text{molécula}$ cuando las nanopartículas de Ch, ChA y ChB, respectivamente, están presentes en la subfase.

A pesar de que el DPPC carece de carga, presenta cierta interacción con las nanopartículas de Ch. Esto es corroborado por el cambio en la fase de equilibrio Líquido Expandido-Líquido Condensado (LE-LC) de la isoterma de DPPC en la subfase pura donde se presenta alrededor de 70 $\text{Å}^2/\text{molécula}$ a un área de alrededor de 90 $\text{Å}^2/\text{molécula}$ cuando las nanopartículas de Ch están presentes. En el caso de las nanopartículas de ChA y ChB, la interacción con el DPPC es más fuerte como lo muestra el incremento del área por molécula en la fase condensada, indicando que estas nanopartículas permanecen en la interface a presiones altas, en estos casos el equilibrio LE-LC se vuelve imperceptible.

También es importante notar que las isotermas presentan diferencias muy marcadas, particularmente cuando los quitosanos más hidrófobos se encuentran en la subfase. Pavinatto *et al.* (2007b), encontraron que el área por molécula de DPPC en agua pura fue similar a las áreas por molécula observadas cuando la subfase contenía moléculas de quitosano, esto significa que, contrario a nuestros resultados, las moléculas de quitosano son expulsadas de la monocapa de DPPC a altas presiones.

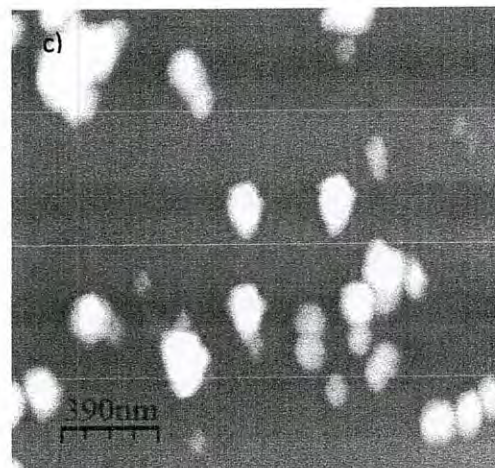
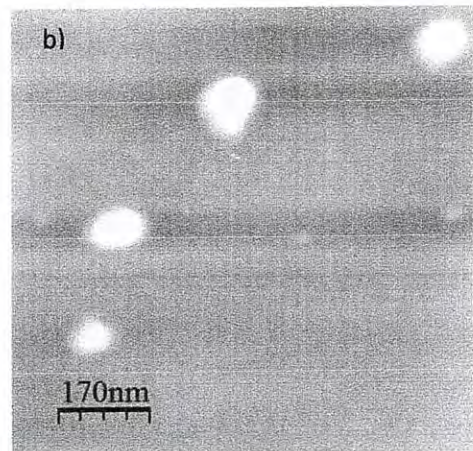
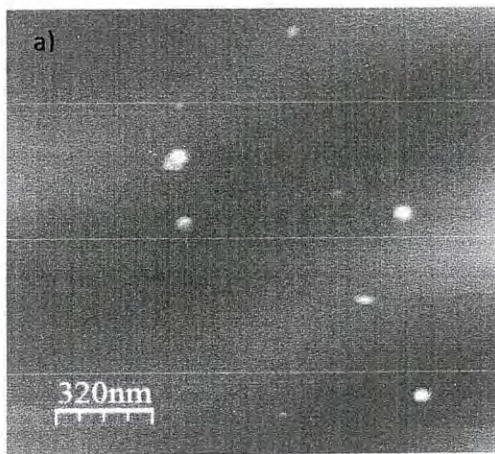


Figura 16. Imágenes de microscopia de fuerza atómica de nanopartículas de de a) quitosano sin modificación (Ch), b) quitosano modificado al 10 % (ChA) y c) quitosano modificado al 30 % (ChB).

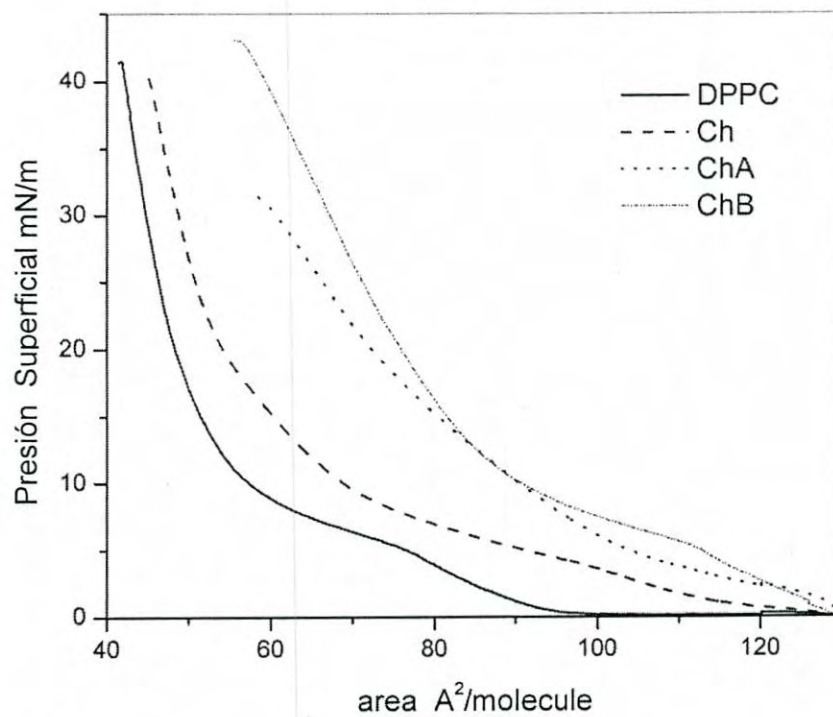


Figura 17. Isotermas presión-área ($\pi - A$) de la monocapa de DPPC en la subfase pura o con la presencia de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB.

