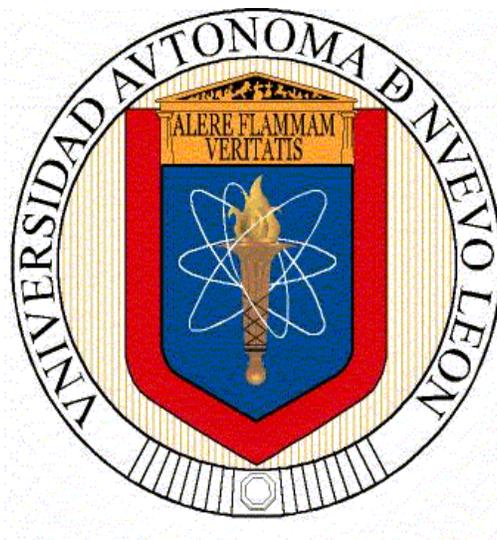


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CONSTRUCCIÓN DE NANOCOMPLEJOS BASADOS EN PARTÍCULAS
MAGNÉTICAS, QUITOSÁN Y UN PLÁSMIDO CON SECUENCIAS DE
RESPUESTA A CAMPOS MAGNÉTICOS PARA
MEJORAR LA TRANSFECCIÓN**

POR

TEODORA CAVAZOS VALLEJO

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

DICIEMBRE, 2013

**CONSTRUCCIÓN DE NANOCOMPLEJOS BASADOS EN PARTÍCULAS
MAGNÉTICAS, QUITOSÁN Y UN PLÁSMIDO CON SECUENCIAS DE
RESPUESTA A CAMPOS MAGNÉTICOS PARA
MEJORAR LA TRANSFECCIÓN**

Comité de Tesis

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Director de Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

**CONSTRUCCIÓN DE NANOCOMPLEJOS BASADOS EN PARTÍCULAS
MAGNÉTICAS, QUITOSÁN Y UN PLÁSMIDO CON SECUENCIAS DE
RESPUESTA A CAMPOS MAGNÉTICOS PARA
MEJORAR LA TRANSFECCIÓN**

Comité Académico de Maestría

Subdirector de Estudios de Postgrado

DEDICATORIA

A mis padres Héctor Cavazos Durán y Pety Vallejo Alejo por ser ejemplos de fortaleza y perseverancia y su inmenso apoyo en esta etapa de mi vida, con gratitud, admiración y amor. A mis abuelos Juan Cavazos Garza, Teodora Duran Saucedo, Agustina Vallejo y Francisco Vallejo por ser siempre también un magnífico ejemplo de vida.

A mi esposo Luis Jorge Díaz Santana Reyes con amor y agradecimiento por su constante apoyo durante la realización de este proyecto.

A mis hermanos Erika, Valeria, Héctor, Yalilee, Judith y Eloina, por su valioso tiempo a mi lado desde pequeños y por su apoyo en todo momento, además dedico también este escrito a mis nuevos sobrinos Rebeca Estavillo Cavazos y Gabriel Lore Cavazos con quienes tendremos muchas experiencias para compartir cuando crezcan; con cariño y amor a toda mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento, primeramente a Dios porque me permitió terminar este proyecto junto a mis seres queridos, mis papitos preciosos, Héctor Cavazos Duran y Pety Vallejo Alejo, de quienes aprendí muy buenos valores, y a saber que todo en esta vida se obtiene mediante mucho trabajo y esfuerzo y quienes predicaron siempre dichos valores con el ejemplo; me siento una mujer muy afortunada de pertenecer a una familia con muchos hermanos: Erika, Valeria, Héctor, Yalilee, Judith, Eloina con quienes jugué de niña infinidad de veces y con quienes he compartido muchísimos momentos muy buenos, agradezco también muy profundamente a mi esposo Luis Jorge Díaz quien me ha brindado su amor y apoyo incondicional todo este tiempo, gracias a todos por estar ahí y a los que ya no están: mis abuelitos y seres queridos que se que desde el Cielo me siguen apoyando.

Agradezco muy en especial a mi asesor de tesis de maestría quien también fue un muy buen asesor de tesis de Licenciatura el Dr. Juan Manuel Alcocer González y un gran amigo, quien me ha brindado en todo momento su apoyo para la realización de este proyecto, agradezco su amistad, su valiosa crítica al proyecto, las facilidades de reactivos, equipos y por darme libertad de hacer algunos cambio, gracias por todo!

Agradezco a todas las personas que me apoyaron en su momento a la realización de este proyecto, en especial al Dr. Jorge Luis Hernández Piñero de la Facultad de Ciencias Biológicas por apoyarme en la toma de fotografías al igual que el Dr. Eduardo Pérez Tijerina, Dr. Miguel Ángel Gracia y Dr. Gerardo Silva de la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas. Agradezco también a los Doctores Abelardo Chávez y Sergio Galindo del Departamento de química de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme usar sus instalaciones. Además quiero agradecer también a todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio de inmunología y virología, los cuales me ayudaron muchísimo con su apoyo intelectual y con su amistad, especialmente a Diana Cárdenas, Citlali Chacón, Jeanny Salinas, Itza Luna, Marisol Mosqueda, Dennys Alejandra, Alberto Valadez, Maximiliano Mediana, Claudio, Maestro Maty, Manuel y a todos los del lab L-2 y L-5 y L-6 y a todo el piso en general.

También a mis amigos fuera del lab les agradezco su apoyo: Gaby Ortiz, Laura Isela, Alejandro Zubiato, Rosario de la Garza, Samantha, a todos mis amigos de la Facultad de Biología y en general a todos los que me apoyaron. Agradezco a toda la gente involucrada, al comité de tesis, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría (CONACYT), también por su apoyo a la facultad de Ciencias Físico Matemáticas, al CIDIT por su valioso apoyo para la toma de fotografías de microscopía electrónica, a la Facultad de Ciencias Biológicas, a su división de posgrado y al laboratorio de Inmunología y Virología de la facultad, agradezco mucho a perita por esterilizarme el material con el que trabaje todos estos años! Gracias Perys.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	3
4. HIPÓTESIS	4
5. OBJETIVOS	5
5.1 Objetivo general.....	5
5.2 Objetivos particulares.....	5
6. ANTECEDENTES	
6.1 Introducción a la nanotecnología.....	6
6.2 Importancia económica de la nanobiotecnología y de nuevos nanoacarreadores de drogas	6
6.3 Campos magnéticos.....	7
6.3.1 Clasificación de campos magnéticos.....	8
6.3.1.1 Campos electromagnéticos estáticos.....	8
6.3.1.2 Campos electromagnéticos oscilantes.....	8
6.3.2 Clases de magnetización.....	10
6.3.3 Unidades de medida del magnetismo	11
6.4 Efecto de campos magnéticos en seres vivos.....	11
6.4.1 Radiaciones ionizantes y no ionizantes.....	13
6.4.2 Campos magnéticos estáticos y cáncer.....	15
6.5 Nanopartículas magnéticas en medicina e investigación	
6.5.1 Principales usos de las nanopartículas magnéticas en biología y medicina.....	16
6.5.1.1 Separación magnética por purificación e inmunoensayos	16
6.5.1.2 Imagen por resonancia magnética y diagnóstico.....	17
6.5.1.3 Hipertermia.....	17

6.5.2 Principales usos de las nanopartículas magnéticas en investigación	19
6.5.2.1 Nanopartículas magnéticas en terapia génica.....	19
6.6 Toxicidad de nanopartículas en sistemas biológicos.....	20
6.7 Uso de promotores inducibles en terapia génica	22
6.8 Polímeros de quitosán para la entrega de drogas y/o genes.....	23
6.9 Toxicidad del quitosán	25
7. METODOLOGÍA	
7.1 Transformar plásmido pCEM y pNFkB-luc en <i>E.coli</i>	27
7.1.1 Preparación de bacterias calcio competentes DH5 α para transformación	27
7.1.2. Trasformación de bacterias con el plásmido pCEM y pNFkB-luc.....	27
7.1.3. Plaqueado de bacterias transformadas para selección de colonias.....	28
7.1.4. Mini prep rápido, para selección de clonas con el inserto.....	28
7.1.5. Crecimiento de clonas seleccionadas	28
7.1.6. Mini prep.....	29
7.2. Caracterización enzimática del plásmido y secuenciación	
7.2.1 Digestión parcial de pCEM mediante las enzimas Kpn I y HindIII.....	29
7.2.2.- Secuenciación del plásmido pCEM.....	29
7.2.3 Maxiprep con kit de invitrogen para obtener grandes cantidades de pCEM y pNFkB-luc.....	30
7.3.- Estandarización de fabricación de nanopartículas magnéticas/ plásmido para usar en transfección	30
7.3.1.-Protocolo para ajustar la cantidad de PolyMAG (nanopartículas magnéticas) deseadas para la transfección.....	31
7.3.1.1 Elaboración de complejo nanopartículas-plásmido	31
7.3.2.-Detección de la expresión de la luciferasa por luminometría.....	32
7.4.- Complejos con quitosán insoluble en agua.	33
7.4.1. Preparación de quitosán insoluble en agua:.....	33
7.4.2.-Preparación de complejos de quitosán insoluble en agua y plásmido	33
7.4.3.- Gel de retardo para observar el retenimiento o migración del pDNA en los complejos de quitosán:plásmido.....	34
7.4.4 Elaboración de complejos de plásmido-nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán para la fabricación del complejo (npq).....	34
7.4.5. Caracterización de los complejos:.....	35
7.4.5.1 Caracterización por microscopía electrónica.....	35
7.4.5.2. Obtención de potencial Z y tamaño.....	35
7.4.6. Evaluación de la respuesta a campos magnéticos (CM) in vitro mediante la transfección del complejo (npq) en líneas celulares.....	36
7.4.6.1.-Transfección del complejo nanopartículas-plásmido	

8.7. Experimentos de transfección de la línea B16f10 con complejos PQ y NPQ con quitosán insoluble en agua marcado con FITC.....	60
8.8 Experimentos de transfección de los plásmidos pCEM y pNFkb-Luc en la línea HeLa.....	62
8.9. Experimentos de transfección de la línea B16f10 con complejos plásmido-partículas magnéticas y quitosán insoluble en agua.....	63
8.10. Estandarización de transfección con PolyMAG.....	64
8.11. Experimentos de transfección de la línea HeLa con complejos plásmido- quitosán soluble en agua	69
9. DISCUSIÓN.....	81
10. CONCLUSIONES.....	85
11. APÉNDICE.....	87
12. LITERATURA CITADA.....	89
13. RESUMEN CURRICULAR.....	100

LISTADO DE TABLAS

Tabla	Página
I. Grados de magnetización.....	10
II. Formulación para radios de peso (plásmido: Novafect).....	37
III. Formulación para radios de peso (plásmido: coyote Foods).....	39
IV. Resultados de pontencial Z de complejos con quitosan insoluble...	51
V. Resultados de potencial Z de complejos con quitosan soluble	52
VI. Resultados de tamaños de complejos con quitosan insoluble con y sin partículas magnéticas.....	53
VII. Resultados de tamaños de complejos con quitosan soluble con y sin partículas magnéticas.....	55
VIII. Resultados de transfeccion de pCEM & pNFkB-luc	62
IX. Resultados de transfección de pCEM con Polymag a diferentes radios	64
X. Resultados de transfección de pCEM con Polymag (1:1.5) a diferentes radios de quitosan	66
XI. Resultados en URL de transfección con pCEM con Polymag (1:1.5) a un radio de 2:1 con y sin campo magnetico (transfección B16F10/24 hrs).....	67
XII. Resultados de URL de transfección de pCEM con O15 lecturas 24, 48 y 72 hrs.....	70
XIII. XII. Resultados en URL de transfección de PCEM O15 a diferentes radios	71
XIV. Resultados de URL de transfección de pCEM O25 a diferentes radios.....	72
XV. Resultados de URL de transfección de pCEM - COYOTE a diferentes radios	73

XVI.	Resultados de URL de transfección de pCEM con diferentes acarreadores comerciales y de prueba.....	74
XVII.	Resultados en URL de transfección de pCEM con partículas magnéticas PolyMAG a diferentes radios de quitosan O15.....	75
XVIII.	Resultados en URL de transfección de pCEM con partículas magnéticas CombyMAG a diferentes radios de quitosan O15.....	76
XIX.	Resultados en URL de transfección de pCEM con diferentes dosis de partículas magnéticas CombyMAG y quitosan O15 a un radio de 60:1.....	77
XX.	Comparativa de resultados de transfección NPQ y PQ con O15.....	77
XXI.	Resultados en URL de transfección de pCEM con diferentes dosis de partículas magnéticas CombyMAG y quitosan O25 a un radio de 60:1.....	78
XXII.	Resultados en URL de transfección de pCEM con diferentes dosis de partículas magnéticas CombyMAG y quitosan COYOTE a un radio de 40:1.....	79
XXIII.	Resultados en URL de transfección de pCEM acompañado con quitosan (60:1) y CombyMAG (0.1µl) preparados en diferente ordean.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Longitudes de onda de radiaciones electromagnéticas de baja y alta energía..	8
2. Espectro electromagnético.....	13
3. Clasificación de utensilios de la vida diaria por sus longitudes de onda emitidas.....	14
4. Comparativa de quitosán con otras moléculas similares	25
5. Mapa con sitios de restricción de pCEM Y pNFk β -Luc.....	28
6. MagnetoFACTOR plate de Chemicell® de 96 pozos.....	32
7. Digestión de pCEM con Hind III y Kpn I.....	40
8. Digestión de pNFk β -luc con Hind III y Nhe I.....	41
9. Resultado de secuenciación plásmido pCEM.....	42
10. Comparación de secuencias de promotores en HSP70 y CEM.....	42
11. Microscopia electrónica y de fuerza atómica de CombyMAG.....	43
12. Maxiprep de pCEM-1.....	43
13. Maxiprep de pNFk β -Luc.....	43
14. Gel de retardo. Complejos quitosán insoluble/plásmido A.....	44
15. Gel de retardo. Complejos quitosán insoluble/plásmido B.....	44
16. Gel de retardo. Complejos quitosán insoluble/plásmido radio 8:1.....	45
17. Gel de retardo quitasen O15 Novafect (A).....	46
18. Gel de retardo quitosán O15 Novafect (B).....	46
19. Gel de retardo quitosán Novafect O15 pH 5.0.....	46
20. Gel de retardo quitosán Novafect O25 pH 5.0.....	46

21. Gel de retardo quitosán Novafect O15 pH 7.4.....	47
22. Gel de retardo quitosán Novafect O25 pH 7.4.....	47
23. Gel de retardo quitosán Novafect O15 pH 8.4.....	47
24. Gel de retardo de quitosán/plásmido diferentes radios de peso (A).....	48
25. Gel de retardo de quitosán/plásmido diferentes radios de peso (B).....	48
26. Gel de retardo de quitosán/plásmido radio de peso 8:1.....	49
27. Gel de retardo de quitosán Coyote/plásmido a diferentes radios de peso.....	49
28. Gel de retardo quitosán coyote/plásmido, diferentes radios de peso.....	49
29. Gel de retardo de quitosán/plásmido diferentes radios de peso.....	49
30. Gel de retardo quitosán Coyote /plásmido, diferentes radios de peso.....	50
31. Potencial Z de partículas con quitosán insoluble en gua.....	51
32. Potencial Z de partículas con quitosán soluble en agua.....	53
33. Tamaño de partículas de complejos con quitosán insoluble en agua.....	54
34. Tamaño de partículas de complejos con quitosán soluble en agua.....	55
35. Microscopia electrónica de transmisión (TEM) de nano partícula magnéticas CombyMAG.....	56
36. Microscopia electrónica de transmisión (TEM) complejos (NPQ CombyMag).....	56
37. Acercamiento de microscopia electrónica de transmisión (TEM) de complejos (NPQ CombyMag).	56
38. Matriz para TEM con complejos adheridos.....	57
39. Imagen TEM de complejos NQP (QSA) adheridos a la matriz y enfocados..	58
40. Imagen TEM de complejos NQP (QSA) A.....	58
41. Imagen TEM de complejos NQP (QSA) B.....	59
42. Imagen TEM de complejos NQP (QSA) desenfocados.....	59
43. Imagen TEM de complejos NQP (QSA) enfocados.....	60

44. Imagen confocal 30X con filtro 480 nm de células transfectadas con complejos PQ-FITCS	61
45. Imagen confocal 40X con luz visible de células transfectadas con complejos NQP-FITCS	61
46. Imagen confocal 40X de figura 43 con filtro de 480 nm.....	61
47. Comparativa de transfección de pCEM y pNFkB-Luc	62
48. Estandarización de transfección con quitosán insoluble en agua a diversos radios.....	63
49. Transfección de complejos NP con (PolyMAG -pDNA-), radio 1:1.5	65
50. Transfección de complejos NP con (PolyMAG -pDNA-), radio 1:2	65
51. Transfección de complejos NP con (PolyMAG -pDNA-), radio 1:2.5.	65
52. Comparativa de transfección de Complejos pDNA-PolyMAG.....	66
53. Transfección de complejos NPQ con quitosán insoluble y PolyMAG	66
54. Comparación de transfección de complejos NPQ PQ y P.....	67
55. Comparación de transfección de complejos NPQ y PQ	68
56. Estandarización de tiempo de toma de lectura lucifererasa.....	70
57. Transfección con quitosán soluble en agua O15/pCEM.....	71
58. Transfección con quitosán soluble en agua O25/pCEM.....	72
59. Comparación de transfecciones O15 y O25 (PQ).....	72
60. Transfección de line Hela con quitosán Coyote Foods.....	73
61. Estandarización de transfección de pCEM-PolyMAG.	73
62. Comparación de transfecciones de quitosanes de prueba & comerciales.....	74
63. Transfección de complejos NQP con O15/PolyMAG en HeLa.....	75
64. Transfección de complejos NQP con quitosán O15 /CombyMag en HeLa...	76
65. Transfección de NPQ-O15 (60:1) con CombyMAG.....	77
66. Transfección comparativa de complejos O15 con y son CombyMAG.....	79
67. Transfección de NPQ (O25 10:1) con diferentes cantidades de CombyMag.	79

68. Transfección de NPQ (Coyote Foods 40:1) con diferentes cantidades de CombyMag.....	79
69. Transfección de células HeLa con complejos NPQ-Coyote.....	80
70. Comparativa de transfección con reactivos en diferente orden.....	80

NOMENCLATURA

HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
AND	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
H₂O	Agua
CMA	Campo magnético alterno
CEM	Campos electromagnéticos
CM	Campos magnéticos
CACL₂	Carbonato de calcio
VX-2	Carcinoma escamoso celular
CAT	Catalogo
CCLB	Cell Culture Lysis Reagent
Comby	CombyMag
CA	Corriente alterna
CD	Corriente Directa
DLS	Dinamic Light Scattering
EGR-1	Early growth response protein-1
EPA	Enviromet Protection Agency
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EBF	Extremadamente baja frecuencia
Fig.	Figura
FITCS	Fluorescein isothiocyanate
G	Gauss

GP96	Glicoproteina 96
HSP70	Heat Shock Protein 70
Hz	Hercio
hrs	Horas
KDa	Kilo Daltons
LDV	Laser Doppler Velocimetry
LB	Luria Bertani (medio de cultivo)
MFH	Magnetic Fluid Hypertermia
MAX URL	Maxim Unit Relative Light
µg	Microgramos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mT	Militeslas
mV	Milivolts
M	Molaridad
nm	Nanometros
NP	Nanopartícula-plásmido
NPQ	Nanopartícula-plásmido-quitosán
γ-Fe2O3	Oxido de Fierro (maghemita)
Fe3O4	Oxido de Fierro (magnetita)
pb	Pares de bases
PBS 1X	Phosphate Buffered Saline
pCEM	Plásmido pCEM
pNFkB-luc	Plásmido pNFkB-luc

PQ	Plásmido-quitosan
PEI	Polyetilenimina
POLY	PolyMAG
QIA	Quitosan insoluble en agua
QSA	Quitosan soluble en agua
RF	Radio frecuencia
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
Fe2So4	Sulfato de fierro
Na2So4	Sulfato de sodio
SPIO	Superparamagnética de óxido de fierro
USPIO	Superparamagnética de óxido de fierro ultra pequeñas
T	Tesla
TEM	Transmisión Electron Microscopy
URL	Unidades relativas de luz

**CONSTRUCCIÓN DE NANO COMPLEJOS BASADOS EN PARTÍCULAS
MAGNÉTICAS, QUITOSÁN Y UN PLÁSMIDO CON SECUENCIAS DE
RESPUESTA A CAMPOS MAGNÉTICOS PARA
MEJORAR LA TRANSFECCIÓN**

“Dedicado a Dios y a toda mi familia”

1. RESUMEN

Gracias al avance de la tecnología, en las últimas décadas se han logrado descifrar el funcionamiento de cientos de genes y moléculas que prometen un nuevo camino para tratar diversas enfermedades como el cáncer y enfermedades crónico-degenerativas entre otras. Estos nuevos tratamientos revolucionarios a lo que hoy en día llamamos terapias génicas muchas veces prometen buenos resultados a nivel laboratorio (en líneas celulares), pero no a nivel experimental con un ser vivo principalmente por la falta de un acarreo eficiente del gen terapéutico al sitio de interés, llámese órgano o tejido. Así para algunos casos donde se requiere un acarreo del gen a un sitio poco accesible y con una especificidad alta para tener un buen resultado, surge la necesidad de desarrollar vectores o acarreadores que promuevan tanto la protección como el acarreo eficiente del gen y en el mejor de los casos el control de la expresión para evitar posibles efectos secundarios.

El presente trabajo realizó la construcción de un vector de acarreo de genes que facilita no solo llevar y proteger el gen si no que ayuda a controlar la expresión del mismo en un momento dado debido a sus características fisicoquímicas. La fabricación de este vector de acarreo se basó en la mezcla de nanopartículas magnéticas y un plásmido sensible a campos magnéticos llamado pCEM, cubiertos ambos de un polímero natural de quitosan para proteger al plásmido de degradación. Así debido a que tanto las nanopartículas como el plásmido comparten la sensibilidad al magnetismo el uso de un dispositivo imantado externo (imán) ayuda no solo a dirigir los complejos a lugar donde se tenga el imán, si no que ayuda a potenciar la expresión del gen reportero debido a que el plásmido contenido en los complejos para acarreo lleva un promotor sensible a campos magnéticos. Estos complejos fueron probados en líneas celulares con y sin la ayuda de un imán externo observándose una alta tasa de transfección la cual fue directamente relacionada con el uso del imán externo.

Los resultados finales mostraron que los complejos de nanopartículas magnéticas-quitosán-plásmido pCEM (npq) son efectivos para potenciar la expresión del gen reportero en la línea celular HeLa más que el plásmido desnudo (p), más que algunos de los complejos que no tuvieron los tres componentes y a la par de complejos fabricados con otros agentes transfectantes comerciales, demostrando así que la mezcla de los tres componentes aquí descritos no solo transfecta a la par de los mejores agentes comerciales si no que tiene la capacidad de aumentar la expresión del gen de interés por medio de un dispositivo magnético sin mencionar que absolutamente todos los componentes son biodegradables. Adicionalmente se descubrió y estandarizó el uso de un quitosán de bajo peso molecular al cual se le desconocía su alta capacidad transfectante resultando ser una fuente efectiva, economía de transfección, y lo más importante que es una fuente biodegradable lo cual es crucial para minimizar efectos secundarios en las terapias.

2. INTRODUCCIÓN

El futuro de las terapias génicas radica principalmente en que el gen de interés terapéutico llegue al sitio específico donde ejercerá su acción. Es aquí donde técnicas más específicas son necesarias para evitar los indeseados efectos secundarios en algunas de estas terapias. Actualmente están en desarrollo un sin número de propuestas para un acarreo específico de genes terapéuticos a órganos blanco, mas sin embargo existe todavía una gran área de oportunidad para mejorar en esta área y lograr que las crecientes terapias génicas seas mas afectivas. Las nanopartículas magnéticas principalmente por su baja toxicidad y sus propiedades magnéticas son cada vez más utilizadas en el mundo de la medicina como acarreadores de drogas y/o genes a tejidos específicos, debido a que pueden ser manipuladas exteriormente con la ayuda de un campo magnético (dispositivo magnético) sobre el área deseada. Importantes características son vistas en nanopartículas magnéticas de óxido de fierro, Fe_3O_4 (magnetita) y $\gamma-Fe_2O_3$ (maghemita), las cuales además de su singular respuesta a campos magnéticos (CM), tienen una muy baja toxicidad ya que están compuestas por fierro y oxígeno (los cuales son biodegradables) y poseen un gran tolerancia en el cuerpo sin mencionar que tienen un alto grado de inyectabilidad y altos niveles de acumulación en el tejido..

Por otro lado los CM a los cuales son sensibles las partículas magnéticas antes descritas también ejercen sensibilidad sobre organismos vivos. Múltiples estudios han demostrado que ciertas regiones en el DNA son sensibles a CM de las cuales algunas son promotoras de ciertos genes. Tomando en cuenta esta característica, investigadores de la Universidad Autónoma de Nuevo León de la Facultad de Ciencias Biológicas crearon un plásmido llamado pCEM (por sus siglas plásmido-Campos Electro Magnéticos) el cual posee como característica principal una secuencia promotora sensible a CM, la cual al estar expuesta a cierta intensidad de un campo magnético, induce la expresión del gen que tenga rio abajo. Ensayos realizados con este plásmido ayudaron a demostrar que puede haber un incremento significativo en la expresión de un gen reportero si se somete la región tratada con el plásmido a una cierta intensidad de un campo magnético.

Adicionalmente el uso de polímeros de origen natural como el quitosan como agente de transfección han traído buenos resultados ya que además de proteger al plásmido de degradación ayuda también a la entrada del plásmido o gen a la célula. De esta manera surgió la idea de juntar los tres componentes (partículas magnéticas, plásmido pCEM y quitosan) para crear complejos que puedan dirigirse a un sitio específico del cuerpo con el apoyo de un imán y al mismo tiempo inducir la sobre una expresión interesante del gen terapéutico, además de estar protegido de degradación por una cubierta de quitosan.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad los métodos para envío de genes son muy inespecíficos ya que cuando se aplican *in vivo* estos suelen esparcirse en lugares no deseados, porque generalmente no hay nada que los retenga. La importancia de tener buenos complejos acarreadores de genes radica en que el futuro cercano se utilizaran más terapias génicas para el tratamiento de enfermedades; estas terapias a base de expresión de genes necesitaran de acarreos efectivos a sitios específicos para que puedan funcionar lo mejor posible y traer menos efectos indeseados.

4. HIPÓTESIS:

Se puede controlar la expresión de genes con el uso de complejos a base de nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán y el plásmido pCEM bajo la influencia de un campo magnético.

5. OBJETIVOS:

5.1 Objetivo General:

Controlar la expresión del gen Luciferasa utilizando complejos contruidos de nanopartículas magnéticas, quitosán y el plásmido pCEM, bajo la influencia de un campo magnético.

5.2 Objetivos Particulares:

- 1.- Caracterización del plásmido pCEM, producción y purificación.
- 2.- Fabricación de complejos plásmido-quitosán (pq), nanopartículas magnéticas-plásmido (np) y nanopartículas magnética-plásmido-quitosán (npq) con su posterior caracterización, con el uso de quitosanes solubles e insolubles en agua.
- 3.-Ensayos de estandarización de la transfección de los complejos: plásmido-quitosán (pq), plásmido-nanopartículas magnéticas (np) en líneas celulares B16F10 y HeLa con la ayuda de placa magnética de Chemicell (250 mT) para probar los complejos y su funcionamiento *in vitro*, por medio del reportero luciferasa (luminometría).
- 4.-Estandarizacion de la transfección de los complejos nanopartículas magnéticas-plásmido-quitosán (npq) en la línea B16f10 y HeLa con la ayuda de placa magnética de Chemicell (250 mT) para probar los complejo y su funcionamiento *in vitro*, por medio del reportero luciferasa (luminometría).
- 5.- Análisis estadístico de resultados de expresión de luciferasa en pruebas versus controles.

6. ANTECEDENTES

6.1 Introducción a la Nanotecnología.

La búsqueda de nuevos materiales y nuevos productos para la mejora de la calidad de vida nos han llevado a territorios nuevos que año con año consiguen sorprendernos cada vez más. Uno de estos “nuevos” territorios es sin duda la nanotecnología, la cual se basa en la utilización de partículas a nano escala ($1\text{nm} = 1 \times 10^{-9}$) para la mejora de las características físicas y químicas de ciertos materiales en las diferentes áreas de investigación de las ciencias fundamentales como lo son física, química, biología y ciencias aplicadas como lo son electrónicos y materiales. La nanotecnología puede ser definida como el desarrollo a nivel atómico, molecular o macromolecular, a lo largo de escala de 1-900 nm de rango de estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades novedales debido a que sus matrices están elaboradas con estructuras de tamaños pequeños.

Algunas de las nanopartículas son construidas de diferentes materiales (oro, hierro, cobalto, plata, níquel, óxido de hierro etc.) y de diferentes formas (esferas, varas, tubos) según sea lo más conveniente para su uso. Aplicada en muchos campos, la nanotecnología sin duda ha tenido uno de sus mayores logros en la producción y aplicación de nanopartículas a sistemas biológicos, llamada también nanobiotecnología.

6.2 Importancia Económica de la Nanobiotecnología y de Nuevos Nano Acarreadores de Drogas.

En el área médica existen actualmente productos hechos a base de nanotecnología los cuales son elaborados de esta manera por que mejoran las cualidades físicas o químicas en los productos. Existen muchas ventajas de usar nano estructuras como agentes en detección biológica, algunos de estas ventajas fueron observadas en ensayos basados sobre nano materiales los cuales mostraron ser grandemente sensibles, selectivos y tener mucha practicidad cuando son comparados con los sistemas de bio-diagnostico convencionales (Rosi *et al.*, 2005), características que hacen a las nano materiales atractivos por sus tamaños pequeños. La nano ciencia y el uso de nanopartículas no es nuevo, desde 1974 el Dr. Norio Taniguchi empezó a trabajar con la construcción de estructuras menores a un micrómetro. Las nanopartículas pueden ser construidas por diferentes métodos y existen diferentes tipos de materiales para fabricarlas como se mencionó anteriormente.

En la medicina actual la entrega tanto de drogas como de genes ha tejidos específicos para el tratamiento de las diferentes enfermedades como el cáncer ha tenido sus desventajas debido a que cuando son inyectados en el organismo hay muchas posibilidades que se extiendan vía sistémica y por lo tanto puedan causar efectos secundarios indeseados, debido a su inespecificidad. Un buen ejemplo de este tipo de tratamiento es la quimioterapia. Uno de los puntos clave para la mejora de este tipo de terapias y de muchos otros tipo de tratamientos es la entrega más específica de drogas o genes que puedan atacar exclusivamente a las células blanco (en caso de genes: expresarse en las células blanco) y así disminuir considerablemente los efectos secundarios por el daño a otras células no blanco y es aquí donde ya desde hace varias décadas han entrado en juego las nanopartículas magnéticas, las cuales han servido de acarreadores específicos de drogas con la ayuda de un dispositivo magnético externo el cual al emitir un campo magnético o electromagnético de frecuencia extremadamente baja, posiciona en una región específica a las nanopartículas inyectadas, las cuales entregan la droga en el tejido específico tumoral, evitando que la droga se distribuya por todo el cuerpo, observándose resultados muy alentadores y menos agresivos los cuales se verán más adelante.

6.3 Campos Magnéticos

Los campos eléctricos y los campos magnéticos son líneas invisibles de fuerza generada por fenómenos como tormentas eléctricas y magnetismo terrestre entre otras las cuales existen de manera natural. Aunque es un fenómeno conocido desde la antigüedad, el magnetismo no fue bien comprendido hasta su unificación con la teoría de la electricidad a mediados del siglo XIX, gracias sobre todo a los trabajos de Maxwell (Maxwell, 1865).

El campo magnético es una región del espacio en la cual una carga eléctrica puntual de valor (q) que se desplaza a una velocidad (v), sufre los efectos de una fuerza que es perpendicular y proporcional tanto a la velocidad (v) como al campo (B), llamada inducción magnética o densidad de flujo magnético (F) y está dada por la siguiente ecuación:

$$F = qv \times B$$

Explicado de otra manera un campo magnético (CM) o llamado también campo electromagnético (CEM) es un campo vectorial (que tiene una intensidad y una dirección) el cual puede ejercer una fuerza magnética sobre cargas eléctricas en movimiento y sobre dipolos magnéticos (como magnetos permanentes), es decir a diferencia del campo eléctrico el cual aparece solo con la presencia de cargas eléctricas, para originarse un campo magnético se requiere el movimiento de al menos una carga eléctrica. Por lo tanto el movimiento de cargas eléctricas dentro de un campo eléctrico, llevará consigo un campo magnético denominándose todo en conjunto un campo electromagnético (CEM). En un campo magnético la fuerza está dada por la densidad de flujo magnético (también llamada intensidad magnética), siendo esta el número de líneas de fuerza que pasan por unidad de área. La relación

entre el campo magnético y una corriente eléctrica está dada por la ley de Ampere y el que incluye la corriente de desplazamiento lo da la ley de Ampere Maxwell. (Purcell E., 1963)

6.3.1 Clasificación de Campos Magnéticos

Básicamente cualquier CM es también un campo electromagnético CEM ya que no puede existir un CM sin al menos el movimiento de alguna carga eléctrica como vimos anteriormente en la ecuación de Maxwell, por lo que todos los CM son también CEM. Existen diversas formas de clasificar los CEM según sea el enfoque. Por un lado los CEM se clasifican según la fuente de corriente eléctrica que los produzca; así tendremos dos tipos CEM en esta clasificación, el que es producido por corriente directa (CD) y el que es producido por corriente alterna (CA):

6.3.1.1 Campos Electromagnéticos Estáticos.

Los CEM producidos por una CD (corriente que fluye siempre en el mismo sentido), son llamados estáticos, es decir que no varían con el tiempo (no cambian de dirección). En cualquier aparato eléctrico alimentado con pilas, la corriente fluye de la pila al aparato y de este a la pila, generándose así un campo magnético estático que no es variable con el tiempo, como el campo magnético de una barra imantada y el campo magnético terrestre.

6.3.1.2 Campos Electromagnéticos Oscilantes.

Por otro lado los CEM que son producidos por una fuente de CA son variables en el tiempo y cambian de dirección y/o amplitud (cambian de sentido) y la cual generalmente se mide en hercios (Hz), siendo 1 Hz un cambio (ciclo) por segundo, por ejemplo en Europa la corriente alterna cambia de sentido con una frecuencia de 50 Hz por segundo y de forma correspondiente el campo electromagnético asociado cambia de orientación 50 veces cada segundo; la frecuencia de la corriente eléctrica en los países de América del Norte es de 60 Hz.

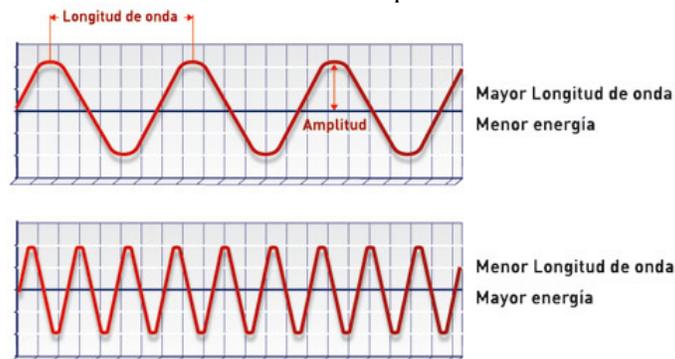


Fig. 1 Longitudes de onda de radiaciones electromagnéticas de baja y alta energía.

En la figura 1 se muestran las longitudes de onda de radiaciones electromagnéticas que producen baja y alta energía, así están estrechamente relacionados la frecuencia (numero de ondas por segundo) y la longitud (distancia entre onda y onda), siendo que en cuanto mayor sea la frecuencia, la longitud de onda será menor y la cantidad de energía será mayor. Los campos de frecuencia industrial son de 50 ó 60 Hz y tienen una longitud de onda de unos 5.000 km. Por el contrario, los hornos de microondas tienen una frecuencia de 2,54 billones de Hz y una longitud de onda de unos 10 cm y los rayos X tienen frecuencias de 10^{15} Hz y longitudes de onda mucho menores de 100 nm. Los campos magnéticos estáticos o campos de corriente continua o directa (CD), no varían regularmente con el tiempo, y se puede decir que tienen una frecuencia de 0 Hz y una longitud de onda infinita.

El campo magnético aparece típicamente en el entorno de conductores donde circulan corrientes eléctricas, que son entonces las principales fuentes de campos magnéticos. A una distancia dada de un conductor, la intensidad del campo será mayor cuanto mayor sea la intensidad de la corriente en dicho conductor. Si las corrientes varían con el tiempo, como en el caso de corrientes alternas, los campos magnéticos creados también son alternos y de la misma frecuencia.

Continuando con la descripción de clasificación de los campos electromagnéticos que son producidos por fuentes de corriente que alterna con el tiempo, estos poseen una subdivisión en los cuales podemos encontrar diferentes tipos de campos electromagnéticos: los de baja, intermedia y alta frecuencia:

Campos Electromagnéticos:

- CEM de baja y extremadamente baja frecuencia ó frecuencia industrial (de 3 hasta 300 Hz). Son los producidos por las redes de transmisión y distribución de energía eléctrica, redes de telefonía y por la mayoría de los electrodomésticos.
- CEM de frecuencia intermedia (entre 300 Hz y 10 MHz). Son los producidos por pantallas de computadoras, dispositivos antirrobo y sistemas de seguridad y transmisiones de radio AM.
- CEM de alta frecuencia (entre 10 MHz y 300 GHz). Son los producidos por sistemas de radiodifusión, televisión, hornos de microondas, teléfonos celulares, enlaces de microondas, antenas de radares, en orden creciente de frecuencia (Moulder,2002).

Otro de las clasificaciones de campos electromagnéticos es dividida en campos magnéticos homogéneos y heterogéneos, donde en los campos magnéticos homogéneos la intensidad es uniforme en el área cerca de la bobina magnética, mientras que en los heterogéneos la intensidad del campo no es uniforme ya que decrece entre más alejado este del centro de la bobina. En adición, los campos magnéticos heterogéneos ejercen una fuerza de aceleración sobre las partículas, un efecto que no está presente en los campos magnéticos homogéneos.