Otra manera de medir la interacción entre las nanopartículas y las moléculas de DPPC es observando el aumento de presión, por efecto de la presencia de las nanopartículas, manteniendo el área superficial constante. Para un área de 70 Å²/molécula, la presión incremento 3, 16 y 20 mN/m cuando las nanopartículas de Ch, ChA y ChB, respectivamente, estaban presentes en la subfase.

Es usual comparar el comportamiento de las isothermas con los correspondiente módulos de compresión de la monocapa, (Pavinatto *et al.*, 2007a; Pavinatto *et al.*, 2007b)

$C_s^{-1} = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial \pi} \right)_T$, donde A y π son el área moléculas y la presión superficial,

respectivamente. Para una presión fija de 25 mN/m se encontró que los valores de C_s^{-1} cambiaron de 134 mN/m para la subfase pura a 80, 61 y 51 mN/m cuando las nanopartículas de Ch, ChA y ChB estaban presentes en la subfase. Esta tendencia se mantiene en el rango de 15-25 mN/m. Esto sugiere que a una presión superficial cercana a la presión presente en las células (30 mN/m), los valores de los módulos de compresión de la monocapa de DPPC son fuertemente afectados por las nanopartículas de quitosano, produciendo una monocapa más compresible como consecuencia de la adsorción de las nanopartículas a la monocapa de DPPC. Resultados similares han sido reportados con monocapas de DPPC y soluciones de quitosano (Parra-Barraza *et al.*, 2005; Pavinatto *et al.*, 2007b).

En la figura 18 se observa el aumento de la presión superficial de la monocapa de DPPC a una presión inicial de 25 mN/m. Es evidente, como se vio en el caso de las isothermas, que las nanopartículas de Ch presenta una interacción débil con la monocapa debido a la carga neutra de las moléculas de DPPC y al débil carácter hidrofóbico del quitosano. Por otro lado, las nanopartículas de ChA y ChB tienen mayor afinidad con la monocapa como consecuencia de su hidrofobicidad, produciendo un mayor incremento de la presión superficial, es importante notar que las nanopartículas de ChB siguen adsorbiéndose en la monocapa incluso después de las dos horas.

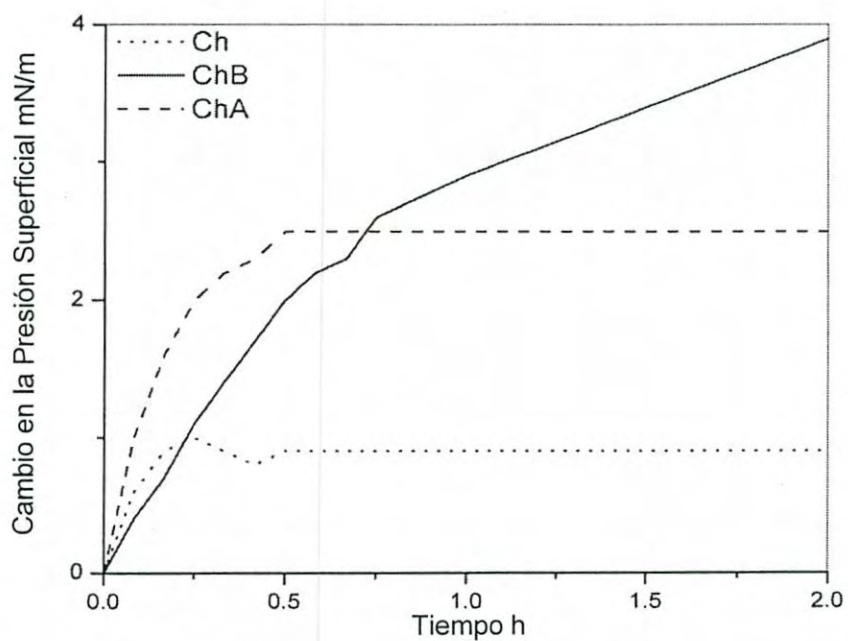


Figura 18. Cambio de presión de la monocapa de DPPC después de la inyección de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB. (Presión inicial de la monocapa: 25 mN/m).

Considerando que tanto el tamaño como el potencial zeta de las nanopartículas de los tres tipos de quitosanos usados en este trabajo son muy similares a pH de 7.4 (3-5 mV y 230-260 nm, respectivamente), suponemos que la diferencia en la interacción membrana celular-nanopartículas está regulada exclusivamente por el carácter hidrofóbico de los quitosanos modificados.

Podríamos considerar que la presencia de las cadenas alquilo en los quitosanos modificados puede promover interacciones hidrofóbicas inter e intra-cadena, provocando la formación de nichos de cadenas hidrofóbicas en el interior de las nanopartículas. Los resultados obtenidos con el modelo de membrana sugieren que una vez que las nanopartículas de quitosano modificado entran en contacto con la monocapa, las nanopartículas se deforman, originándose cambios estructurales, en donde las cadenas hidrofóbicas se orientan hacia la interfase, anclándose a la monocapa fosfolipídica.

5.4 Imágenes de microscopía de fluorescencia.

Cuando las nanopartículas, usadas como sistemas de liberación controlada, alcanzan el tejido tumoral, ellas pueden liberar las moléculas cargo en el espacio extracelular o pueden ser internalizadas por las células y liberar los medicamentos en el citoplasma. El objetivo de visualizar a las células tratadas con las nanopartículas de quitosano por microscopía de fluorescencia es determinar la manera en que se da la interacción célula-nanopartículas y de esa manera tener un entendimiento más claro acerca del comportamiento de estas nanopartículas como sistemas de liberación controlada de fármacos anticancerígenos. Los experimentos solo se limitan a visualizar si las nanopartículas son endocitadas o solo interactúan con la membrana celular de las líneas celulares utilizadas.