6.3.2 Clases de Magnetización

Desde la perspectiva del magnetismo, en la naturaleza existen diversos tipos de materiales, los cuales se pueden clasificar de acuerdo a su sensibilidad a este tipo de energía. En la siguiente tabla se muestran los grados de magnetización de los materiales:

Tabla I. Grados de magnetización

Tipo de Material	Características
No magnético	No facilita o permite el paso de las líneas de Campo magnético. Ejemplo: el Vacío.
Diamagnético	Material débilmente magnético. Si se sitúa una barra magnética cerca de él, esta lo repele. Ejemplo: Bismuto (Bi), Plata (Ag), Plomo (Pb), Agua.
Paramagnético	Presenta un magnetismo significativo. Atraído por la barra magnética. Ejemplo: Aire, Aluminio (Al), Paladio (Pd), Magneto Molecular.
Ferro magnético	Magnético por excelencia o fuertemente magnético. Atraído por la barra magnética. Paramagnético por encima de la temperatura de Curie (La temperatura de Curie del hierro metálico es aproximadamente unos 770 °C). Ejemplo: Hierro (Fe), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Acero suave.
Anti-ferro-magnético	No magnético aún bajo acción de un campo magnético inducido. Ejemplo: Óxido de Manganeso (MnO ₂).
Ferri magnético	Menor grado magnético que los materiales ferro magnéticos. Ejemplo: Ferrita de Hierro.
Super paramagnético	Materiales ferro magnéticos suspendidos en una matriz dieléctrica. Ejemplo: Materiales utilizados en cintas de audio y video.

Ferritas	Ferri magnético de baja conductividad eléctrica. Ejemplo: Utilizado como núcleo inductores para aplicaciones de corriente alterna.
----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

A diferencia de lo que sucede con el campo eléctrico, no existen materiales que cumplan el rol de “aislantes” del campo magnético, ni tampoco procedimientos pasivos de apantallamiento de efectividad comparable, tanto del punto de vista técnico como económico. Por lo tanto, la principal medida práctica de mitigación del campo magnético consiste en incrementar la distancia a las fuentes del mismo.

6.3.3 Unidades de Medida del Magnetismo

La unidad en el sistema sexagesimal para la intensidad magnética es el *Oersted (Oe)* establecido en 1932 por acuerdo internacional, como sustituto de *Gauss (G)*, aunque sigue utilizándose más éste último en la literatura, países de Europa oriental utilizan más el Oe para sus mediciones de intensidad magnética. Para el Sistema Internacional de Unidades la densidad de flujo magnético está dada por 1 *weber* lo que equivale a un *Tesla (T)*, en donde cada T equivale a 10,000 G. En la práctica los valores suelen expresarse en submúltiplos como el mili Gauss (1 mG = 10^{-3} Gauss) o el micro Tesla (1 μ T = 10^{-6} T). La equivalencia entre ambos es 1 μ T = 10 mG, así:

$$\text{Oersted} = 1 \text{ Gauss} = 1000 \text{ mG} = 100 \mu\text{T} = 0.1 \text{ mT}$$

6.4 Efecto de Campos Magnéticos en Seres Vivos

El Campo magnético terrestre tiene el origen de su campo principal en los efectos físicos del núcleo de la Tierra, pero también existe un campo magnético externo debido a la actividad del Sol. El magnetismo terrestre, creado por la rotación de la Tierra (y de las cargas eléctricas de su interior) puede variar entre valores en el entorno de 270 mG (27 μ T) en el Ecuador y de 670 mG (67 μ T) en los Polos. En la tierra los organismos vivos se desarrollan y evolucionan bajo la influencia de este campo. Así, no debería ser sorprendente la existencia de muchas especies capaces de orientarse usando el campo magnético terrestre, es decir muchos organismos vivos si no es que la mayoría tienen de algún modo sensibilidad a campos magnéticos por el hecho de haberse desarrollado en este tipo de ambiente. Un claro ejemplo de este tipo de organismos son los tiburones y rayas los cuales utilizan campos magnéticos terrestres para guiarse a través de mar (Scheich H. et al., 1986; Cohn M. et al., 2006).

El bio electro-magnetismo (a veces denominado parcialmente como bioelectricidad o bio-magnetismo) es el fenómeno biológico presente en todos los seres vivos, incluidas todas las plantas y los animales, consistente en la producción de campos electromagnéticos los cuales se manifiestan como campos eléctricos o magnéticos producidos por la materia viva (células, tejidos u organismos). Los ejemplos de este fenómeno incluyen el potencial eléctrico de las membranas

celulares y las corrientes eléctricas que fluyen en nervios y músculos como consecuencia de su potencial de acción. (Lieb WR and Stein WD., 1986). No debe confundirse con otro concepto llamado también bio electromagnetismo, que se ocupa de los efectos de una fuente externa de electromagnetismo sobre los organismos vivos.

Se cree que los CM, inicialmente interactúan en la membrana celular y de ahí activan vías de señalización las cuales llegan hasta el núcleo activando diversos genes y otros son expresados directamente por la inducción de los CM sobre el DNA como el gen respuesta a estrés o HSP70 por sus siglas Heat Shock Protein (Lin et al, 1998). Se sabe que dentro de los efectos que causan los CEM sobre las células están: la síntesis de ADN, ARN, cambios en las producción proteínas, (Litovitz, *et al*, 1991, 1993,1994) modificación de la respuesta inmune y en el grado de crecimiento y diferenciación celular. (Tenforde, 1991).

Teóricamente desde que los CM de extremadamente baja frecuencia penetran la célula (diferente a los campos eléctricos), las interacciones pueden ocurrir en cualquier parte de la célula, así el supuesto de que los campos magnéticos estimulan cambios en las células primero interactuando con la membrana celular es basada en la creencia de que actúa solo indirectamente a través de su corriente eléctrica la cual es muy pequeña por la dimensión celular. La membrana ha sido propuesta como el sitio principal de interacción por que ofrece la posibilidad de amplificación de la señal por mecanismos de vías de señalización establecidos. Pero existen estudios *in vitro* en sistemas libres de membrana, los cuales son expuestos a CM, donde se demuestra que las membranas no son requeridas para la síntesis de algunas proteínas (Goodman *et al.*, 1993; Tuinstra *et a.*, 1997).

Como se mencionó anteriormente los CM podrían interactuar directamente con el ADN nuclear, desde que el CM diferente al campo eléctrico, puede ser tan efectivo en el núcleo como en la membrana celular. Basado en reportes que muestran el flujo permanente de electrones a través de bases apiladas de DNA (McClellan *et al*, 1990; Dandliker *et al* 1997) el grupo de Blank y Goodman propusieron que estos electrones podrían responder a CM y que secuencias específicas de nucleótidos y/o factores de transcripción podrían ser los blancos.(Blank and Goodman, 1997).

A la fecha existen diversos estudios que muestran que los CM inducen una respuesta de estrés en la célula como: incremento en la síntesis de la proteína de estrés HSP70 en insectos del orden Diptera (Goodman R. and Henderson, 1988) también observándose inducción de expresión de estos genes de estrés en levaduras y cultivos celulares humanos (Weisbrot *et al* 1993; R Goodman *et al* 1994; Blank *et al* 1994). Se han identificado también la activación del factores de choque térmico (HSF1), un incremento en la proteína de unión HSE por sus siglas heat shock element (Lin *et al*, 1997) y dentro de los hallazgos se ha determinado que una región de unión a Myc en el promotor de hsp70 es requerida para la respuesta a CM (Lin *et al*, 1998), observándose la especificidad directamente en secuencias de DNA que es activada por este tipo de energía magnética.

6.4.1 Radiaciones Ionizantes, no Ionizantes y Exposición.

La mayoría de los tipos de energía conocidos por el hombre, llámense ondas de: radio, microondas, infrarrojo, visible, ultravioleta, rayos X, rayos gamma y campos magnéticos estáticos son todas emisiones electromagnéticas diferentes caracterizadas por su frecuencia o su longitud de onda. (fig.2)

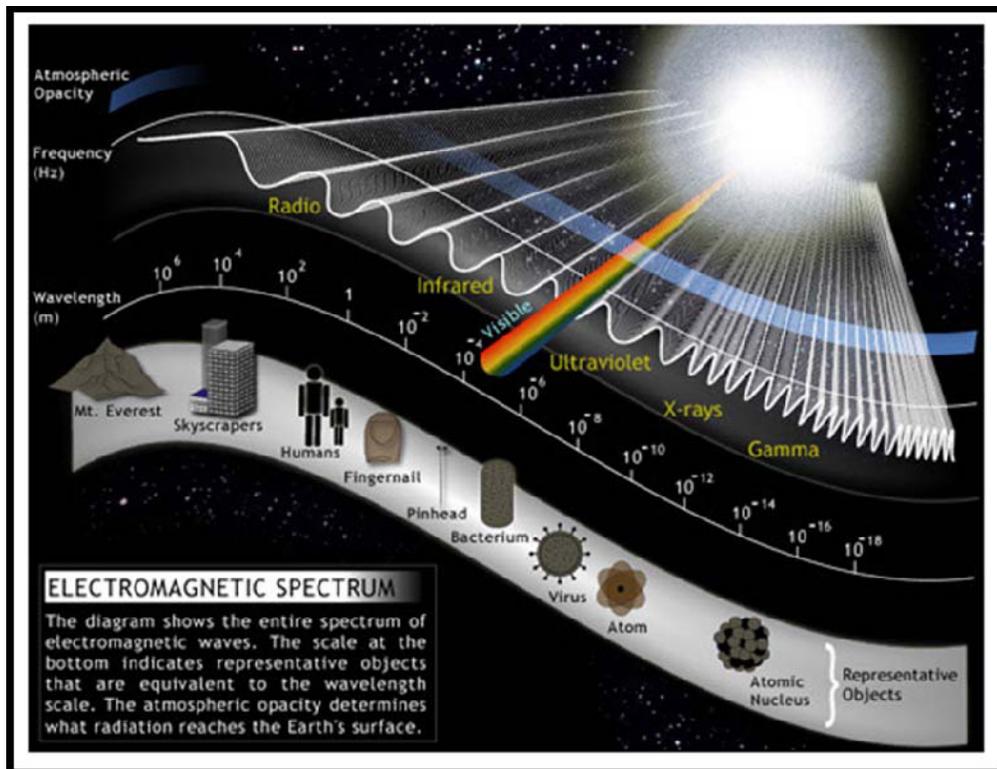


Fig.-2 Espectro electromagnético.

Las emisiones de energía se dividen en dos categorías según el tipo de radiación que producen: radiaciones ionizantes y no ionizantes. Las radiaciones ionizantes involucran la ruptura de enlaces químicos (que al ser energías muy grandes sacan electrones de sus orbitales) siendo estas rupturas causantes innumerables fallas en las actividades celulares, desde daños a nivel membranas hasta daños a nivel de DNA, este tipo de fallas han sido relacionadas con el desarrollo de algunos tipos de cáncer (Bernier J and Giaccia A., 2004). Por otro lado las radiaciones no ionizantes no tienen energía suficiente para romper los enlaces químicos o la capacidad de arrancar electrones, causando solo excitaciones electrónicas. La capacidad de arrancar electrones (ionizar átomos o moléculas), vendrá dada en el caso lineal (CEM) por la frecuencia de la radiación, que determina la energía por fotón y en el caso no lineal (CM) la fluencia (energía por unidad de superficie) de dicha radiación. (Hanawalt PC and Spivak G, 2008).

Los seres humanos estamos en constante exposición magnética en cualquier lugar que nos encontremos porque existen campos magnéticos estáticos los cuales son parte natural de la Tierra y varían entre 0,03 y 0,07 mT, dependiendo de la localización (polos o ecuador). Los campos magnéticos están justo debajo de líneas de transporte de energía eléctrica continua (DC). Dentro de los campos estáticos se encuentran varios tipos de fuentes comunes como: imanes permanentes, especializados (componentes de altavoces, motores con batería,) hasta triviales imanes de refrigeradores. Estos pequeños imanes pueden producir campos de 1-10 mT a 1 cm de sus polos magnéticos. La exposición más elevada a campo magnético estático por parte del público en general proviene de las imágenes de resonancia magnética (en inglés, MRI), donde los campos varían entre 150-2.000 mT (Stuchly, 1986;Saunders *et al*, 1991).

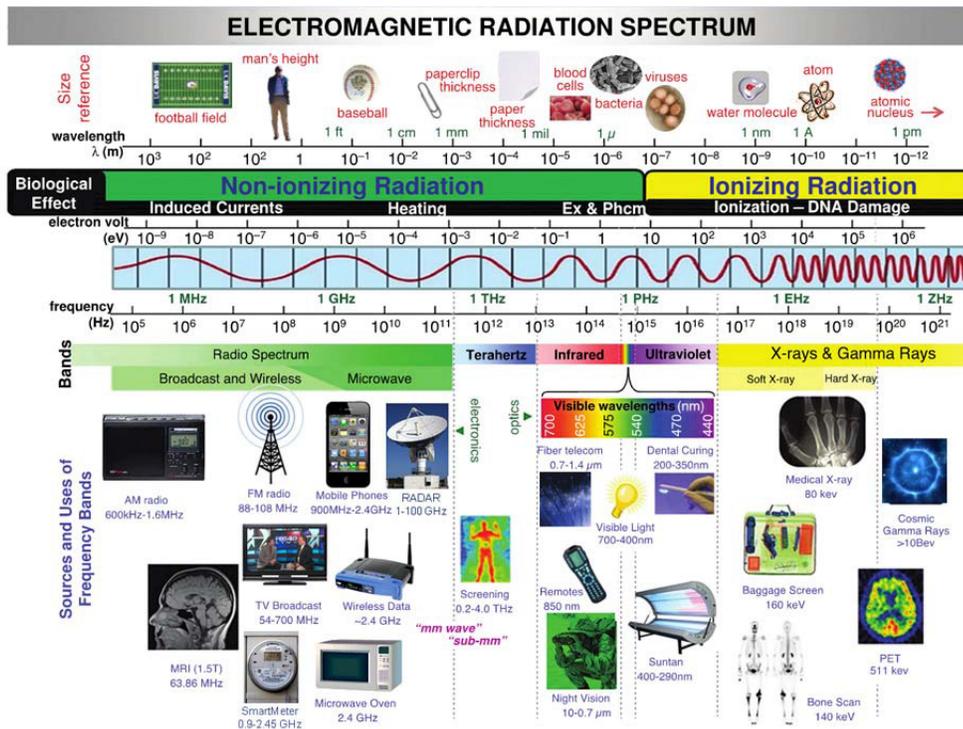


Fig. 3.-Clasificación de utensilios de la vida diaria por sus longitudes de onda emitidas.

La Comisión Internacional para la Protección contra las radiaciones No Ionizantes (ICNIRP) creada en Montreal en 1992, recomienda que la exposición laboral continua deba limitarse a un valor ponderado en el tiempo que no exceda 200 mT. La exposición continua del público en general no debe exceder 40 mT pero estos valores pueden no ser convenientes para personas con marcapasos cardíacos, implantes ferro magnéticos y equipos médicos implantados ya que para estas personas la exposición debe mantenerse por debajo de 0,5 mT. (Repacholi *et al*, 1994).

6.4.2 Campos Magnéticos Estáticos y Cáncer

Mucho se ha especulado acerca del posible efecto que pudieran tener los campos electromagnéticos sobre la producción de cáncer. Se conjetura que los CEM pueden suministrar corrientes, torques o fuerzas en el cuerpo que podrían aumentar el riesgo de cáncer (por ejemplo, reducción de la melatonina de la glándula pineal) o los de extremada baja frecuencia (EBF) pudieran ser parte de procesos biológicos dañinos (Stevens, 1987; Stevens & Davis, 1996, Wilson *et al.*, 1989). Médicos e ingenieros coinciden en afirmar que un campo electromagnético de baja frecuencia no produce efectos o cambios biológicos significativos ya que ellos no involucran rupturas moleculares que llevarían a un daño irreversible de moléculas y por consiguiente al cáncer. A pesar de que todavía se conoce poco sobre las causas de cánceres específicos, sí se comprenden lo suficientemente bien los mecanismos de la carcinogénesis, como para que los estudios celulares y animales proporcionen información relevante con vistas a determinar si un agente causa o contribuye o no al cáncer.

Si bien es cierto que se ha atribuido a los CEM alguna relación con el tipo de cáncer de Leucemia en niños que viven cerca de subestaciones eléctricas, existe muy poca base teórica para sospechar que los CEM estáticos puedan causar o contribuir a la evidencia de mutagénesis o carcinogénesis o a cualquier otro problema de salud (Saunders *et al.*, 1991). Se han realizado relativamente pocos estudios sobre incidencia de cáncer en trabajadores expuestos a campos magnéticos estáticos, como el realizado por el grupo de Bundinger donde no se encontró un exceso de cáncer en trabajadores expuestos a campos de 300 mT generados por aceleradores de partículas (Budinger *et al.*, 1984), en otro estudio Barregard y col. no encontró un incremento de cáncer en trabajadores expuestos a campos de 10 mT en una planta de producción de cloro (Barregard *et al.*, 1985) y a comparación del primer estudio este último tiene una dosis 29 veces menor.

Los estudios de laboratorio sobre los efectos de los CEM estáticos muestran que estos campos no tienen efectos consistentes sobre el algunos procesos como: crecimiento tumoral (Farber, 1995) crecimiento celular (Farber, 1995; Kavet, 1996), funcionamiento del sistema inmunológico (Krueger, 1998) o balance hormonal (Kavet, 1996). Claro está que se necesitan más estudios para poder validar la toxicidad de los campos electromagnéticos en general, ya que no se podría generalizar sobre su acción debido a la gran cantidad de variables que deben de tomarse en cuenta, como: distancia del campo, intensidad, frecuencia (si es un campo magnético oscilante), tiempo de exposición, tipo de material etc.

6.5 Nanopartículas Magnéticas en Medicina e Investigación

Los compuestos férricos u oxido ferrosos son los principales constituyentes de las partículas magnéticas más comúnmente usadas en el área médica. Las nanopartículas magnéticas como su nombre lo indica son partículas muy pequeñas

que oscilan entre 1-900 nm, las cuales generalmente son >100nm (contienen aproximadamente de 20-15000 átomos) y son producidas de materiales que pueden ser atraídos fuertemente por magnetos o ser magnetizadas (Ito *et al.*, 2005 b; Tanaka *et al.*, 2005), este tipo de materiales incluyen hierro, níquel, cobalto y aleaciones preparadas de la mezcla de materiales magnéticos.

En medicina las nanopartículas iniciaron su uso en diagnóstico de tumores de hígado y bazo con tomografía de resonancia magnética (Josephson *et al.*, 1990). El uso de nanopartículas magnéticas en biología celular fue propuesto a principios de 1970s, y su uso había hecho la separación de células o moléculas como proteínas, péptidos y DNA considerablemente fácil (Dunnill *et al.*, 1974; Stechell *et al.*, 1985). Estos tipos de partículas gracias a su centro metálico pueden ser manipuladas y atraídas con dispositivos magnéticos externos lo cual ha sido de gran utilidad para la separación, purificación y concentración de diferentes tipos de biomoléculas, entrega específica de drogas y/o genes y clasificación de células. Con la adición de componentes a las nanopartículas magnéticas estas han sido una gran herramienta importante y versátil en diagnósticos biológicos y médicos (Saiyed *et al.*, 2003; Shinkai *et al.*, 2004).

Por supuesto las partículas magnéticas por si solas generan un campo magnético influenciando el área alrededor de ellas. La pérdida de histéresis (la pérdida por histéresis representan una pérdida de energía que se manifiesta en forma de calor en los núcleos magnéticos) por parte de las nanopartículas magnéticas generado por un campo magnético alterno es una característica muy importante en partículas magnéticas ya que permite efectiva termoterapia o hipertermia ya descrita desde hace más de cuarenta años (Cavaliere *et al.*, 1967; Stauffer *et al.*, 1984). Adicionalmente una novel aplicación de nanopartículas magnéticas y fuerza magnética para ingeniería de tejidos ha sido propuesta, la cual es llamada: ingeniería de tejidos basada en fuerza magnética (Mag-TE por sus siglas en inglés (magnetic force-based tissue engineering) con queratinocitos. Esta tecnología está siendo presentemente aplicada para varios tipos de células como células madre mensenquimales humanas (Ito *et al.*, 2004 b, c) y células epiteliales de pigmento de retina (Ito *et al.*, 2005).

6.5.1 Principales Usos de las Nanopartículas Magnéticas en Biología y Medicina

6.5.1.1 Separación Magnética por Purificación e Inmunoensayos.

El proceso de bioseparación de moléculas ha sido el más estudiado y el más documentado en el área de biociencias y biotecnología. Existe ya una gran variedad de partículas magnéticas que han sido desarrolladas como acarreadores magnéticos en procesos de separación incluyendo purificación e inmunoensayos (Dunnill *et al.*, 1974; Stechell *et al.*, 1985; Häfeli *et al.*, 1997; Saiyed *et al.*, 2003; Safarik *et al.*, 2004). Aparatos y kits ya están disponibles en el mercado para uso de laboratorio basados en esta técnica como máquinas automáticas purificadoras de DNA/RNA. Partículas magnéticas son usadas en inmunoensayos (Guesdon *et al.*, 1978; Druet *et al.*, 1982) los cuales son ampliamente usados para exámenes médicos como

detección de virus y varios tipos de hormonas (Pazzagliei *et al.*, 1988; Vonk *et al.*, 1991), además que ya se han hecho ensayos que comprueban que métodos de separación magnética son métodos más adecuados que reducen los pasos de absorción y separación (Shinkai *et al.*, 1992). Sin duda, este ha sido uno de los mayores avances en cuanto a purificación de biomoléculas.

6.5.1.2 Imagen por Resonancia Magnética y Diagnóstico.

En el mundo de la imagen *in vivo*, la nanotecnología es sin duda uno de los representantes de mayor peso. Las nanopartículas dentro de este ámbito son moléculas que sirven como plataforma para emitir señales que son captadas por aparatos especiales. A este tipo de partículas se les pueden adherir una gran variedad de señales y moléculas blanco (referido a señales: la adherencia de átomos que puedan dar una señal de imagen como radioisótopos, lantánidos, fluoroporos; y referido a adhesión de moléculas específicas: anticuerpos, genes, ligandos etc. para terapia o para imagen). Las nanopartículas tienen múltiples aplicaciones debido al amplio número de moléculas para señal y moléculas para tratamiento que se pueden unir a ellas. Iones quelatos paramagnéticos y nanopartículas ferromagnéticas o superparamagnéticas con tamaños de entre 3- 10 nm han sido desarrollados como agentes de contraste y usados en diagnóstico clínico. En comparación con los iones paramagnéticos, las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético tiene mayor relajación molar y cuando son usadas en la sangre y como agentes de tejido específico, ofrecen beneficios a menos concentración. (Saini *et al.*, 1987; Stark *et al.*, 1998). Estas partículas tienen una marcada relajación T_2 , debido a sus altos momentos magnéticos, los cuales generan campos microscópicos no homogéneos. Consecuentemente, ellos producen un fuerte decremento en la intensidad de señal de los órganos en el cual ellos se acumulan. (Oswald *et al.*, 1997). Así existen dos clases en esta familia de productos dependiendo del tamaño de las partículas. Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO) con un diámetro promedio de más de 50 nm y las nanopartículas superparamagnéticas ultra pequeñas de óxido de hierro (USPIO) las cuales son las más pequeñas con tamaños > 50 nm (Benderbous *et al.*, 1996). La imagen de resonancia magnética ofrece alta resolución especial de contraste entre diferentes tejidos.

6.5.1.3 Hipertermia.

La hipertermia es una un novedoso tratamiento que se basa en un incremento en la temperatura en el área de tumores aproximadamente de 42.5-45 °C para así poder llevar a este tipo de células a la muerte con el uso de agua caliente como: inductores de calor como lo es la técnica de campo eléctrico de radiofrecuencia (RF). (Cavaliere *et al.*, 1967; Stauffer *et al.*, 1984; Abe *et al.*, 1986; Lin *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 1994). Sin embargo el calentamiento específico de tumores usando el campo eléctrico de RF es difícil, debido a las características de calentamiento que son influenciadas por varios factores, como el tamaño del tumor, la posición de los electrodos en sitios asimétricos etc. Desde un punto de vista clínico, este tipo de tratamiento solo es factible para cánceres muy superficiales como lo son ciertos tipos

de cáncer de piel. Como la mayoría de las terapias en sus principios la hipertermia tenía sus desventajas debido a lo inespecífico de la terapia, induciendo el calor y la muerte no solo en células tumorales sino también en células normales. Fluidos magnéticos han sido investigados como potenciales agentes causadores de hipertermia debido a su alta tasa de absorción específica (SAR). La hipertermia basada en el uso de nanopartículas magnéticas o MFH (Magnetic Fluid Hipertermia) ha traído grandes beneficios a esta técnica, gracias a que estas partículas al ser inyectadas en el área del tumor pueden ser retenidas en su gran mayoría, por el uso de un dispositivo magnético externo, la pérdida de histéresis de las partículas magnéticas representa una pérdida de energía que se manifiesta en forma de calor en los núcleos magnéticos es así como se produce la hipertermia o aumento de temperatura (Shinkai *et al.*, 1994). Los resultados de estos estudios han mostrado que la hipertermia usando fluidos con nanopartículas magnéticas es capaz de reducir la viabilidad de las células con cáncer, indicando que podría ser esta una terapia potencial. Adicionalmente la hipertermia incrementa preferentemente la permeabilidad de la vasculatura del tumor, comparada con la vasculatura normal, lo cual adicionalmente potencia la entrega de drogas. (Engin, 1996; Feyerabend *et al.*, 1997; Issels, 1999). También existe la posibilidad de la combinación de terapias, donde el tratamiento de hipertermia seguido de quimioterapia o terapia génica da buenos resultados, utilizando nanopartículas, micro esferas o magneto liposomas conteniendo una droga, con un procedimiento estándar causando hipertermia, seguido de la liberación de la droga a la célula ya dañada por la hipertermia. Este tipo de terapia con tratamientos combinados podría tener resultados prometedores para el tratamiento de tumores sólidos (Safarik *et al.*, 2002).

La hipertermia presenta algunos problemas como la dificultad de calentar solo el tejido específico, evitando dañar el tejido sano, otro problema es que la inducción de hipertermia induce la producción de HSPs (Heat Shock Proteins) (Schlesinger, 1990) las cuales ayudan a proteger a las células de apoptosis inducida por calor (Mosser *et al.*, 2000), es decir la inducción de hipertermia en las células con cáncer se complica por la aparición de las proteínas HSPs, las cuales son inducidas por el mismo calor. Sin embargo en recientes investigaciones se ha sugerido que las proteínas Hsp70, Hsp90 y la proteína glucosilada 96 (gp96), estas proteínas se sabe que podrían actuar como chaperonas de antígenos tumorales (Ménoret and Chandawarkar, 1998; Srivastava *et al.*, 1998). Adicionalmente también muchos investigadores han reportado que el calentamiento por si solo puede potenciar la inmunogenicidad a células de cáncer (Mise *et al.*, 1990; Mondovi *et al.*, 1972; Ozdemirli *et al.*, 1991). Para solventar uno de los problemas producidos a la hora de aplicar hipertermia, se han creado nuevos métodos, uno de los cuales nos ayuda a ser más específico, induciendo calor solo en las células con cáncer (Jordan *et al.*, 1993; Minamimura *et al.*, 2000), esto con el uso de nanopartículas magnéticas, donde estas se calientan inducidas por un dispositivo magnético (Shinkai *et al.*, 1994) observándose que los efectos de la hipertermia usando MCLs en un estudio *in vivo* presentó un regresión completa del tumor (Yanase *et al.*, 1998 a). Algo muy interesante que salió de este estudio fue que la expresión de las proteínas de Hsp70 seguida de la hipertermia se producía una inmunidad anti tumor en los ratones de estudio (Ménoret and Chandawarkar, 1998; Srivastava *et al.*, 1998), es decir estos ratones desarrollaban inmunidad contra esos tumores. Después este grupo se dio a la tarea de ver si la inmunidad antitumoral podía ser reforzada con el uso de Hsp70 exógena, observando una mejora muy marcada en la regresión del tumor, comparada

con el tratamiento de la hipertermia sola, sugiriendo que la combinación de hipertermia con MCLs y el uso de Hsp70 transgénica, puede tener un gran potencial para el tratamiento de cáncer y que adicionalmente produce una inmunidad antitumoral sistémica. (Ito *et al.*, 2004 a).

6.5.2 Principales Usos de las Nanopartículas Magnéticas en Investigación

6.5.2.1 Nanopartículas Magnéticas en Terapia Génica.

El uso de virus dentro de terapia génica ha tenido un éxito limitado debido a diversos factores. Aunque como acarreadores específicos y extremadamente eficientes de material genético, los virus pueden inducir inmunotoxicidad severa, así como también cambios inadvertidos en la expresión de genes después de una integración al azar dentro del genoma hospedero (Somia *et al.*, 2000; Cavazzano-Calvo *et al.*, 2004). Estos problemas han obligado a la industria a desarrollar nuevos métodos para la eficiente entrega de genes sin los efectos adversos como los causados por vectores virales.

El uso de partículas magnéticas para la entrega de agentes quimioterapéuticos ha venido desarrollándose desde los 70s. Widder *et al.* y Morimoto *et al.*, desarrollaron micro esferas de albúmina encerrando drogas anti cancerígenas (Widder *et al.*, 1978; Morimoto *et al.*, 1981). En estos experimentos las partículas magnéticas inyectadas a los ratones fueron retenidas en el sitio magnetizado, dependiendo de la magnitud de fuerza del campo. De hecho se ha mostrado que las partículas magnéticas pueden ser retenidas en otras partes del cuerpo dependiendo del lugar donde se ponga el campo magnético externo (Widder *et al.*, 1981). Posteriores experimentos con micro esferas mostraron resultados alentadores con quimioterapia controlada magnéticamente (Widder *et al.*, 1983; Gupta *et al.*, 1993). Otro grupo más adelante mostró que es importante la vía de administración de la droga, obteniéndose mejores resultados inyectando las partículas con la droga vía arterial que vía venosa o intratumoral para un modelo con carcinoma escamoso celular VX-2 (Alexious *et al.*, 2001). Existe un sin número de estudios exitosos que señalan a las nanopartículas magnéticas como una de las mejores técnicas para la entrega específica de drogas. Dentro del ramo de entregar genes a células específicas las partículas magnéticas ha encontrado un gran nicho y existen numerosos estudios que avalan el uso de estos compuestos para la entrega de genes ya que ciertos tipos de partículas magnéticas como las de óxido de hierro son biodegradables y en general bien toleradas por el organismo, de lo cual hablaremos en el siguiente capítulo.

Dentro de los métodos desarrollados en esta área para la entrega de genes existen ensayos que se basan en el uso nanopartículas magnéticas cubiertas con derivados catiónicos que le ayudan a tener una superficie positiva para poder unirse al pDNA, así exponiendo el pDNA junto con las partículas previo a la transfección se forman complejos por medio de interacciones electrostáticas (nanopartículas-pDNA). Los magneto liposomas constan de un centro magnético y cubierta lipídica en las cuales se pueden transportar genes o drogas de interés terapéutico (Sinaí *et al.*, 1995; Babincova *et al.*, 2000 Chan *et al.*, 2005) y las cuales se han implementado para investigaciones hechas con campos magnéticos pulsantes y estáticos, basados en la

técnica anteriormente descrita han dado muy buenos resultados en transfecciones de DNA plasmídicos y de productos de PCR incrementando la eficiencia 40 veces más que los controles que no fueron expuestos con los campos, más aun el hecho que solo se necesite un producto de PCR para poder expresar un gen no había sido antes probado (Kamau *et al.*, 2006).

6.6 Toxicidad de Nanopartículas en Sistemas Biológicos

La mayoría de las nanopartículas usadas con organismos vivos son actualmente consideradas seguras. Pero es respetable decir que no se ha clarificado todavía si todas ellas son o no peligrosas en términos de la salud humana.

Como se ha investigado, mucho importa el tamaño de algunos materiales para determinar el grado de toxicidad, por ejemplo nanopartículas agrupadas en masa son relativamente no reactivas por su superficie de área menor que la de las partículas individuales y son más grandes para entrar en el torrente sanguíneo cuando son respiradas. Pero nanopartículas separadas individualmente pueden pasar de los pulmones al torrente sanguíneo y ser más reactivas. El toxicólogo Günter Oberdörster reportó que en su laboratorio cuando expusieron ratas con aire contaminado con partículas de 20 nm de diámetro (polytetrafluoroetileno) por 15 minutos, la mayoría de los animales murieron en un periodo de 4 horas. Por el contrario, la misma dosis fue usada pero con partículas de 130 nm de diámetro y las ratas no tuvieron efectos de enfermedad alguna. Aun así muchos investigadores ponen en alerta estos estudios preliminares de toxicidad, los cuales no garantizan acciones drásticas como regulación de las nanopartículas. Para el caso de las nanopartículas como cualquier otro nuevo agente farmacológico es necesario evaluaciones farmacocinéticas, bio distribución y toxicidad. Sin embargo en la era de la medicina molecular donde los diagnósticos tempranos y terapéuticos personalizados pueden reducir el riesgo y salvar vidas, la promesa de estas nuevas tecnológicas y avances representan un nuevo camino para el control de enfermedades.

Dentro de la múltiple variedad de nanopartículas usadas en la actualidad, las partículas magnéticas de óxido de fierro poseen múltiples atributos que hemos mencionado a lo largo de este escrito como: inducción de hipertermia, no toxicidad, blanco y efectiva absorción de la energía del campo magnético alterno [CMA] de las cuales la más importante propiedad es la no toxicidad. Las partículas magnéticas están principalmente constituidas por óxido férrico u ferroso, aunque metales como cobalto y níquel son usados en otros campos de aplicación. Por su muy baja toxicidad (brinda más beneficio que daños) las nanopartículas de óxido de fierro son frecuentemente usadas en muchos campos de la nano biotecnología (Shinkai, 2002). Por la modificación en el tamaño y la naturaleza de la cubierta de la partícula, es posible modificar la distribución y farmacocinética y consecuentemente las aplicaciones clínicas. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de fierro (SPIO) con tamaños menores a 10 nm tienen una muy fuerte atracción hacia la fuerza ejercida por campos magnéticos y hay muchos estudios que muestran baja toxicidad en sistemas biológicos cuando son enjaulados en proteínas (Dickson *et al.* 1997), pero existen diversos estudios de incompatibilidad que demuestran la toxicidad de

estos fluidos magnéticos $MnFe_2O_4$ (Lacava *et al.*, 1999). A consecuencia de esto y como se había mencionado anteriormente muchos investigadores optaron por cubrir las partículas, es decir modificar la cubierta de las partículas magnéticas con materiales compatibles, las cuales resultaron en la mejora de la biocompatibilidad, estabilidad coloidal, dispersabilidad y el escogido específico de las partículas magnéticas por las células blanco (Berry and Curtis, 2002), obviamente la cubierta de la partícula debe ser escogida cuidadosamente para no modificar las propiedades superparamagnéticas, lo cual es considerado una de las características físicas más importante para aplicaciones de SPION *in vitro* e *in vivo*. Experimentos con diferentes tipos de cubiertas en nanopartículas superparamagnéticas se han llevado a cabo (Mikhaylova *et al.*, 2004), observándose que partículas cubiertas con oro y albúmina de suero de bovino y probadas *in vitro* fueron aprobadas satisfactoriamente para aplicaciones médicas (Mikhaylova *et al.*, 2004).

Por otro lado múltiples tipos de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro usadas en imagen para el sistema nervioso central como ferumoxtran-10, ferumoxytol, y ferumóxidos fueron examinadas en ratones y mostraron una mínima evidencia de toxicidad a largo tiempo (Muldoon *et al.*, 2005), sugiriendo estos autores que es factible el proponer inyecciones intracerebrales de agentes clínicos basados en hierro en humanos para estimar la distribución y el potencial de drenaje de los fluidos a los nódulos linfáticos. Aunque el hierro ha sido implicado en la formación de radicales libres, los cuales podrían ser dañinos para el tejido neuronal, particularmente en casos de enfermedades neurológicas o ataques al corazón (Dobson, 2004; Moos and Morgan, 2004), experimentos de carga celular fueron realizados para observar la formación de especies de radicales libres *in vitro* encontrándose efectos no tóxicos de una carga de hierro suficientemente alta y el no incremento de especies reactivas de oxígeno (Arbab *et al.*, 2004). En otro estudio se observó el efecto del crecimiento celular de cultivos expuesto con nanopartículas superparamagnéticas cubiertas con dextrano, mostrando que no hubo diferencia significativa con o sin SPIO sobre la densidad de la siembra, verificando que las SPIO son bio compatibles y observándose que estas cruzan las membranas y tejidos más rápido que la difusión regular, debido al efecto del campo magnético externo (Mondalek *et al.*, 2006). Experimentos llevados a cabo en ratones con nanopartículas magnéticas cubiertas con silica, las cuales contenían rodamina B-isotiocianato (se utilizan para entrega de drogas, detección de proteínas y entrega de genes), con el fin de evaluar la distribución, así como también el potencial tóxico mostraron que después de ser inyectadas por 4 semanas en ratones, las nanopartículas fueron detectadas en el cerebro sin perturbar su función o producir aparente toxicidad (Kim *et al.*, 2006). Agentes terapéuticos para quimioterapia como es la mitroxantona fueron adheridos a partículas magnéticas, en un estudio realizado para observar el tratamiento experimental del carcinoma de células escamosas VX-2 en conejos, donde una alta acumulación de las partículas en el tejido deseado, una completa y permanente remisión del tumor fue observada del carcinoma de células escamosas comparándolas con los controles, resumiendo que este tratamiento dirigido por partículas magnéticas y campos magnéticos ofrece una única oportunidad para tratar tumores malignos loco regionalmente sin toxicidad sistémica (Alexious *et al.*, 2001).