Las figuras 19, 20 y 21 muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia de las líneas celulares Arpe-19, HeLa y MDA-MB-231, respectivamente, después de 4 horas de incubación con las nanopartículas construidas de FCh, FChA y FChB; las imágenes muestran las células antes (Paneles A) y después (Paneles B) de la incubación con azul de tripan. En la figura 19 se puede observar que la intensidad de la fluorescencia es mucho menor cuando las células fueron incubadas con azul de tripan, indicando que la mayor parte de las nanopartículas interactúan con la membrana celular; claramente las nanopartículas de FCh (Panel B1) son

internalizadas en mayor grado que las nanopartículas de FChA y FChB (Paneles B2 y B3, respectivamente), las células tratadas con estas últimas no muestran fluorescencia significativa.

Este resultado es sumamente interesante y puede relacionarse con los resultados obtenidos en el modelo de membrana de DPPC donde se observa una interacción más fuerte entre la monocapa y las nanopartículas de ChA y ChB. Aparentemente las cadenas hidrofóbicas unidas al quitosano promueven una mayor interacción con la membrana impidiendo el proceso de endocitosis en las células no cancerosas Arpe-19.

Las figuras 20 y 21 muestran que las nanopartículas de FCh también son internalizadas por las células cancerosas HeLa y MDA-MB-23, sin embargo, contrario a lo observado en las células Arpe-19, en ambos casos se observa que las nanopartículas de FChA y FChB también son endocitadas y aparecen en el citoplasma de las células. Es probable que las células cancerosas presente un mayor grado de endocitosis comparado con las células normales. Más experimentos con un mayor grado de profundidad son necesarios para comprender este fenómeno.

Estos resultados pueden explicarse considerando que las nanopartículas de quitosano sin modificar no sufren cambios a nivel estructural, es decir, la estructura de la nanopartícula permanece en una forma cuasi-esférica cuando alcanzan la membrana celular, esto facilita su endocitosis, mientras que las nanopartículas de los dos quitosanos modificados no pueden ser internalizadas con tanta facilidad debido a que se deforman cuando entran en contacto con la bicapa lipídica, como lo sugiere los resultados con el modelo de membrana. De esta manera la presencia de las cadenas hidrofóbicas pueden obstaculizar el proceso de endocitosis de las nanopartículas de los quitosanos modificados.

El aumento en la internalización observado en el caso de las células cancerosas, comparado con la internalización llevada a cabo por células normales, puede explicarse en términos del índice metabólico de estas células, de cualquier manera, el grado de internalización es menor en las nanopartículas de los quitosanos modificados en relación a las construidas a partir del quitosano no modificado.

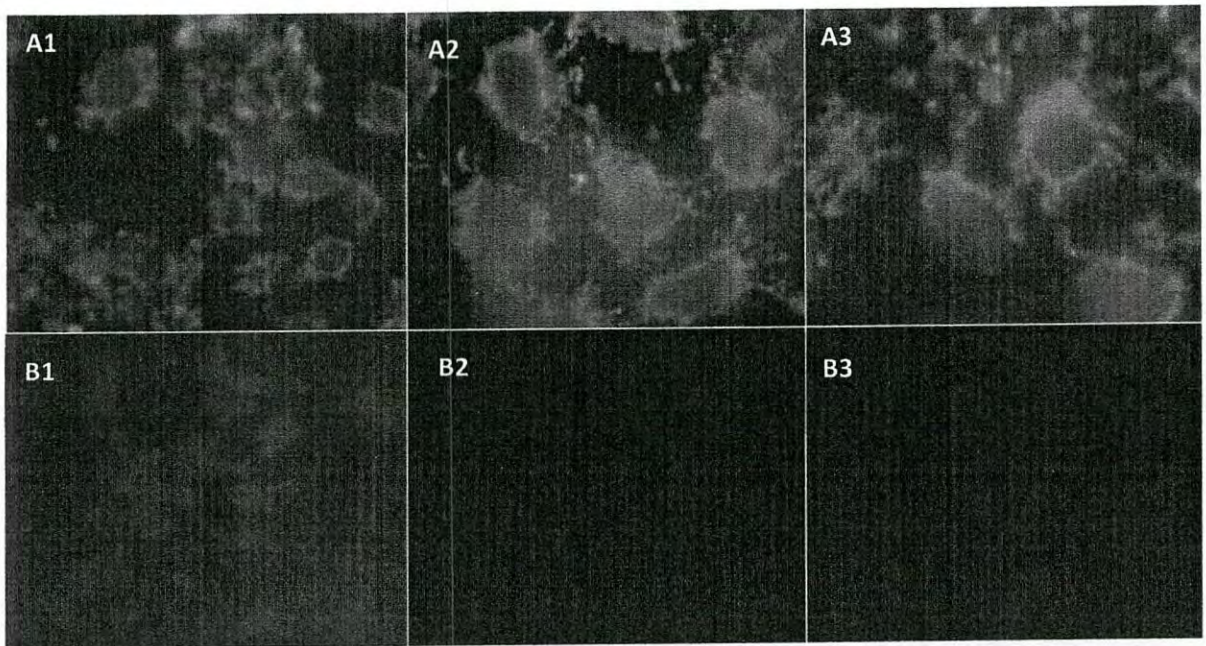


Figura 19. Imágenes de microscopía de Fluorescencia de las células Arpe-19 después de 4 horas de incubación con las nanopartículas fluorescentes (A) antes y (B) después de incubarlas con una solución de azul de tripan (400 µg/ml). A1 y B1) FCh, A2 y B2) FChA, A3 y B3) FChB.