El uso de nanopartículas magnéticas para la entrega de genes o drogas, ha sido utilizado satisfactoriamente en modelos animales, sin embargo hay solo pocos estudios clínicos hechos en humanos. Experimentos de fase I fueron conducidos en

14 pacientes en orden de evaluar el potencial citotóxico de partículas acarreadoras magnéticas (Libe *et al.*, 1996a, b). Aunque la eficiencia de unirse a las células blanco no fue examinada en detalle, en seis de los pacientes hubo una significativa acumulación de partículas magnéticas dentro de la masa del tumor. Como la mayoría de los estudios *in vivo*, las partículas no capturadas por el campo magnético se acumulan en el hígado pero fueron generalmente bien toleradas. Un segundo estudio clínico fase I/II envolvió cuatro pacientes carcinoma Hepatocelular tratados con nanopartículas magnéticas con la droga doxorubicina (Wilson *et al.*, 2004), como las partículas inyectadas se acumulan en el hígado, los resultados mostraron que las partículas fueron muy específicas en tejido del tumor con un porcentaje de 64-91% del volumen del tumor en los cuatro pacientes afectados y todos los pacientes respondieron en una reducción y estabilización del tumor. Aunque este tratamiento fue hecho con partículas en rangos de 500 nm a 5 micras, solo un poco o no embolización fue reportada. Por otro lado resultados similares fueron observados en otro estudio Fase I/II con 32 pacientes con carcinoma Hepatocelular (Koda *et al.*, 2002). En este caso, la infusión hidroclorídica doxorubicina acoplada a un acarreador de partículas magnéticas (MTC-DOX) mostro que 30 de los 32 pacientes tuvieron una deposición de las partículas específicas en el tejido tumoral. De los 32 pacientes se analizaron solo 20 tumores de 20 pacientes, observándose que el crecimiento de tumores tuvo una progresión solamente en 5 pacientes y un acortamiento en 15 pacientes. Los autores de esta investigación concluyen que el tratamiento fue bien tolerado, sin embargo todavía no es claro si estos estudios procederán en el futuro.

En general no se puede generalizar entre la toxicidad de las diferentes partículas magnéticas porque muchos parámetros deben ser tomados en cuenta como lo es: 1) número de partículas y distribución del tamaño, 2) dosis de las partículas al tejido blanco, 3) tratamientos de superficie sobre partículas, 4) el grado en el cual las partículas creadas por ingeniería se agregan/aglomeran, lo cual influencia fuertemente la deposición características de las partículas en los pulmones, 5) cargas de la superficie de las partículas 6) formas de las partículas y/o potencial de atracción electrostático, 7) métodos de síntesis de partículas, por ejemplo si son formadas por la síntesis de fase de gases (humear) o fase líquida (coloidal-precipitado) y modificaciones post-sintéticas, las cuales influyen la agregación del comportamiento de las partículas. Aun así la mayoría de los artículos revisados para toxicidad usando partículas de óxido de hierro con parámetros bien establecidos tienen muy poca toxicidad o casi nula.

6.7 Uso de Promotores Inducibles en Terapia Génica

Dentro de las modificaciones que se han hecho al material genético a ser transfectado a la fecha se han creado un sin número de técnicas basadas en el uso de promotores para la expresión de genes en un tejido específico. Esto es tanto el uso de promotores sintéticos (Nettelbeck *et al.*, 2000), como de promotores endógenos naturales (Walther and Stein, 1996). La expresión de los genes *in situ*, con el uso de este tipo de técnicas, puede ser controlada ya sea por la actividad que tenga el tejido sobre el promotor o por alguna aplicación efectora externa que haga funcionar el promotor. Un ejemplo de esto son los diversos vectores utilizados los cuales contienen promotores químicamente inducibles (Tsai *et al.* 1998; No *et al.*, 1996) y promotores físicamente inducibles (Joki *et al.*, 1995). A la fecha varios grupos

investigadores han trabajado con diversos promotores los cuales se han podido manipular de una manera u otra, por ejemplo: el uso del promotores inducibles por radiación como el activador del plasminogeno (t-PA) (Walther and Stein, 1996; Patterson and Harris, 1999) y el promotor del gen de la proteína de respuesta al crecimiento temprano (early growth response protein-1) Egr-1 (Hallahan *et al.*, 1995; Manome *et al.*, 1998; Staba *et al.*, 1998; Kawashita *et al.*, 1999), otro tipo de promotores son los inducibles por estrés como Hsp70B (Goodman R. and Henderson, 1988; Blackburn *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000). Algunas de las bases tomadas para las construcciones de vectores con promotores físicamente inducibles se basan en las respuestas del cuerpo a shock térmico y estrés. Esto es cuando las células son sometidas a temperaturas de 37-44 °C o más altas, las células bajan la producción de proteínas normales y empiezan a sintetizar las proteínas de shock térmico o también llamadas proteínas de estrés (Morimoto I *et al.*, 1990), las cuales ayudan a mantener mayor estabilidad a temperaturas altas evitando llevar a las células a apoptosis inducida por calor (Mosser *et al.*, 2000). Las proteínas de estos genes de shock térmico son inducidas por sus promotores los cuales tienen características peculiares de ser sensibles a temperaturas más arriba de las normales (Dreano *et al.*, 1986). Debido a las particulares características de estos promotores de ser inducidos por calor, muchos investigadores se han dado a la tarea de probar estos promotores con diferentes genes, algunos como Huang y col probaron el gen TNF- α bajo la influencia del promotor Hsp70B donde observaron un incremento alto de 33 a 835 veces en un estudio in vivo aplicando 42 °C (Huang *et al.*, 2000). Con estas y otras bases se han creado diversos vectores de manipulación física y química lo que ayuda a eficientar la expresión de los genes una vez que estos son entregados.

En el año de 2005 el grupo de investigadores de Rodríguez-De la fuente construyó un vector el cual induce la expresión de una proteína recombinante (Luciferasa) por medio de la exposición a campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja *in vitro* e *in vivo* (Rodríguez *et al.*, 2005). Este plásmido al que denominaron pCEM (por sus siglas plásmido de Campos electromagnéticos) contiene el promotor de la proteína de shock térmico HSP70 B, con resultados muy interesantes en los cuales se observaba que al inyectar el plásmido en la tibia de ratones *Balb c* expuestos a campos electromagnéticos sinusoidales se observaba una fuerte expresión del gen reportero comparado con los controles, más aun la expresión incrementaba drásticamente cuando se le daba a los ratones una combinación de choque térmico y campos electromagnéticos, observándose que el orden en que se hacían las exposiciones era muy importante para que la expresión fuera mayor, esta tendría que ser primero de choque térmico y después de campos electromagnéticos, ya que en orden contrario se presentaba la sobreexpresión pero no tan alta como la hecha en el orden antes mencionado.

6.8 Polímeros de Quitosán para la Entrega de Drogas y/o Genes

A la fecha se han diseñado diferentes métodos y nuevos productos para la entrega de drogas y/o genes que sean más eficientes y que tengan baja toxicidad o muy poca interacción con células o tejidos que no son blancos. El quitosán es un polisacárido catiónico natural biodegradable, biocompatible, y no toxico. Debido a la buena solubilidad de algunos quitosanes de bajo peso molecular, puede ser

modificado químicamente en diferentes formas y presentaciones (fibras, películas, cápsulas, recubrimientos etc.), su campo de aplicación es muy vasto en la elaboración de productos especiales en la medicina y como suplemento alimenticio. El quitosán es obtenido solo por la N-de acetilación de la quitina, el cual es un producto encontrado en conchas y crustáceos como camarones, gambas y en hongos. El quitosán difiere en el grado de N- acetilación (40-98%) y un peso molecular de 50-2000 kda. Dado que la disponibilidad de la quitina derivada de crustáceos es temporal y con ello limitada, la producción de quitina a través de hongos para la producción de quitosán crece en importancia. A fin de lograr un proceso de fermentación rentable para la obtención de quitosán se aprovecha el micelio de hongos obtenido como subproducto en la producción industrial de enzimas y antibióticos. Cabe mencionar que la membrana celular de los deuteromicetos, y prácticamente de todos los productores de antibióticos y enzimas elaborados industrialmente está compuesta de quitina.

En la medicina el quitosán se ha usado como agente hemostático (para parar el sangrado mejor que otros) y para la entrega de drogas como la insulina (Sunil A *et al.*; 2004). Su uso como acarreador de genes ha sido estudiado por muchos grupos debido a su habilidad para unirse al DNA (Mao *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2001; Cui and Mumper, 2001; Corsi *et al.*, 2003; Mansouri *et al.*, 2004). Encapsulación de pDNA (DNA plasmídico) en polímeros biodegradables que forman nanopartículas o nanocomplejos, ofrece una gran alternativa para proteger al pDNA de degradación (Lee *et al.*, 2001) y control de la liberación del pDNA (Zhang and Neau, 2001). Entre algunos polímeros usados para encapsular pDNA está el ácido poly (D, L-glicólico-co-láctico [PLGA] (Capan *et al.*, 1999), gelatina (Leong *et al.*, 1998) además del quitosán (Lee *et al.*, 1998,2001; Hirosue *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2001; 2002). Muchos estudios a la fecha muestran que el quitosán es un material apropiado para un eficiente envío de genes y vacunas de pDNA, sin utilizar acarreadores virales (Mao *et al.* 2001 o 2002). Así a través de los años el quitosán ha sido un atractivo acarreador de genes por sus altas cargas positivas y baja toxicidad en las células (Kas, 1997), sin olvidar mencionar que sus grupos amino e hidroxilo permiten la inmovilización de muchos agentes terapéuticos. En adición el quitosán tiene mucha adhesividad y la habilidad para potenciar la penetración de un gran número de moléculas a través de la superficie de la mucosa (Illum, 1998; Lubben *et al.*, 2001), donde dichas propiedades mucoadhesivas permiten una sostenida interacción de las macromoléculas para ser entregadas con la membrana del epitelio promoviendo un proceso más eficiente de tomado de los nanocomplejos. En la figura 4 se muestra la estructura química del quitosán y su parecido con otras moléculas..

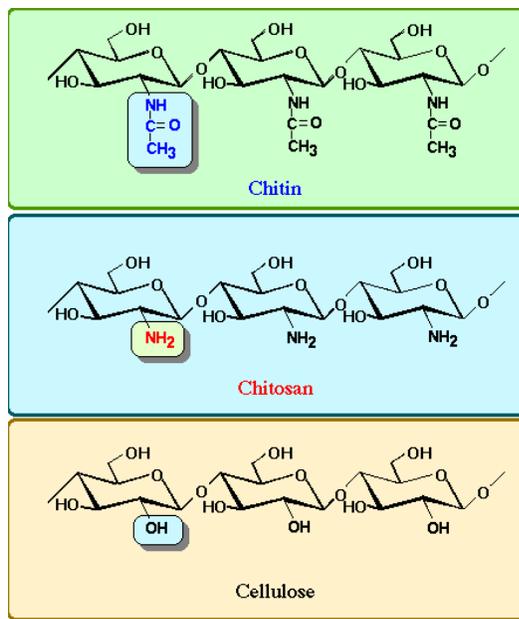


Fig. 4 Comparativa de quitosán con otras moléculas similares.

6.9 Toxicidad del Quitosán

El quitosán fue registrado en 1986 como ingrediente activo para el uso en cultivos y como biopesticida amigable con el medio ambiente. Dado su bajo potencial de toxicidad y su abundancia en la naturaleza, el quitosán no daña personas, animales, vida salvaje o al medio ambiente cuando se usa de acuerdo a las direcciones de las etiquetas de los productos elaborados que lo contienen, lo anterior fue estipulado por la EPA después de numerosos estudios de toxicidad y posteriormente el 19 de abril de 1995 (volumen 60, numero 75) la EPA le otorga la excepción de algún requerimiento de tolerancia, es decir a partir de esta fecha esta molécula no tendría un límite de uso en la agricultura dadas sus propiedades y baja toxicidad (EPA 19523-19524).

La EPA declara también un bajo riesgo en humanos cuando exista contaminación en productos alimenticios o de uso externo con quitosán ya que los exámenes toxicológicos mostraron un efecto que fue una leve irritación en la piel después de estar con una cantidad fuerte de quitosán (Quitosán; Poly-D glucosamine (128930) Fact Sheet). También se menciona que no existen riesgos para el medio ambiente por que el quitosán tiene muy baja toxicidad en mamíferos y es sumamente abundante en la naturaleza y además es usado en cantidades pequeñas.

Por otro lado el quitosán ha sido investigado como excipiente en la industria farmacéutica, para ser usado directamente como una tableta comprimida, como una tableta desintegrable o para la producción o liberación controlada de drogas. Algunos de los estudios realizados con complejos de quitosán en forma de agregados, emulsiones y micro esferas para la transfección de células eucariotas ya sea vía oral, intramuscular o intravenosa mostraron que puede ser usados como una buena opción de acarreo con baja toxicidad (Illum, 1998). Además el quitosán comparado con

excipientes tradicionales, ha mostrado tener características superiores y especialmente flexibles, utilizándose actualmente en sistemas de implantes con liberación controlada de hormonas durante periodos largos de tiempo y además en la entrega de drogas polares, péptidas y proteínas usadas como vacunas, a nivel nasal y oral. Es entonces que con dichas propiedades y con un perfil toxico seguro hacen al quitosán una excelente promesa para la industria de investigación biomédica y farmacéutica para futuras aplicaciones.

7. METODOLOGÍA

7.1 Transformar Plásmido pCEM y pNFKb-luc en *E.coli*.

7.1.1 Preparación de Bacterias Calcio Competentes DH5 α para Transformación:

- 1.- Para la preparación de las bacterias *E.coli* calcio competentes, primero se activó la cepa a utilizar, en este caso la cepa DH5 α de la cual se toma una alícuota de 100 μ l (cepa almacenada a -70°C con glicerol).
- 2.- La bacteria se puso a crecer en 5 ml de medio LB previamente esterilizado, por 12 hrs. a 37°C .
- 3.- Después se tomó 1 ml de la cepa activada y se puso en 50 ml. de medio LB esterilizado y se posteriormente se creció de 2.5 a 3 horas a 37°C con agitación.
- 4.- Después de este tiempo se midió la densidad óptica, en un espectrofotómetro, la cual debe de encontrarse entre el 0.5 y el 0.6 grados de densidad óptica de crecimiento. Cuando las bacterias alcanzaron dicha densidad se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min.
- 5.- Después se procedió a incubarlas con cloruro de calcio 0.1 M (7 ml) y se dejaron reposar en hielo por 30 min.
- 6.- Se centrifugaron y resuspendieron en cloruro de calcio (CaCl_2) 0.1 M.
- 7.- Las bacterias se almacenaron en alícuotas de 100 μ l, agregando a cada alícuota la misma cantidad de glicerol, para su posterior almacenaje a -70°C . (Alícuotas de 50 μ l de bacterias y 50 μ l de glicerol).

7.1.2. Transformación de Bacterias con el Plásmido pCEM y pNFKb-luc.

- 1.- Para transformar las bacterias con el plásmido pCEM (Fig. 5) o con pNFKb-Luc se tomaron alícuotas de las bacterias calcio competentes, después se les agregó el plásmido (10 μ l) y se dejó reposar en hielo por media hora.
- 2.- Después se le dió un choque térmico a 42°C y posteriormente se le agregó 1 ml de medio LB para después dejar incubando a 37°C por 24 horas.

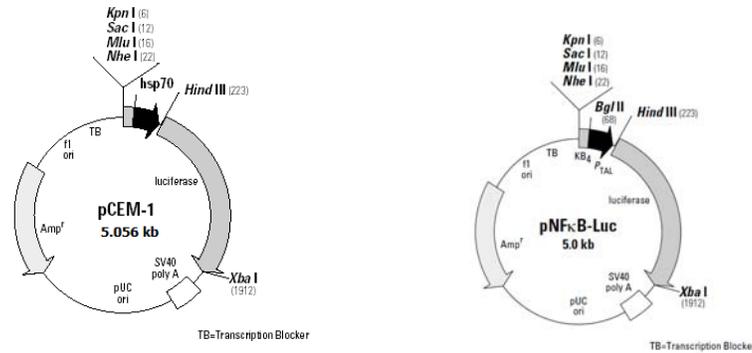


Figura 5. Mapa con sitios de restricción del vector pCEM 5.073 kb. Y pNFκB luc de 5.0 kb

7.1.3. Plaqueado de Bacterias Transformadas para Selección de Colonias.

- 1.-En este paso se tomaron las bacterias transformadas anteriormente, y se pusieron a crecer en placas con agar LB con ampicilina, el cual por el antibiótico, dejó crecer solo a las bacterias transformadas con el plásmido. Lo cual nos ayudó a hacer una selección de bacterias con el plásmido.
- 2.- Las colonias crecidas en las placas se tomaron cuidadosamente con un asa bacteriológica y se pusieron a crecer en 1 ml de agar LB con ampicilina. Nota.- Las bacterias se pusieron a crecer por duplicado para la realización posterior del Mini prep rápido.

7.1.4. Mini Prep Rápido para Selección de Clonas con el Inserto

Como en el paso anterior las bacterias se pusieron a crecer por duplicado; se tomó uno de los duplicados para realización de mini prep rápido. Se tomaron las bacterias transformadas y se lisaron de una manera rápida y en pequeñas cantidades para observar mediante un gel de agarosa si las bacterias tienen o no el inserto.

- 1.-Primero las bacterias se centrifugaron y se desechó el medio, quedando solamente el pelet de bacterias, a las cuales se les agregó 40 µl de solución DAE y 20 µl de fenol, se le dió un vortex de 5 min, y se centrifugó por 10 segundos.
- 2.-Posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 1 % y el resultado se observó bajo una cámara de luz ultravioleta, donde el gel previamente se tiñó con bromuro de estidio.

7.1.5. Crecimiento de Clonas Seleccionadas

Una vez hecho el mini prep rápido, se corroboró la presencia del inserto mediante la visualización del gel de agarosa, donde se debe de observar una banda de 5.073 kb, así pudimos hacer una selección de colonias con el inserto más precisa. Posteriormente se tomaron 200 µl de las clonas con el inserto (el otro duplicado de

las colonias) y se pusieron a crecer en 18 ml del agar LB con ampicilina a 37 °C por 24 horas.

7.1.6. Mini Prep

- 1.-Se tomaron las bacterias crecidas en ampicilina, las cuales se pasaron a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 14, 000 rpm por 1 min.
- 2.-Se decantó el medio y se agregó 400 µl de solución I dando un vortex de 1 min.
- 3.-Posteriormente se agregó 300 µl solución II dando al tubo 5 inmersiones suavemente y 300 µl de solución III dando al tubo 5 inmersiones suavemente.
- 4.-Se dejó incubando en hielo por 15 min y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min.
- 5.-Se tomó la parte acuosa y se precipitó con 2 volúmenes de isopropanol para después incubar en hielo por 20 min.
- 6.- Después de la incubación se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante (isopropanol)
- 7.- El pellet de DNA se lavó con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó otra vez durante 10 min a 14,000 rpm.
- 8.- Posteriormente se tiró el etanol y los tubos se secaron a 50 °C.
- 9.- Se re suspendió el DNA en 20 µl de H₂O de PCR.
- 10.-Por último se observó el plásmido en un gel agarosa al 1% teñido con bromuro de estidio.

7.2.Caracterización Enzimática del Plásmido y Secuenciación.

7.2.1 Digestión Parcial de pCEM Mediante las Enzimas Kpn I y HindIII

- 1.-En un tubo eppendorf estéril se agregó 1 µL del plásmido pCEM.
- 2.-Posteriormente se adicionaron 15.8 µL de agua para PCR, 2 µL de amortiguador D, 0.2 µL de BSA y 1 µL de la enzima 1 µL de NheI.
- 3.-Finalizado el tiempo anterior se agregó 1 µL de Hind III y se incubó con las condiciones antes mencionadas por 5 minutos.
- 4.-Después se incubó a 37°C por 1.5 horas bajo agitación continua en el mezclador – incubador (Thermomixer 5436 Eppendorf, Instrumental Brinkmann # de serie 11510).
- 5.-Concluido el lapso de tiempo se procedió a analizar de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %.

7.2.2.- Secuenciación del Plásmido pCEM

Una vez confirmada la caracterización por enzimas se procedió a mandar las muestras del plásmido pCEM a una empresa para que secuenciara en plásmido.

7.2.3 Maxiprep con Kit de Invitrogen para Obtener Grandes Cantidades de pCEM y pNFkB-luc.

Previo a la realización del Maxi prep se montó la columna en una base y se le adicionaron 30 ml del buffer EQ1 o Equilibration Buffer.

- 1.-Se tomaron de 200 a 800 μ l del tubo que contiene la clona de la colonia previamente analizada por medio de mini prep y se agregaron a 5 ml de medio con ampicilina (100 μ g/ μ l), de 6-8 hr, el tubo se dejó en agitación a 37°C.
- 2.-Después de pasadas las 6-8 horas, se tomaron 2 ml de la suspensión bacteriana de *Escherichia coli* conteniendo plásmido pCEM y se vertieron en un matraz con 250 a 500 ml de caldo LB con ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml, y se incubó a 37°C por 19 horas en agitación superior a 3000 rpm.
- 3.-Transcurrido el tiempo las células se centrifugaron a 6,000 RPM por 10 minutos y se tiró el sobrenadante.
- 4.-Posteriormente se resuspendió el paquete celular con 10 ml de la solución R3 (Resuspension Buffer) de Invitrogen.
- 5.-Seguidamente se agregaron 10 ml de la solución L7 (Lysis Buffer) y se mezcló por inversión 5 veces suavemente y se incubó por 5 min.
- 6.-Transcurrido el tiempo, se adicionó rápidamente 10 ml del buffer N3 (Neutralization Buffer) y se mezcló por inversión 5 veces o hasta que se observó homogéneo el contenido.
- 7.-Transcurrido este lapso se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos.
- 8.-Después el sobrenadante se separó del precipitado y cuidadosamente se depositó en la columna previamente equilibrada dejando que se filtrara por goteo.
- 9.-Al terminar de gotear, se le adicionaron a 60 ml del buffer de lavado W8 o Wash Buffer a la columna y se dejó filtrar por goteo.
- 10.-Una vez terminado el goteo se puso el tubo de recuperación bajo la columna para eluir el pDNA atrapado en la columna, agregando 15 ml del buffer de elución E4 o Elution Buffer.
- 11.-Una vez recuperado el eluido de la columna se le agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol o 10.5ml y se centrifugó a 12,000 RPM por 30 min/ 4 °C.
- 12.- Posteriormente se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 4mL etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 rpm/ 5min a 4°C.
- 13.- La pastilla finalmente se disolvió en 20-30 μ l de agua de PCR.
- 14.- Se corrió un gel de agarosa al 1 % para observar bandas del plásmido (solo se utilizó plásmidos donde se viera la banda súper enrollada muy concentrada).

7.3.- Estandarizaciones de Fabricación de Nanopartículas Magnéticas/Plásmido para usar en Transfección

7.3.1.-Protocolo para Ajustar la Cantidad de PolyMAG (Nanopartículas magnéticas) Deseada para la Transfección.

Las partículas magnéticas que se utilizaron fueron las PolyMAG y CombyMag de Chemicell las cuales son partículas de óxido de hierro con un diámetro hidrodinámico

de 200 nm. Las células fueron transfectadas con el kit comercial de la marca antes mencionada (Magnetofaction starter kit, el cual contiene las partículas magnéticas y MagnetoFACTOR plate de Chemicell).

Se utilizaron dos tipos de líneas celulares una de ratón y una de humano. Las células de ratón fueron B16F10 (melanoma de ratón) y la de humano fue HeLa (carcinoma de cérvix) las cuales fueron sembradas a una densidad de 7×10^3 células/pozo en una placa de 96 pozos 24 horas antes de la transfección para que se adhieran bien a la placa, esto se realizó en un volumen final de 100-/150 μ l de medio por pozo.

7.3.1.1 Elaboración de Complejo Nano Partículas-Plásmido

Se prepararon los complejos de nanopartículas magnéticas: plásmido unas horas antes de la transfección ya que las células fueron cultivadas 24 horas para que se pudieran adherir a la placa de cultivo.

PROCEDIMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN:

- 1.-En 4 tubos, se agregaron 7.2 μ g de pCEM con 352.8 μ g con medio DMEM -F12 libre de suero o suplemento.
- 2.- Posteriormente se añadieron 3.6 μ l, 7.2 μ l, 10.8 μ l y 14.4 μ l de PolyMAG en los posos A1, A4 A7 y A10 del plato de 96 pozos.
- 3.-Seguidamente se agregaron los 352.8 μ l de la solución del paso 1 (pCEM-DMEM F12) en los posos A1, A4 A7 y A10 (los cuales contienen el PolyMag) se mezcló bien pipeteando y se incubó de 20-30 min a temperatura ambiente
- 4.- Se realizó un cambio de medio para las células transfectadas sacando cuidadosamente el medio de la placa y lavando con 150 μ l de PBS 1x estéril y seguidamente agregando 150 μ l de medio fresco sin suero fetal.
- 5.-Mientras tanto se añadieron 180 μ l de medio libre de suplemento o suero (DMEM F12) a los pozos residuales de las columnas 1, 4, 7 y 10 de la placa de 96 posos (B1-H1, B4-H4,B7-H7, B10-H10).
- 6.-Después de la incubación en el paso 3, se transfirió 180 μ l de A1, A4, A7, A10 a B1, B4, B7, B10, mezclando por pipeteo, después se transfirió 180 μ l de B1, B4, B7, B10 a C1, C4, C7, C10, mezclando por pipeteo y así sucesivamente hasta H1, H4, H7, H10.
- 7.-Después se transfirió 50 μ l en duplicados de la columna 1, 4, 7, y 10 a las columnas de la placa donde las células fueron sembradas l (columnas 2/3, 5/6, 8/9, 11/12).
- 8.- Se colocó el plato de cultivo sobre el plato MagnetoFactor por 15 min dentro de la incubadora.
- 9.-Pasado el tiempo se removió el plato MagnetoFactor.
- 10.- Finalmente se realizó un cambio de medio con medio DMEM-F12 con 10 % de SFB.
- 11.-Se dejó incubar durante 24 hrs
- 12.-Pasado el tiempo se leyó luciferasa

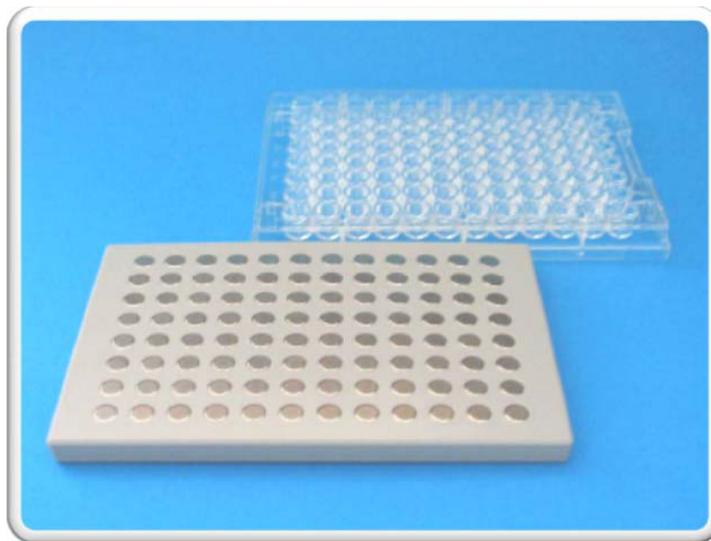
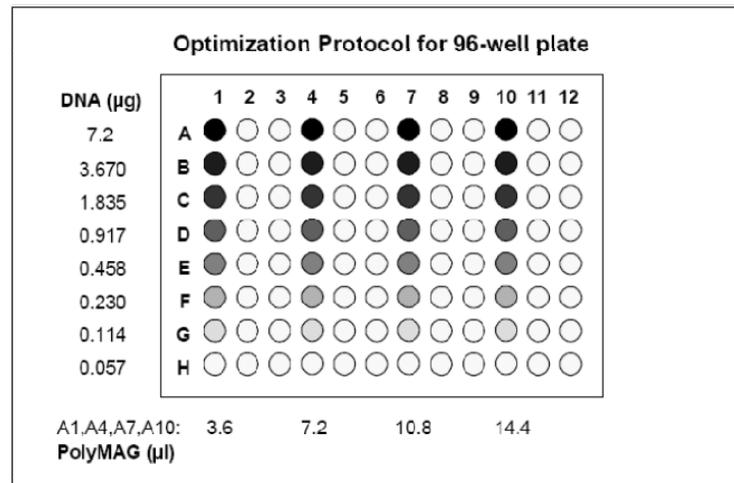


Figure 6.- MagnetoFACTOR plate de Chemicell® 96 pozos

7.3.2-Detección de la Expresión de la Luciferasa por Luminometría.

- 1.-Pasado el tiempo de incubación de 24, 48 o 72 hrs según sea el experimento de transfección, se lavaron las células con: 100 μl de buffer PBS 1x para placa de 96 pozos o 2 ml para placa de 6 pozos.
- 2.-Posteriormente se agregaron 20 μl de buffer de lisis (CCLB 1 x cell culture lysis buffer PROMEGA # CAT 1500) para placa de 96 pozos o 200 μl para placa de 6 pozos y se incubó en agitación durante 15 minutos.
- 3.- Después se pasó el contenido del lisado celular a tubos de 0.6 ml y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 segundos.

4.-Posteriormente se tomaron 10 μ l del sobrenadante y se pusieron en un tubo de vidrio especial para el luminómetro donde se agregaron 50 μ l de sustrato D-luciferina 0.4 mM y se leyó la expresión en Unidades Relativas de Luz (URL).

5.-Para determinar la actividad enzimática de la luciferasa se utilizó un luminómetro Turner modelo 20e (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA) y el kit para la detección de luciferasa de PROMEGA. El procedimiento que se utilizó en el luminómetro para leer es el que describe a continuación:

Protocolo para Luminómetro*

- 1.- Se encendió el aparato
- 2.- Se cargó un tubo vacío en el aparato y oprimió la tecla INITIATE
- 3.- Posteriormente se oprimió Protocolo 1 ENTER **
- 4.- Operador 1 ENTER **
- 5.- Se cargó un tubo con la muestra y la luciferina y cerró la tapa
- 6.- La muestra se leyó automáticamente y se imprimió en el papel.
- 7.- Para la siguiente muestra se repitieron los pasos 5-7

** El protocolo se grabó con el número 1 en el luminómetro el cual lleva como parámetros un tipo de protocolo: KINETICS y en el operador un tiempo de cuenta de 0.1 seg.

*El luminómetro marca 3 resultados: TOTAL RLU, MAX RLU y TIME SCALE. El resultado que se tomó en cuenta para la lectura de luciferasa es el Total RUL (Relative light Units)

7.4.- Complejos con Quitosán Insoluble en Agua

7.4.1. Preparación de Quitosán Insoluble en Agua.

1.- Se preparó quitosán al 0.75 %. Se tomaron 75 mg de quitosán (Sigma # cat 3656, peso molecular aproximado de 300kda / 85% de acetilación) y se disolvieron en 7 ml de ácido acético al 1% ajustando el pH a 5.5 con ácido acético y se vortexeo para que se disolviera bien las hojuelas de quitosán. (Tener cuidado que no se queden hojuelas de quitosán pegadas al pH metro cuando se le esté midiendo el pH. Enjuagar el pH metro con ácido acético al 1% para que no se pierda ese quitosán).

2.- Una vez ajustado el pH Se aforó a 10 ml con ácido acético al 1% (pH final a 5.5). Es importante el pH de 5.5 para que se disuelva bien el quitosán.

3.- Finalmente se filtró (filtro de 0.25 micras estéril) y alícuotó en tubos de 1.5 ml y se guardó a T.A.

7.4.2.-Preparacion de Complejos de Quitosan Insoluble en Agua: Plásmido

Previo a la preparación de los complejos se puso un baño de agua a 55 °C, con un flotador para tubos de 0.6 ml.

- 1.- Se preparó stock de plásmido pCEM a una [] de 0.89 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ disuelto en Na_2SO_4 50 mM.
- 2.- Se agregó 1 μg de plásmido (1.12 μl) a un tubo de 0.6 ml y se le adicionaron 9 μl de Na_2SO_4 50 mM estéril
- 3.- Se tomaron otros tubos nuevos y se agregaron 9 μl de buffer de acetatos pH 4.5 estéril y se les agregaron la cantidad deseada de quitosán, dependiendo del radio N: P (nitrógeno: fosfato) que se usara para transfectar usando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{l de quitosán} = \frac{\mu\text{g de plásmido} \times 3 \times \text{N: P}}{22 \text{ mM}}$$

- μg de plásmido = cantidad de plásmido a utilizar
- 3 = cantidad de fosfatos por microgramo de plásmido
- N: P = radio nitrógeno: fosfato (2:1, 3:1, 4:1 8:1 etc.)
- 22 mM = concentración de grupos amino en quitosán de 300 kda.

- 4.- Se pusieron a calentar ambos tubos a 55 °C por 5 min y se les da un pin para que las gotas formadas en las paredes del tubo se bajaran.
- 5.- Se tomaron los 10 μl de quitosán y se agregaron al tubo 10 μl de plásmido y se le dio rápidamente un vortex por 45 seg.
- 6.- Cuando se realizaron varias reacciones al mismo tiempo se hicieron en un solo tubo de 0.6 ml con la cantidad total de pDNA con su respectivo Na_2SO_4 y en otro tubo la cantidad de quitosán total a utilizar con su respectiva cantidad de buffer de acetatos, dependiendo del número de reacciones que se prepararon, se calentaron y de ambos tubos se tomaron 10 μl para mezclarlos por medio de un vortex.

7.4.3.- Gel de Retardo para Observar el Retenimiento o Migración del pDNA en los Complejos de Quitosan : Plásmido.

- 1.- Una vez realizado el protocolo anterior se pusieron a incubar los complejos a 37 °C en 3 volúmenes de PBS 1x o medio DMEM F12 sin suero fetal bovino /8 hrs.
- 2.- Posteriormente se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 1 % con marcador de peso molecular y un control de plásmido desnudo y se corrieron por 45 min a 100 mV - 150 miliampers.
- 3.- Una vez terminado el corrimiento se tiñó con bromuro de estidio y se observó el gel teñido en una cámara con luz UV.

7.4.4-Elaboracion de Complejos de Plásmido-Nanopartículas Magnéticas Cubiertas con Quitosan para la Formación del Complejo (npq).

Cantidades por cada pozo

- 1.- Se diluyeron 0.5 μg del plásmido pCEM en 10 μl en una solución de sulfato de sodio 50 mM.
- 2.- Posteriormente en un tubo de 0.6 se agregaron la solución del plásmido con la cantidad de PolyMag ó CombyMAG obtenida del primer protocolo se pipeteó

vigorosamente. (Se le dió un vortex al las partículas antes de usarlas).

3.- Se Incubó 15 min.

4.- Se agregó a otro tubo 0.7 μ l de una solución de quitosán al 0.75% en 10 μ l de 50 mM de buffer de acetato de sodio pH 5.5 y se calentó a 55° C por 2 min.

5.- En otro tubo se calentó a 55° C el tubo que contenía el plásmido y las nanopartículas magnéticas por 2 min.

6.- Finalmente se agregó el quitosán al tubo que contiene el plásmido y las nanopartículas y se le dio un vortex por 45 s.

7.4.5. Caracterización de los Complejos:

7.4.5.1 Caracterización por Microscopía Electrónica.

1.- Se prepararon mezclas de complejos con y sin nanopartículas magnéticas y se observaron a través de microscopios electrónicos de transmisión marca JEOL o Titán 80-300 G2

7.4.5.2. Obtención de Potencial Z y Tamaño.

Para la obtención de potencial Z y tamaño se utilizó un equipo de la marca Malvern Zetasizer Nano ZS90, el cual detecta el potencial Z por medio de la técnica electroforesis & laser doppler velocimetry y para el tamaño de partícula el equipo utilizó la técnica de dynamic light scattering.

Metodología para la obtención de potencial Z y tamaño

Todas las soluciones fueron preparadas con agua MiliQ filtrada con un filtro de 0.22 micras.

1.- Se prepararon muestras de complejos npq (como se indica en la metodología para transfección).

2.- Una vez preparados se agregaron 50 μ l de los complejos con 600 μ l de NaCl 1 mM (NaCl preparado con agua MiliQ filtrada a 0.2 micras), posteriormente se cargó toda la mezcla en la cubeta para potencial Z desechable y se le pusieron los tapones a los lados. (En el equipo se introdujeron los parámetros de diluyente y concentración, e índice de refracción del quitosán, para los experimentos controles con PEI se puso el índice de refracción del PEI)

3.- Finalmente se montó la cubeta en el equipo y se le dio un click en star.

4.- Para la detección de tamaño se agregan 50 μ l de los complejos en 800 μ l de agua Mili Q filtrada con 0.2 μ , se insertó en el equipo en modo de medición de tamaño y se le da click en star.

7.4.6.-Evaluación de la Respuesta a Campos Magnéticos (CM) *in vitro* Mediante la Transfección del Complejo (npq) en Líneas Celulares

7.4.6.1.-Transfección del Complejo Nanopartículas-Plásmido-Quitosa (npq) en Cultivos Celulares y Exposición a CM

1. Para la transfección, se sembraron 4×10^5 células por pozo en placas para transfección de 6 pozos de las líneas B16F10 o HeLa y se incubaron a 37 °C/24 hrs en una atmósfera de CO₂ al 5 % para obtener una confluencia celular de un 70-80%.
2. Posteriormente se lavó el pozo con PBS 1x y se agregó medio nuevo sin SFB.
3. Después se agregaron los complejos (2.5 µg de DNA) en 200 µl de PBS 1x.
4. Se colocó el plato MagnetoFACTOR bajo la placa cultivo por 20 min.(Fig. 2)
5. Se incubó por 4 hrs.
6. Se agregó SFB para que en cada pozo quede a 10 % y 1 ml de medio (sin retirar el medio solo se agregó el SFB al pozo agitándolo suavemente sin pipetear.
7. Se incubó 24 hrs a 37 °C al 5% de CO₂.
8. Se tomó lectura de luciferasa (ver sección 3.2)

7.5.- Complejos con Quitosa Soluble en Agua.

En esta etapa se utilizaron dos tipos de quitosanes solubles en agua, uno comercial para el uso de transfecciones de la marca Novamatrix (Novafect) y uno local para uso clínico de la marca Coyote Foods.

7.5.1. Preparación de los Quitosanes de Novafect y Coyote Foods.

7.5.1.1. Preparación de Quitosa Novafect O15 y O25 de 4-6 kDa de la Marca Novamatrix.

- 1.- Se agregaron 5 ml de agua de mili Q estéril al frasco de quitosa Novafect O15 (15-25 mer, deacetilación >97%) y Novafect O25 (25-40 mer, deacetilación>97%) para rehidratar el contenido el cual quedara a una concentración de 2 mg/ml.
- 2.- Posteriormente se dio un vortex a los frascos para que el contenido se disolviera bien.
- 3.- Se pasaron alícuotas de los frascos a tubos de 0.6 ml y se guardaron a -20 °C.

7.5.1.2 Preparación de Quitosa de 25 kDa de la Marca Coyote Foods.

- 1.- Se pesaron 10 mg del quitosa y se disolvieron en 5 ml de agua miliQ estéril para que la preparación quedara a una concentración de 2 mg/ml.
- 2.-Se le dio un vortex al tubo para que el contenido se disolviera bien.