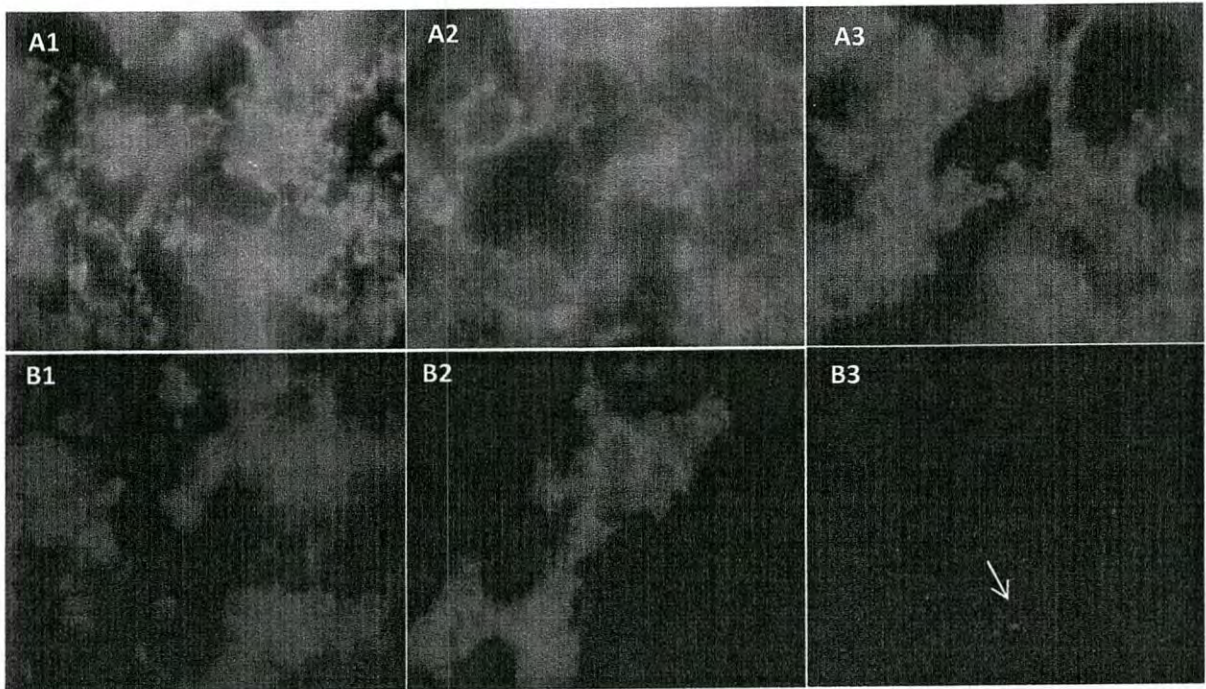


Figura 20. Imágenes de microscopía de Fluorescencia de las células HeLa después de 4 horas de incubación con las nanopartículas fluorescentes (A) antes y (B) después de incubarlas con una solución de azul de tripan (400 $\mu\text{g/ml}$). A1 y B1) FCh, A2 y B2) FChA, A3 y B3) FChB.

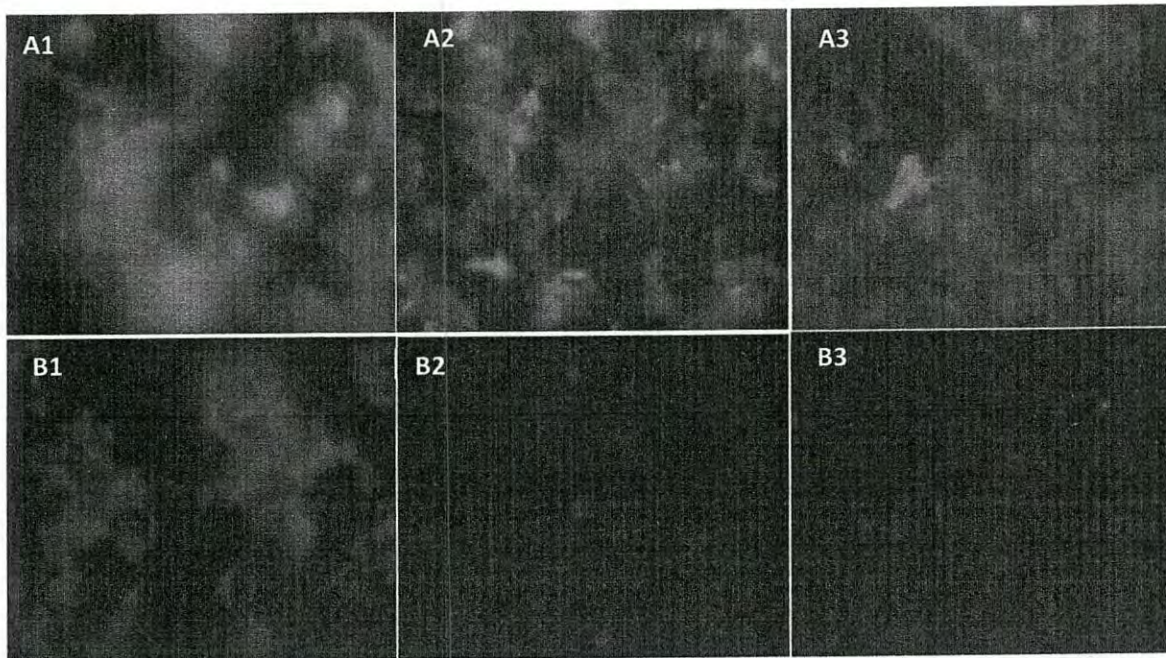


Figura 21. Imágenes de microscopía de Fluorescencia de las células MDA-MB-231 después de 4 horas de incubación con las nanopartículas fluorescentes (A) antes y (B) después de incubarlas con una solución de azul de tripan (400 $\mu\text{g/ml}$). A1 y B1) FCh, A2 y B2) FChA, A3 y B3) FChB.

5.5 Efecto citotóxico de las nanopartículas

Los resultados del efecto citotóxico de las nanopartículas preparadas a partir de Ch, ChA y ChB sobre las líneas celulares Arpe-19, HeLa y MDA-MB-231 se muestran en la figura 22. Se puede observar que las células no cancerosas (Arpe-19) fueron menos susceptibles que las dos líneas células cancerosas (HeLa y MDA-MB-231) para los tres tipos de nanopartículas probadas ($p < 0.05$). Qi *et al.* (2005a) observaron que nanopartículas de quitosano ejercieron un gran efecto citotóxico en las líneas cancerosas BEL7402, BGC823 y Colo320 pero no observaron efecto alguno en la línea no cancerosa L-02. Se ha reportado con anterioridad que diferentes moléculas de quitosanos nativos y modificados han mostrado este tipo de especificidad hacia células cancerosas (Lee *et al.*, 2002; Wimardani *et al.*, 2012).

En relación a las nanopartículas de Ch, las imágenes de fluorescencia de la figura 19 muestran que las nanopartículas preparadas a partir de ese polímero son internalizadas por células cancerosas. Sin embargo, los resultados de citotoxicidad de la figura 22 muestra que la internalización de las nanopartículas no es un factor importante para provocar la muerte celular o la detención del crecimiento, esto sugiere que la endocitosis de las nanopartículas de quitosano no está relacionada con la actividad citotóxica, este resultado ha sido reportada previamente en otros estudios (Huang *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2011).

En lo que respecta al tipo de nanopartículas probadas, se puede observar que aquellas construidas a partir de los quitosanos modificados, muestran un ligero incremento de la citotoxicidad sobre las dos células cancerosas, en comparación con el quitosano no modificado, el efecto citotóxico de las nanopartículas de los dos quitosanos modificados son similares ($p < 0.05$). Lee *et al.* (2002) evaluaron el efecto citotóxico de una serie de quitosanos derivatizados con diferentes grados de hidrofobicidad y encontraron que el efecto citotóxico aumentó conforme incrementaba la hidrofobicidad del polímero, debido a que los grupos hidrofóbicos promueven la interacción entre el quitosano y la membrana celular.

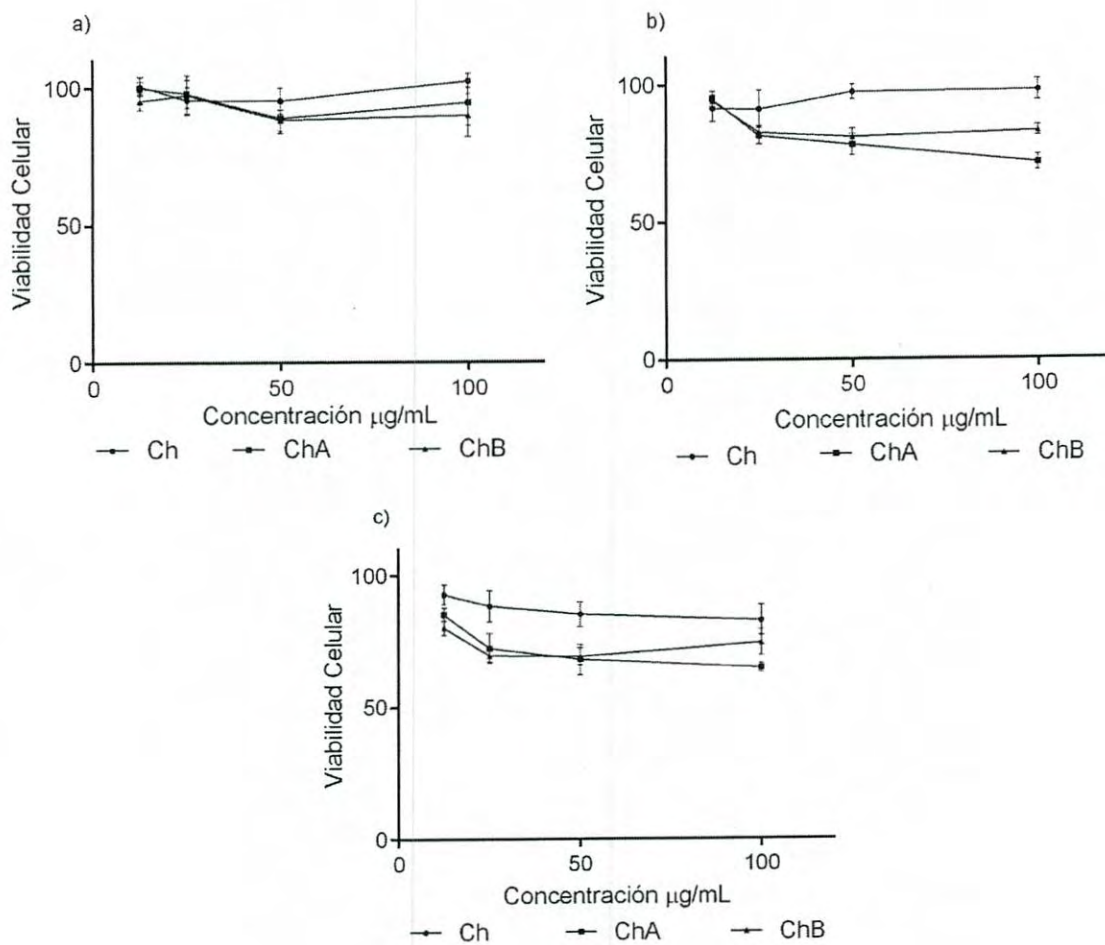


Figura 22. Efecto citotóxico de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB sobre las líneas celulares a) Arpe-19, b) HeLa y c) MDA-MB231.