- 3.- Posteriormente se filtró con un filtro de 0.22 micras y se alicuotó en tubos de 1.5 ml estériles.
- 4.- Finalmente se guardaron a -20 °C.

7.5.2 Preparación de Complejos Quitosan-Plásmido

7.5.2.1 Quitosán Novafect.

- 1.- Se descongeló una alícuota del quitosán preparado a 2 mg/ml del quitosán del Novafect.
- 2.- Se preparó un stock de 0.5 mg/ml o 0.5 µg/µl del plásmido pCEM o pNFKb-Luc.
- 3.- Para la preparación de los complejos quitosán/plásmido se agregó el plásmido al agua pura mili Q y después se añadió el quitosán a la mezcla agua/plásmido dando un vortex de 1,200 rpm por al menos 20 segundos. Una guía de formulados se muestran a continuación:

Tabla II. Formulación para Radios de Peso (plásmido: Novafect)

Radios	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60
Plásmido (0.5 mg/ml)	2.64 µl					
Novafect *	4.42 µl	8.84 µl	13.3 µl	17.7 µl	22.1 µl	26.5 µl
Agua pura	92.94 µl	88.52 µl	84.06 µl	79.66 µl	75.26 µl	70.86 µl
Volumen total	100 µl					

*Concentración de 2 mg/ml

-Para 0.33 µg / pozo en placa de 96 pozos a una constante de 13.2 µg/ml (reacciones 4x)

NOTA: Los radios indicados en la tabla II son radios de nitrógeno: fosfato

7.5.2.2.-Quitosan Coyote Foods.

- 1.- Se descongeló un tubo con quitosán Coyote Food de una [] de 2 mg /ml.
- 2.- Se preparó una solución stock de 0.5 mg/ml o 0.5 µg/µl del plásmido.
- 3.- Se añadió el plásmido al agua pura y después se añadió el quitosán a la mezcla agua/plásmido dando un vortex de 1,200 rpm por al menos 20 segundos.
- 4.- La cantidad de quitosán dependerá de la cantidad de plásmido que se vaya a usar.

Tabla III. Formulación para Radios de Peso (plásmido: Coyote Foods)

Radios	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60
Plásmido (0.5 mg/ml)	2.64 µl					
Coyote Foods *	6.6 µl	13.2 µl	19.8 µl	26.4 µl	33 µl	39.6 µl
Agua pura	90.76 µl	84.16 µl	77.56 µl	70.96 µl	64.36 µl	57.66 µl
Volumen total	100 µl					

*Concentración de 2 mg/ml

Tip:

*Se utilizaron radios peso: peso contrario a los radios que se usaron para el quitosán Novafect los cuales fueron radios de carga nitrógeno: fosfato.

Los radios se dan por 0.67 µg de quitosán / 1 µg de plásmido” en radios de peso.

7.5.3.- Gel de Retardo para Observar la Retención o Migración del pDNA en los Complejos de Quitosan:Plásmido.

1.- Una vez realizado el protocolo anterior de cada uno de los radios se pusieron a incubar los complejos a 37 °C en 3 volúmenes de PBS 1x o medio DMEM F12 sin suero fetal bovino /5 hrs.

2.-Posteriormente se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 0.7 % con marcador de peso molecular y un control de plásmido desnudo y se corrieron por 45 min a 100 mV - 150 miliampers.

3.- Una vez terminado el corrimiento se tiñó con bromuro de etidio y se observó el gel teñido en una cámara con luz UV.

4.- Se realizaron experimentos de corrimiento electroforético preparando la agarosa y el buffer a diferentes pHs para observar si el pDNA se desprende del quitosán y migra en el gel. Los pHs probados fueron de pH 5.0 y de 8.5

7.5.4. Caracterización de los Complejos:

Ver sección 4.5.2.

7.5.5.- Transfección de Células HeLa en Placa de 96 pozos.

1.- Se sembraron 6 x 10³ células por pozo 24 hrs antes de la transfección.

2.- Se prepararon formulados para transfectar como mezclas 1:1 Novafect/pDNA con medio OptiMEM I hipertónico (580 mM) libre de suero o suplemento, así la formulación final quedaría isotónica. La tonicidad del OptiMEM I se ajustó por la

adición de manitol 270 mM y 20 mM de HEPES, es importante ajustar el pH del medio a 6.7-6.9 (no debe de exceder de 7.2 y esterilizarlo por filtración).

3.- Se lavaron las células cuidadosamente con 200 μ l de PBS 1x.

4.- Seguidamente se añadieron 50 μ l de los formulados preparados anteriormente los cuales fueron para 4 pozos, así cada pozo tubo 0.33 μ g de pDNA. (Cada reacción se realizó al menos por triplicado).

5.- Se incubo a 37 °C, 5% de CO₂ por 5 horas.

6.- Después del periodo de incubación se retiraron los complejos y se agregaron 200 μ l con medio DMEM- f12 con 10 % SFB y 1% penicilina-estreptomicina.

7.- Seguidamente se cambio el medio cada 2 días o cada que ya se vea amarillento.

8.- Finalmente se tomo la lectura de luciferasa después de 72 hrs.

7.5.6.- Lisis de Células Hela para Lectura de Luciferasa.

Ver sección 3.2

7.6.-Análisis Estadístico de los Resultados

Se utilizó análisis estadístico para determinar si habían diferencias significativas entre el grado de transfección del vector pCEM y todas las pruebas de complejos con quitosán y partículas magnéticas, primero utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar el tipo de distribución de los resultados, para lo cual en el caso de los que fueron normales se determinó si hubo diferencia entre los grupos mediante la prueba de ANOVA y posteriormente con la prueba de comparación de medias de Tukey.

8. RESULTADOS

8.1.-Caracterización del Plásmidos pCEM y pNFkB-luc: Enzimática y Secuencia

Se realizó la caracterización del plásmido pCEM por medio de corte de enzimas Hind III y Kpn I, para liberar el promotor sensible a campos magnéticos (HSP70 P) que se le había insertado en el área del promotor al plásmido original pNFkB-Luc. Los Fragmentos obtenidos fueron de 4,783 y 273 pb lo cual era lo esperado. (Fig.7). Posteriormente se realizó la caracterización también del plásmido original pNFkB-Luc Hind III y Nhe I con las que se obtuvieron fragmentos de 4799 pb y 201 pb lo cual era lo esperado (Fig.8)

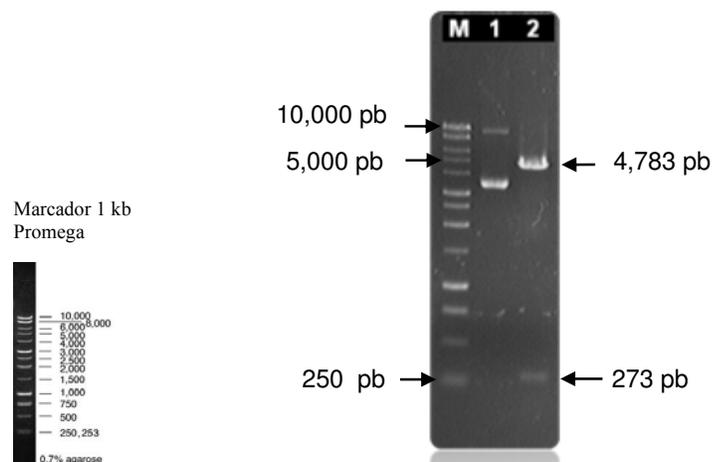


Fig. 7 Digestión de pCEM con Hind III y Kpn I.

Carril M marcador 1 Kb (promega), carril 1 plásmido pCEM sin digerir (5,000 pb), carril 2 digerido con las enzimas Hind III y Kpn I, fragmentos esperados: 4,772 pb y 301 pb.

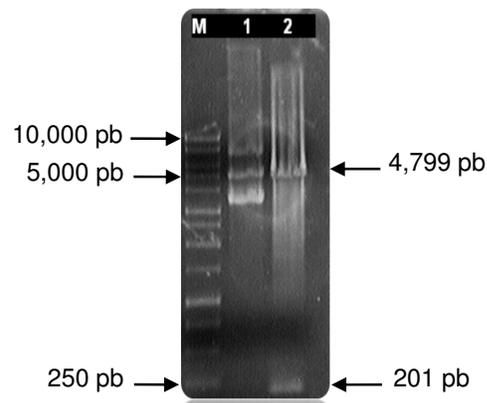
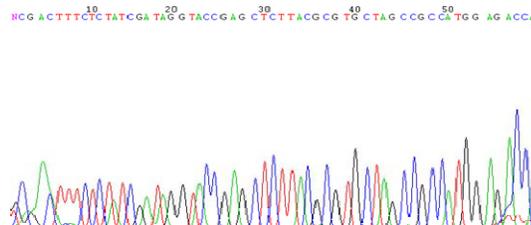


Fig. 8. Digestión de pNFKb-luc con Hind III y Nhe I.

Carril M= marcador 1 kb (promega), carril 1 sin digerir, carril 2 digerido con las enzimas, fragmentos esperados: 4,783 pb y 217 pb.

8.1.1 Secuencia de pCEM-1

Se envió la construcción de pCEM a secuenciar,(Fig.9) observando que una sustitución de una base de C por A, la cual al parecer no afecto los resultados, los cuales se discutirán posteriormente.(Fig. 10).



Resultado de secuenciación del plásmido pCEM

```

ncgactttct  ctatcgatag  gtaccgagct  cttacgcgtg  ctaccgcca  tggagaccaa
cacccttccc  accgcaactc  ccccttctct  tcaggtccc  tgntccctc  cagtgaatcc
cagaagactc  tggagagttc  tgagcagggg  gcggcactct  ggctctgat  tggccaagg
aaggctgggg  ggcaggacgg  gaggcagaaa  ccctggaata  ttcccgacct  ggcagcctca
tcgagctcgg  tgattggctc  agaaggaaa  aggcgggtct  ccgtgacgac  ttataaaagc
ccaggggcaa  ccggtccgga  agcttggcat  tccggtactg  ttggtaaagc  caccatggaa
gacgcaaaaa  acataaagaa  aggcccgcg  ccattctatc  cgctggaaga  tggaaaccgct
ggagagcaac  tgcataaggc  tatgaagaga  tacgccctgg  ttctggaac  aattgctttt
acagatgcac  atatcgaggt  ggacatcact  tacgctgagt  acttcgaaat  gtcggttcgg
ttggcagaag  ctatgaaacg  atatgggctg  aatacaaatc  acagaatcgt  cgtatgcagt
gaaaactctc  ttcaattctt  tatgccggtg  ttgggcgctg  tatttatcgg  agttgcagtt
gcgcccgcga  acgacattta  taatgaacgt  gaattgctca  acagtatggg  catttcgcag
cctaccgtgg  tgttcgtttc  caaaaggggt  tgcaaaaaat  tttgaacgtg  caaaaaagc
tccaatcat  ccaaaaatta  ttatcatgga  ttctaaaacg  gattaccagg  gatttcagtc
gatgtacag  ttcgtcacat  ctcatctacc  tccggnntta  atgaatacga  ttttgtgcna

```

```

gagtccttcg atagggacaa gacattgcac tgatcatgaa ctctctgga tctactggtc
tgctaangt gtcgctctgc ctcatanaac tgctctcgtg agatctcgn t gccanaaatc
ctatTTTTgn catcaatcat ncnganactg cgattttant gtgtncnttc ntcncggttt
ggatgttact acctcggaat tgaatgggat tcagccncta tgtaattga aaaactgttt
gagacctcag ataaaatcaa tggctgtggc accntntntn tccaagcctt atgnatcatt
ntnttccaat gtnnggncnc ntnagatcga acgtgcaagt cttnngtagg

```

Oligo 1 Forward 5'-GCT AGC CGC CAT GGA GAC CAA CAC CC -3'

Oligo 2 Reverse 5'-AAG CTT CCG GAC C GG TTG CCC CTG- 3'

Secuencia: g^ctagc Sitio de corte para NheI

Secuencia: a^agctt Sitio de corte para HindIII

Fig. 9 Resultado de secuenciación del plásmido pCEM.

Secuencia original del promotor de HSP70

```

1 cgccatggag accaacaccc ttcccaccgc cactccccct tcctctcagg gtcctgtcc
61 cctccagtga atcccagaag actctggaga gttctgagca gggggcggca ctctggcctc
121 tgattggtcc aaggaaggct ggggggcagg acgggaggcg aaacccctgg aatattcccg
181 acctggcagc ctcatcgagc tcggtgattg gctcagaagg gaaaaggcgg gtctccgtga
241 cgacttataa aagcccaggg gcaagcggtc cgg

```

Comparación con secuencia clonada en plásmido pCEM-1

```

1 cgccatggag accaacaccc ttcccaccgc cactccccct tcctctcagg gtcctgtcc
61 cctccagtga atcccagaag actctggaga gttctgagca gggggcggca ctctggcctc
121 tgattggtcc aaggaaggct ggggggcagg acgggaggcg aaaaccctgg aatattcccg
181 acctggcagc ctcatcgagc tcggtgattg gctcagaagg gaaaaggcgg gtctccgtga
241 cgacttataa aagcccaggg gcaaccggtc cgg

```

- Secuencias en azul = parte de oligos sin secuencia de enzimas.
- Bases en color rojo son cambio o sustitución de bases.
- Secuencias en verde son EMRE o Electromagnetic Response Element (Elementos de respuesta a campos electromagnéticos)

Fig. 10. Comparación de Secuencias de Promotor HSP70 y Secuenciación del Promotor de Plásmido pCEM.

8.1.2 Microscopía de transmisión (TEM) y de fuerza atómica (AFM) de nanopartículas magnéticas CombyMAG.

Se realizó microscopía de transmisión (TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM) a partículas magnéticas CombyMAG.(Fig.11)

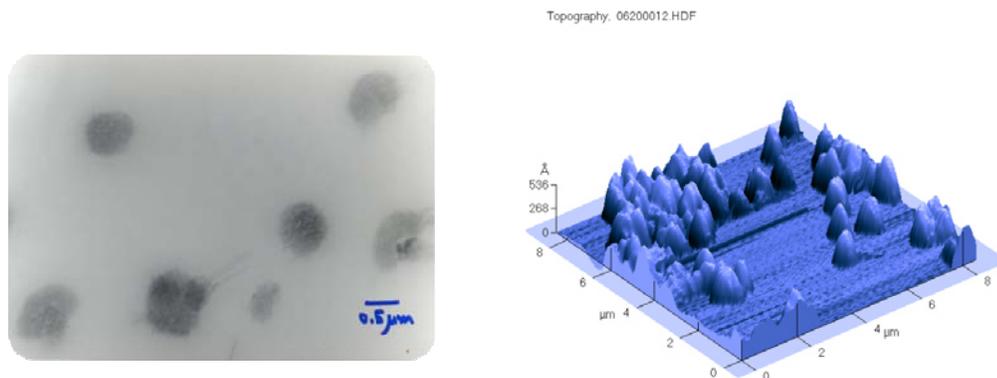


Fig.11.-Microscopía electrónica y de fuerza atómica de CombyMAG. Microscopía de transmisión (TEM) izq, y de microscopía de Fuerza atómica (AFM) der., de partículas magnéticas CombyMAG.

8.2.- MaxiPreps para Obtención de Plásmidos pCEM y pNFkB-luc

Se elaboró Maxiprep de ambos plásmidos pCEM y pNFkB-Luc, siendo ambos de 5 kb se obtuvieron bandas de plásmido relajado, enrollado y superenrollado:

(fig. 12 y fig. 13)

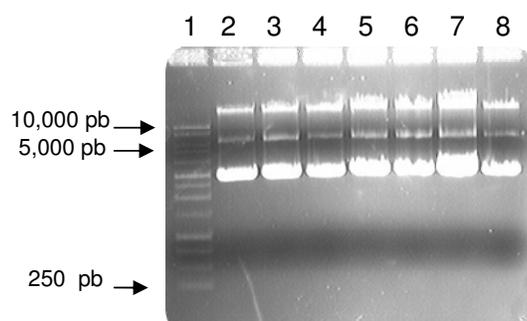


Fig.12.- Maxi prep de pCEM-1. Carril 1 Marcador 1kb, carriles 2-8 preps de pCEM-1

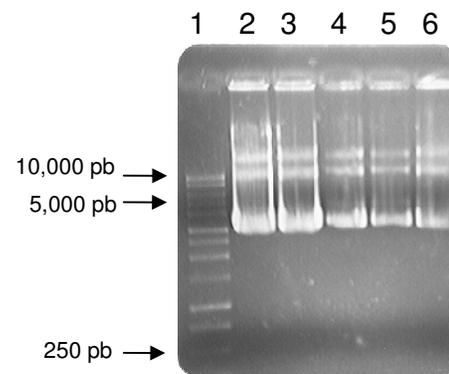


Fig.-13 Maxi prep de pNFkB-luc. Carril 1 marcador 1 kb, carriles 1-5 preps de pNFkB-luc.

8.3.-Estandarizacion de Formación de Complejos Plásmido/Quitosan

Una vez obtenidos los plásmidos se realizaron mezclas a diferentes radios nitrógeno: fosfato para la estandarización de las cantidades de quitosán insoluble en agua y plásmido. Se observa una buena retención del pDNA en todos los radios probados (fig. 14 y fig. 15). Para cuestiones de transfección se realizaron pruebas para observar estabilidad de los complejos en diferentes medios: agua, PBS 1 x , medio DMEM sin suero fetal y buffer de una enzima DNAsa, observándose que el buffer de la enzima RQ1 desestabilizaba los complejos haciendo que el pDNA se saiera de su carril y migrara (fig. 16).

8.3.1 Complejos pDNA/Quitosan Insoluble en Agua.

- Quitosan marca Sigma (# CAT. C3646)
- Peso molecular quitosán:~340 kDa, quitosán con 80 % de deacetilación (D.A.)
- [] de quitosán 0.75%. [] Acido acético 1%
- [] de plásmido 0.89µg/µl
- [] Agarosa al 0.75%

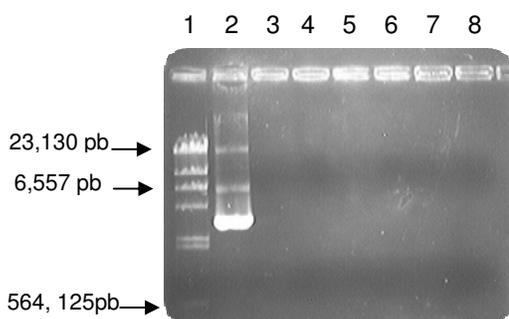


Fig. 14.- Gel de retardo. Complejos quitosán insoluble/plásmido (A) (Agarosa 0.75%.)

Carril 1 (marcador Lambda DNA/Hind III), 2 = (control desnudo) resto de los carriles radio nitrógeno: fosfato = 2:1, 3:1, 5:1, 8:1, 12:1, 16:1 respectivamente. (Todos los pozos Tienen 1 µg de pDNA).

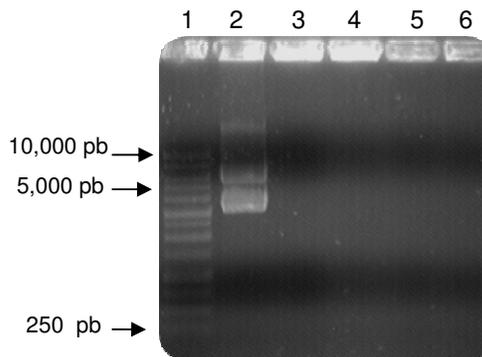


Fig. 15.- Gel de retardo. Complejos quitosán insoluble/plásmido (B) (Agarosa 0.75%.)