T-160197

Dado que los valores del potencial zeta de los tres tipos de nanopartículas usadas aquí son relativamente bajos a un pH de 7.4, las interacciones hidrofóbicas entre el quitosano y la membrana celular juegan un papel muy importante y podrían estar asociadas con el aumento de la citotoxicidad observada en el caso de las nanopartículas de ChA y ChB. La mayor interacción de los quitosanos hidrofóbicos con la membrana es corroborada con los resultados obtenidos a través de los experimentos con el modelo de membrana.

Aparentemente el efecto citotóxico de las nanopartículas usadas en esta investigación es más pequeño que el obtenido en trabajos previos. Qi *et al.* (2005a) obtuvieron una serie de concentraciones inhibitorias 50 (IC₅₀) entre 15 y 28 µg/ml cuando probaron nanopartículas de un tamaño promedio de 40 nm sobre tres líneas celulares cancerosas. Además, este grupo de investigación reportó que unas nanopartículas de quitosano de un tamaño de 65 nm mostraron una IC₅₀ de 5.3 µg/ml sobre una línea celular de cáncer gástrico (Qi *et al.*, 2005b). Luo *et al.* (2010) mostraron que nanopartículas de 40 nm construidas a partir de N-Succinil quitosano presentaron una IC₅₀ de 9.783 µg/ml sobre la línea celular cancerosa K562.

Se ha sugerido que el efecto citotóxico de las nanopartículas de quitosano está relacionado con el tamaño de las mismas, aparentemente las nanopartículas más pequeñas ejercen un mayor efecto citotóxico (Qi *et al.*, 2005a). Huang *et al.*, (2004) evaluaron la citotoxicidad de nanopartículas con un tamaño promedio de entre 109 y 387 nm construidas a partir de quitosanos con diferentes pesos moleculares y grados de acetilación sobre las células A549, una línea celular de cáncer pulmonar, demostrando que ningún tipo de nanopartículas preparadas ejerció efecto alguno a concentraciones tan altas como de 741 µg/ml. Zheng *et al.* (2011) evaluaron el efecto citotóxico de nanopartículas de quitosano con un tamaño promedio de 126±18 nm y reportaron que no se observó efecto citotóxico sobre las células CaCo-2 a concentraciones menores o iguales a 2 mg/ml.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son comparables a los obtenidos por estos últimos dos autores en lo que respecta al tamaño de nanopartículas utilizado y los resultados del efecto citotóxico obtenidos, sobre todo para las nanopartículas de Ch, sin embargo, en el caso de las nanopartículas de ChA y ChB, se observó un incremento en dicho efecto, sobre todo en las células cancerosas.

El efecto citotóxico de las nanopartículas de los quitosanos hidrofóbicos puede deberse al aumento en la interacción membrana celular-nanopartículas, en donde la presencia de las cadenas hidrofóbicas en las nanopartículas del quitosano promueven una mayor perturbación de la membrana celular y esto a su vez puede detener la proliferación e incluso conducir a la muerte celular.

Es interesante notar que las cadenas hidrofóbicas no tuvieron un efecto importante en las células no cancerosas tratadas con las nanopartículas, esto puede deberse a que las nanopartículas no tienen un efecto real sobre estas células o bien puede relacionarse con el índice metabólico más lento de estas en relación a las dos células cancerosas. Considerando los resultados de endocitosis y del modelo de membrana se puede hipotetizar que las nanopartículas de los quitosanos hidrofóbicos se encuentran en un estado amorfo cubriendo una gran parte de la superficie celular y ello podría obstaculizar el flujo de nutrientes necesarios para el óptimo crecimiento celular.

VI CONCLUSIONES

Se logró obtener nanopartículas de quitosano modificado hidrofóbicamente de un tamaño adecuado para ser utilizadas como sistemas de liberación controlada de compuestos quimioterapéuticos.

El efecto citotóxico de las nanopartículas de Ch, ChA y ChB fue relativamente leve, sin embargo, las células cancerosas fueron más susceptibles a los tres tipos de nanopartículas y las cadenas hidrofóbicas unidas a los quitosanos modificados incrementaron de manera significativa el efecto en estas células. La hidrofobicidad de los quitosanos no provocó un aumento en la actividad citotóxica sobre las células no cancerosas. La carga efectiva de los tres tipos de nanopartículas fue igual, esto sugiere que las interacciones electrostáticas no desempeñan un papel importante en la actividad citotóxica.

El tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas etiquetadas con fluoresceína fueron relativamente similares a las de aquellas no etiquetadas. Aparentemente las células cancerosas presentaron un proceso de internalización en un grado mayor en relación a las células no cancerosas; además, al parecer, la presencia de las cadenas hidrofóbicas obstaculiza de alguna manera dicho proceso.

Los estudios con modelos de membrana mostraron que las cadenas hidrofóbicas en los quitosanos modificados promueven una interacción más fuerte de las nanopartículas con las moléculas anfífilas de la monocapa, aparentemente este fenómeno no está relacionado con un aumento en la endocitosis pero si es posible que exista una relación con el efecto citotóxico de las nanopartículas. Aparentemente el incremento en la citotoxicidad de las células tratadas con las nanopartículas de quitosano hidrofóbico se relaciona con una interacción con la membrana celular antes que con un posible efecto dentro de la célula.

En este trabajo se mostró que es posible preparar nanopartículas de quitosanos modificados de un tamaño adecuado para ser utilizadas potencialmente como sistema de liberación controlada de medicamentos para el tratamiento de pacientes con cáncer. Además, los resultados sugieren que podría haber un potenciamiento del efecto terapéutico de los medicamentos suministrados

mediante este sistema de liberación debido a la aparente actividad anticancerígena mostrada por dichas nanopartículas.

VII RECOMENDACIONES

El presente trabajo abre un panorama amplio para futuras investigaciones encaminadas, en primer lugar, a estudiar de manera más precisa como las cadenas hidrofóbicas modifican la manera en que las nanopartículas interactúan con las células. En segundo lugar, se requiere estudiar la asociación de diversos quimioterapéuticos con las nanopartículas para observar si las cadenas hidrofóbicas de los quitosanos promueven una mayor asociación y si se mejoran la cinética de liberación como se sugiere en el proyecto integral de investigación, del cual este trabajo solo es una pequeña parte.

Para investigar la interacción de las nanopartículas con las células es posible hacer estudios más exhaustivos en relación al proceso de endocitosis, incluyendo la cuantificación de la endocitosis para corroborar si efectivamente la presencia de las cadenas hidrofóbicas en las nanopartículas provoca una disminución en la endocitosis como lo sugieren los resultados cualitativos mostrados en este trabajo. También es necesario estudiar el efecto de las nanopartículas en modelos de membrana que asemejen en la medida de lo posible a las membranas celulares particulares de cada célula.

Para investigar lo propuesto en segundo lugar se sugiere utilizar algún tipo de quimioterapéutico convencional como doxorrubicina, paclitaxel o cis-platino, sin embargo, es importante señalar que en estudios preliminares hechos en el marco de este trabajo se observó que en el caso particular de doxorrubicina se presentaron ciertos problemas para realizar la asociación, se sugiere que esto se puede deber al balance hidrofílico/hidrofóbico que presenta esta molécula, a un pH bajo el grupo amino presente en ella se encuentra protonado, esto provoca que, bajo las condiciones en las que se prepararon las nanopartículas, exista una fuerte repulsión electrostática entre las moléculas de quitosano y doxorrubicina. Por otro lado, aparentemente la eficiencia de formación de las nanopartículas fue relativamente baja (menor del 50 %), esto puede provocar una asociación de doxorrubicina todavía menor. Se sugiere que, en primer lugar, se intente mejorar la eficiencia de formación de las nanopartículas modulando las condiciones bajo las cuales se preparan y en segundo lugar, utilizar un anticancerígeno diferente de doxorrubicina.

Una vez realizados los estudios *in vitro* de las nanopartículas con el fármaco asociado se sugiere realizar estudios en modelos animales para estudiar la biodistribución y la eficacia del potencial tratamiento. También se sugieren otras modificaciones al sistema como recubrirlo con polietilenglicol (PEG) para prolongar el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo, y asociarle residuos de folatos en la superficie para promover su endocitosis.

Como se puede observar son innumerables las perspectivas para futuras investigaciones con el sistema desarrollado en este trabajo, cualquier modificación del sistema, por más leve que esta sea, hace necesario el estudio detallado del efecto de dicha modificación en las características biofísicas de las nanopartículas.

VIII LITERATURA CITADA

- Bobu, E., R. Nicu, M. Lupei, F. Ciolacu y J. Desbrières. 2011. Synthesis and characterization of N-alkyl chitosan for papermaking applications. *Cellulose Chemistry and Technology*, 45(9-10): 619-625
- Boyle, P. y B. Levin. 2008. *World Cancer Report 2008*.
- Brigger, I., C. Dubernet y P. Couvreur. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: 631-651.
- Calvo, P., C. Remuñan-Lopez, J. L. Vila-Jato y M. J. Alonso. 1997. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63: 125-132
- Coates, J. 2000. *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester.
- Cho, K., X. Wang, S. Nie, Z. Chen y D. M. Shin. 2008. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14: 1310-1316.
- Desbrières, J., C. Martinez y M. Rinaudo. 1996. *International Journal of Biological Macromolecules* 19: 21-28.
- Dutta, P. K., J. Dutta y V. S. Tripathi. 2004. Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63: 20-31.
- Dynarowicz, P., A. Dhanabalan y O. N. Oliveira. 2001. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science* 91: 221-293.
- Feng, S. S. y S. Chien. 2003. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chem Eng Sci*, 58: 4087-4114.
- Garcia-Fuentes, M. y M. J. Alonso. 2012. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *Journal of Controlled Release*, 161: 496-504.
- Hanahan, D. y R. A. Weinberg. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.
- Hasegawa, M., K. Yagi, S. Iwakawa y M. Hirai. 2001. Chitosan Induces Apoptosis via Caspase-3 Activation in Bladder Tumor Cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 459-466.

- Hobbs, S. K., W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin y R. K. Jain. 1998. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Medical Sciences*, 95: 4607–4612.
- Hryniuk, W. A. 1987. Applications of dose intensity to problems in chemotherapy of breast and colorectal cancer. *Semin Oncol*, 11: 3-11.
- Huang, M., E. Khor y L. Y. Lim. 2004. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2): 344-353.
- Huang, M., Z. Ma, E. Khor y L. Y. Lim. 2002. Uptake of FITC-Chitosan Nanoparticles by A549 Cells. *Pharmaceutical Research*, 19(10): 1488-1494.
- Iversena, T. G., T. Skotlanda y K. Sandvig. 2011. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6: 176-185.
- Janes, K. A., M. P. Fresneau, A. Marazuela, A. Fabra y M. J. Alonso. 2001. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, 73 255–267.
- Jia, X., X. Chen, Y. Xu, X. Han y Z. Xu. 2009. Tracing transport of chitosan nanoparticles and molecules in Caco-2 cells by fluorescent labeling. *Carbohydrate Polymers*, 78: 323-329.
- Karagozlua, M. Z., J. A. Kima, F. Karadeniza, C. S. Kongb y S. K. Kima. 2010. Anti-proliferative effect of aminoderivatized chitooligosaccharides on AGS human gastric cancer cells. *Process Biochemistry* 45: 1523–1528.
- Lee, J. K., H. S. Limb y J. H. Kim. 2002. Cytotoxic Activity of Aminoderivatized Cationic Chitosan Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12: 2949–2951.
- Lee, S. H., B. Ryu, J. Y. Je y S. K. Kim. 2011. Diethylaminoethyl chitosan induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase-3 and p53 expression. *Carbohydrate Polymers* 84: 571–578.
- Loh, J. W., G. Yeoh, M. Saunders y L. Y. Lim. 2010. Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249: 148–157.
- López-León, T., E. L. Carvalho, B. Seijo, J. L. Ortega-Vinuesa y D. Bastos-González. 2005. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283: 344–351.

- Luo, H., J. Li y X. Chen. 2010. Antitumor effect of N-succinyl-chitosan nanoparticles on K562 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 64: 521–526.
- Maeda, H. 2001. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor selective macromolecular drug targeting. *Advan. Enzyme Regul.*, 41: 189–207.
- Maget-Dana, R. 1999. The Monolayer Technique: a Potent Tool for Studying the Interfacial Properties of Antimicrobial and Membrane-lytic Peptides and their Interactions with Lipid Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462: 109-140.
- Marchiò, C. y J. Reis-Filho. 2008. Molecular diagnosis in breast cancer. *Diagnostic Molecular Pathology*: 202-212.
- Mehrotra, A., R. C. Nagarwal y J. K. Pandit. 2011. Lomustine Loaded Chitosan Nanoparticles: Characterization and in-Vitro Cytotoxicity on Human Lung Cancer Cell Line L132. *Chem. Pharm. Bull.*, 59(3): 315-320
- Merina, N., K. J. Chandra y K. Jibon. 2012. Medicinal plants with potential anticancer activities: a review. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(6): 26-30.
- Mobarak, N. N. y M. P. Abdullah. 2010. Synthesis and characterization of several lauryl chitosan derivatives. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 14(2): 82 - 99.
- Parra-Barraza, H., M. G. Burboa, M. Sánchez-Vásquez, J. Juárez, F. M. Goycoolea y M. A. Valdez. 2005. *Biomacromolecules*, 6: 2416-.
- Patel, M. P., R. R. Patel y J. K. Patel. 2010. Chitosan Mediated Targeted Drug Delivery System: A Review. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 13 (3): 536-557.
- Pavinatto, F. J., L. Caseli, A. Pavinatto, D. S. d. Santos, T. M. Nobre, M. E. D. Zaniquelli, H. S. Silva, P. B. Miranda y O. N. Oliveira. 2007a. Probing Chitosan and Phospholipid Interactions Using Langmuir and Langmuir-Blodgett Films as Cell Membrane Models. *Langmuir*, 23 7666-7671.
- Pavinatto, F. J., A. Pavinatto, L. Caseli, D. S. d. Santos, T. M. Nobre, M. E. Zaniquelli y O. N. Oliveira. 2007b. Interaction of Chitosan with Cell Membrane Models at the Air-Water Interface. *Biomacromolecules* 8: 1633-1640.
- Peer, D., J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit y R. Langer. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2: 751-760.
- Peetla, C., A. Stine y V. Labhasetwar. 2009. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm.*, 6(5): 1264–1276.

- Praetorius, N. P. y T. K. Mandal. 2007. Engineered Nanoparticles in Cancer Therapy. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 1: 37-51.
- Qi, L., Zirong Xu, X. Jiangç, Y. Li y M. Wang. 2005a. Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , 15: 1397–1399.
- Qi, L. F., Z. R. Xu, Y. Li, X. Jiang y X. Y. Han. 2005b. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World J Gastroenterol* 11(33): 5136-5141.
- Robles, E., E. Villar, M. Alatorre-Meda, M. G. Burboa, M. A. Valdez, P. Taboada y V. Mosquera. 2012. Effects of the Hydrophobization on Chitosan–Insulin Nanoparticles Obtained by an Alkylation Reaction on Chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.*, 129: 822–834.
- Shaji, J., V. Jain y S. Lodha. 2010. Chitosan: A Novel Pharmaceutical Excipient. *International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 1(1): 11-28.
- Sinha, R., G. J. Kim, S. Nie y D. M. Shin. 2006. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther*, 5(8): 1909-1917.
- Takimoto, H., M. Hasegawa, K. Yagi, T. Nakamura, T. Sakaeda y M. Hirai. 2004. Proapoptotic effect of a dietary supplement: water soluble chitosan activates caspase-8 and modulating death receptor expression. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19(1): 76-82.
- Tan, M. L., F. M. Peter, C. Dass y C. R. Dass. 2009. Cancer, chitosan nanoparticles and catalytic nucleic acids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61: 3-12.
- Tien, C. L., M. Lacroix, P. Ispas-Szabo y M. A. Mateescu. 2003. N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release. *Journal of Controlled Release* 93: 1–13.
- Tiyaboonchai, W. 2003. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal*, 11(3): 51-66.
- Torchilin, V. P. 2007. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. *The AAPS Journal*, 9(2): E128-E147.
- Trapania, A., J. Sitterberg, U. Bakowsky y T. Kisse. 2009. The potential of glycol chitosan nanoparticles as carrier for low water soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 375: 97–106.
- Wang, J. J., Z. W. Zeng, R. Z. Xiao, T. Xie, G. L. Zhou, X. R. Zhan y S. L. Wang. 2011. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine* 6 765–774.

- Wimardani, Y. S., D. F. Suniarti, H. J. Freisleben, S. I. Wanandi y M. A. Ikeda. 2012. Cytotoxic effects of chitosan against oral cancer cell lines is molecular-weight-dependent and cell-type-specific. *International Journal of Oral Research*, 3: 1-10.
- Xu, Q., J. Dou, P. Wei, C. Tan, X. Yun, Y. Wu, X. Bai, X. Ma y Y. Du. 2008. Chitooligosaccharides induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of Bax. . *Carbohydrate Polymers*, 71: 509–514.
- Zheng, A. p., H. x. Liu, L. Yuan, M. Meng, J. C. Wang, X. Zhang y Q. Zhang. 2011. Comprehensive studies on the interactions between chitosan nanoparticles and some live cells. *J Nanopart Res*, 13: 4765–4776.