Carril 1 (marcador 1kb promega), c = (control desnudo) resto de los carriles radio nitrógeno: fosfato = 4:1, 6:1, 8:1, 10:1 respectivamente incubados con DMEM sin SFB/24 hrs. (Todos los pozos Tienen 1 µg de pDNA).

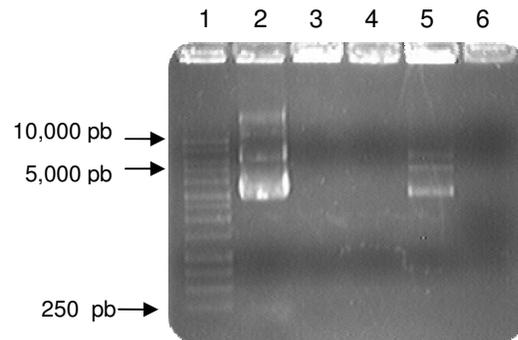


Fig. 16.- Gel de retardo complejos quitosán: plásmido ratio 8:1.

Descripción: 1 μ g/pozo, agarosa 0.75%. Carriles: 1 marcador 1 Kb, 2 control desnudo y el resto son complejos incubados con: 20 μ l de agua, 20 μ l de PBS 1x, 20 μ l de buffer RQ1 y 20 μ l de DMEM sin SFB respectivamente. (Incubación 24 hrs)

8.3.2 Complejos pDNA/Quitosán Soluble en Agua

Se realizaron corrimientos de retardo con quitosanes solubles en agua. Se probaron dos quitosanes solubles en agua de la marca NOVAMATRIX llamados O15 y O25 el cual les designa grado de polimerización y un quitosán soluble en agua de la marca COYOTE FOODS el cual es utilizado a nivel hospitalario para pacientes con quemaduras. En los resultados se observa que el polímero O15 retienen el plásmido desde un ratio de peso de 18:1 o mayor (fig. 17 y fig. 18). Se realizaron corrimientos de O15 y O25 a diferentes pH's para observar su estabilidad a pH ácido (pH 5) y neutro (pH 7.4), los cuales se observan bastantes estables (Fig. 19-22). En la fig. 23 podemos observar el quitosán O15 deja de ser estable en el ratio de 10:1 cuando es sometido a medios a pH de 8.4.

8.3.2.1.-Quitosán marca Novamatrix (Novafect).

- Peso molecular quitosán: 4-6 kDa, quitosán con 97 % de deacetilación (D.A.)
- Quitosán O15 oligomero lineal con un grado de polimerización (DP_n) 15-25
- Quitosán O25 oligomero lineal con un grado de polimerización de 25- 40
- [] de quitosán 2mg/ml = [] 0.2 %
- [] de plásmido 0.5 μ g/ μ l
- [] Agarosa al 0.75%

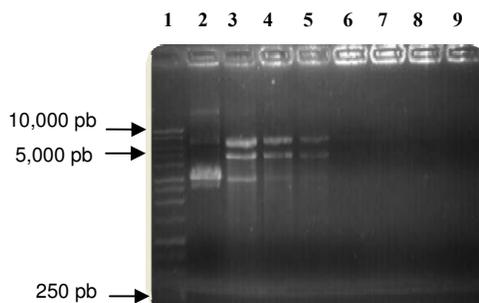


Fig. 17.- Gel de retardo quitosan Novafect O15 (A). 1.5 μ g/pozo, agarosa 0.75%.

Carriles: 1 marcador 1 Kb , carril 2 control desnudo, carriles 3-9 radio 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 12:1, 16:1 y 18:1 respectivamente , no se incubaron con medio se cargaron al gel y se corrieron directamente.

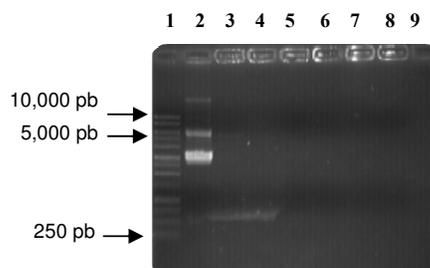


Fig. 18.- Gel de retardo quitosan Novafect O15 (B). 1.5 μ g/pozo, agarosa 0.75%.

Carriles: 1 marcador 1 kb, carril 2 control desnudo, carriles 3-9 radio 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60 respectivamente, no se incubaron con medio se cargaron al gel y se corrieron directamente.

8.3.2.1.1-Geles y Buffer Preparados a pH 5.0 (O15 y O25)

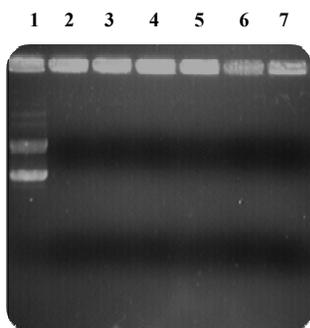


Fig. 19.- Gel de retardo quitosan Novafect O15 pH 5.0.

Carril 1: plásmido desnudo, carriles 2-7 radios de carga: 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1 respectivamente. Gel y buffer preparados a pH 5.0. Incubación de 5 horas en medio OptiMEM I

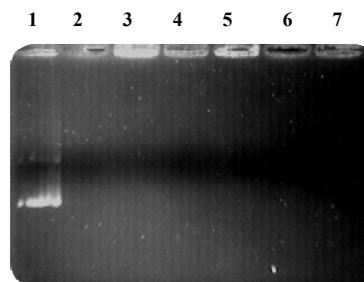


Fig. 20.- Gel de retardo quitosan Novafect O25 pH 5.0.

Carril 1 = plásmido desnudo, carriles 2-7 radios de carga: 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1 respectivamente. Gel y buffer preparados a pH 5.0. Incubación de 5 horas en medio OptiMEM I

8.3.2.1.2.-Geles y Buffer Preparados a pH 7.4. (O15 y O25).

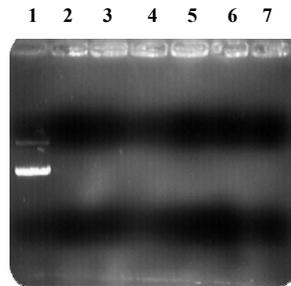


Fig. 21.- Gel de retardo quitosan **Novafect O15** pH 7.4.

Carril 1: plásmido desnudo, carriles 2-7 radios de carga: 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1 respectivamente. Gel y buffer preparados a pH 7.4 Incubación de 5 horas en medio OptiMEM I.

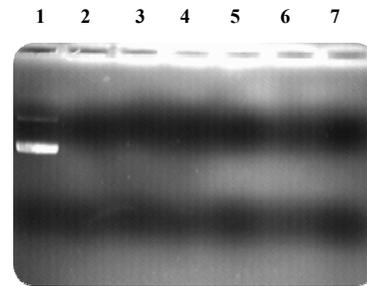


Fig. 22.- Gel de retardo quitosan **Novafect O25** pH 7.4.

Carril 1: plásmido desnudo, carriles 2-7 radios de carga : 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1 respectivamente. Gel y buffer preparados a pH 7.4 Incubación de 5 horas en medio OptiMEM I.

8.3.2.1.3.-Geles y Buffer Preparados a pH 8.4. (O15).

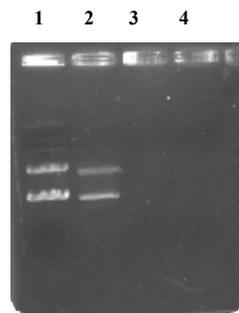


Fig. 23.- Gel de retardo quitosan **Novafect O15** pH 8.4.

Carril 1: plásmido desnudo, carriles 2-4 radios de carga: 10:1, 40:1 y 60:1 respectivamente. Gel y buffer preparados a pH 8.4 Incubación de 5 horas en medio OptiMEM I.

8.3.2.2 Quitosan Soluble en Agua Coyote Foods

Dentro de los resultados obtenidos con el quitosán COYOTE FOODS, se puede observar que este quitosán comienza a retener el pDNA acomplejándose con él a partir de radios mayores a 8:1 cuando los complejos quitosán: plásmido son preparados y cargados directamente en el gel es decir sin incubación en algún medio (fig. 24 y 25). También se determinó que el medio DMEM utilizado para transfectar en células estos complejos, hace que estos se desestabilicen si permanecen incubándose en el medio/24 horas, desintegrándose y haciendo que el pDNA migre de su carril (fig. 26). Se observó también que incubado los complejos por 18 horas, tanto en DMEM F12 sin SFB y en OPTIMEM-I sin SFB, estos medios hacen que migren el pDNA (fig.27). Posteriormente se realizaron pruebas a 5 horas de incubación observamos que en el medio DMEM-F12 si se lograban retener los complejos a radios de carga quitosán: plásmido alrededor de 66:1 (fig. 28 y fig. 29). Se observó también que si se utilizaba OPTIMEM I en lugar de DMEM F12 el radio que se necesitaba para que los complejos fueran estables, era desde 20:1 (en lugar de 66:1) con DMEM F12 (fig. 30).

- [] de quitosán 1 mg/ml y 3 mg/ml

- Peso Molecular 20 kDa.

- [] Agarosa al 0.75%

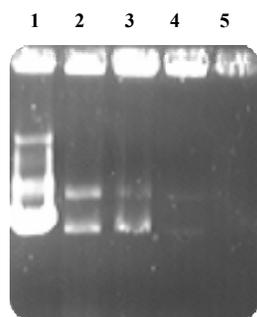


Fig. 24.- Gel de retardo quitosán/plásmido diferentes radios de peso. (A)

Carril 1 pDNA control, carriles 2-5 radios: 2:1, 4:1, 6:1 y 8:1 respectivamente. Complejos no incubados y cargados en carril directamente. Quitosán [1 mg/ml].

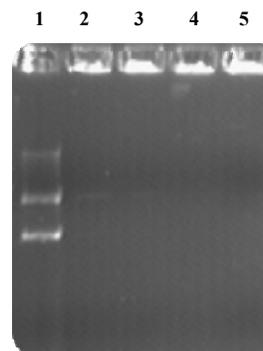


Fig. 25.- Gel de retardo de quitosán/plásmido diferentes radios de peso. (B)

Carril C = pDNA solo control, carriles 1-4 radios: 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, respectivamente. Complejos no incubados y cargados en carril directamente. Quitosán [1 mg/ml].

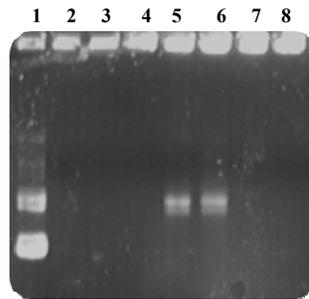


Fig. 26.- Gel de retardo de quitosán/plásmido radio de peso 10:1.

Carril 1 = pDNA solo control, complejo sin incubar, 3 Y 4 complejos incubados con 30 µl de NaCl 150 mM, 5 y 6 complejos incubados con 30 µl de DMEM No SFB, 7 y 8 complejos incubados con 30 µl de PBS 1x., todos incubados 24 horas. Quitosán [1 mg/ml].

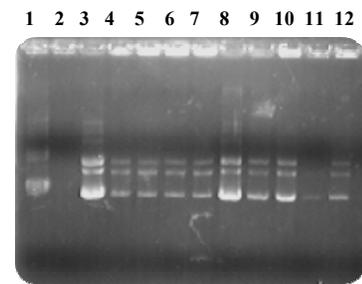


Fig. 27.- Gel de retardo de quitosán Coyote/plásmido a diferentes radios de peso.

Carril 1 : plásmido solo, 2: control radio 8:1 sin incubar, 3: plásmido incubado con medio OptiMEM-1, carriles 4-7: radios 8:1, 14:1, 18:1, 22:1 respectivamente incubados con OptiMEM-1/18 hrs, carril 8: plásmido incubado con DMEM F12/No SFB, carriles 9-12: radios 8:1, 14:1, 18:1, 22:1 respectivamente incubados con DMEM F12/No SFB/18 hrs. Quitosán [1 mg/ml].

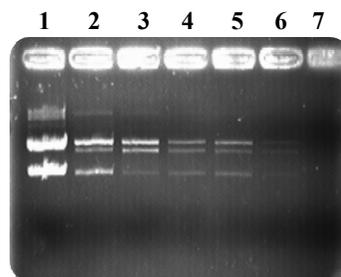


Fig.-28 Gel de retardo quitosán coyote/plásmido, diferentes radios de peso con 1.5 µg.

Carriles: 1 = control desnudo 1.5 µg, carriles 2-7, radios: 20:1 ([] quitosán 3 mg/ml), 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 60:1 respectivamente. Complejos incubados con 20 µl de DMEM no SFB por 18 hrs. Chito san [] 1 mg/ml. Plásmido [0.89 µg/µl]. pH 7.4

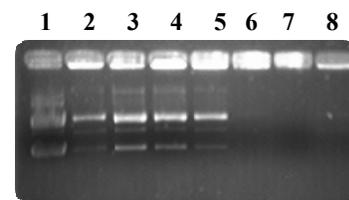


Fig. 29.- Gel de retardo de quitosán/plásmido diferentes radios de peso.

Carril = pDNA solo, carriles 1-6 radios: 4:1, 6:1, 10:1, 20:1, 30:1, 70:1 respectivamente, carril c: control (quitosán en ácido acético radio 2:1). Todos incubados con 15 µl de DMEM/5 hrs sin SFB. Quitosán [2mg/ml]

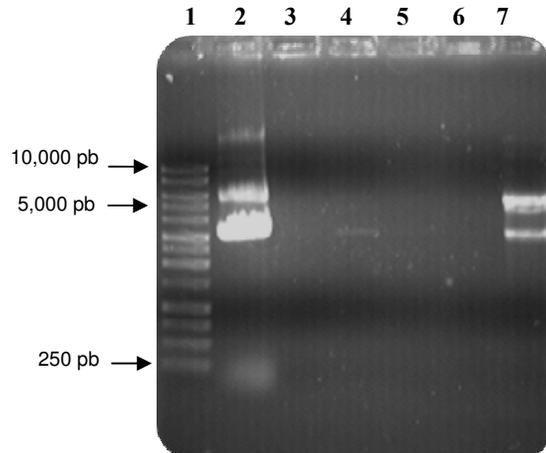


Fig.-30.- Gel de retardo quitosán /plásmido, diferentes radios de peso con 3.0 μ g.

Carril 1 = control, carril 2 control desnudo 3.0 μ g, carriles 3-7 radios: 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 y plásmido desnudo (carriles 3-6 incubados con 1 volumen de OptiMEM I/ 12 hrs. Quitosán [1 mg/ml].

8.4. Resultados de Potencial Z

8.4.1 Complejos con Quitosán Insoluble en Agua. Técnica: Laser Doppler Electrophoresis (Malvern z sizer).

La obtención del potencial Z y de los tamaños de los complejos se realizó por medio del instrumento Zetasizer nano ZS90 de MALVERN. Los resultados se obtuvieron cargando los complejos en celdas para potencial Z desechables disueltas en NaCl 1 mM. Los complejos quitosán/plásmido (PQ) preparados con quitosán insoluble en agua arrojaron valores de potencial entre 9 y 14 (resultados de más de 4 repeticiones), los resultados de los complejos quitosán/ plásmido con partículas magnéticas de PolyMAG (NQP) mostraron u tendencia similar en potencial Z con los complejos sin partículas magnéticas (PQ), observándose un incremento en la carga en ambos tipos de complejos hasta el radio 8:1 y disminuyendo en el radio 10:1 (Tabla IV). Para el caso de los complejos NQP preparados con CombyMAG el aumento de la carga es siempre visible al aumentar el radio de quitosán: plásmido, ya que las partículas magnéticas CombyMAG por si solas tienen cargas negativas y al aumentar la cantidad de quitosán aumentó la carga de los complejos.

Tabla IV.- Resultados de potencial Z de complejos plásmido/quitosán (PQ) y nanopartículas magnéticas/plásmido/quitosán (NPQ).

Radio N:P	Complejo PQ*	Complejo NPQ** PolyMAG	Complejo NPQ CombyMAG
4:1	+9.29 ± 1.29	+9.12 ± 1.83	-3.04 ± 0.82
6:1	+13.92 ± 1.64	+10.22 ± 0.85	0.46 ± 0.82
8:1	+17.06 ± 1.18	+12.02 ± 1.55	+8.99 ± 1.41
10:1	+14.04 ± 1.25	+9.64 ± 2.05	+10.83 ± 2.59

PolyMAG	+23.14 ± 2.57
CombyMAG	-15.078 ± 0.69

El potencial Z de las partículas fue determinado en una solución de NaCl al 1 mM

*PQ = plásmido /quitosán

**NPQ =nanopartícula magnética/plásmido/quitosán

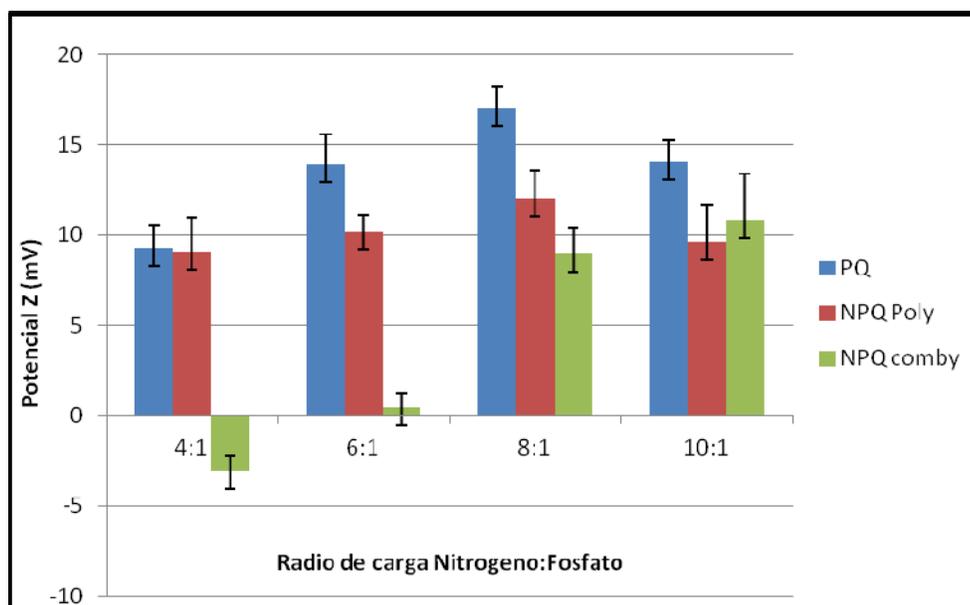


Fig. 31. Potencial Z de partículas con quitosán insoluble en agua. Complejos quitosán-plásmido (PQ), quitosán-plásmido-PolyMag (NPQ Poly), quitosán-plásmido-CombyMAG (NPQ Comby) a diferentes radios de nitrógeno: fosfato.

8.4.2. Complejos con Quitosán soluble en agua. Técnica: Laser Doppler Electrophoresis (Malvern z sizer).

Para complejos preparados con los quitosanes solubles en agua, se midieron solo los radios que mostraron mejores resultados en transfecciones preliminares. Los radios medidos para O15, O25 y el quitosán de Coyote Foods fueron de 60:1, 20:1 y 40:1 respectivamente. Los resultados mostraron que los tres quitosanes mezclados por separado con pDNA en sus respectivos radios, mostraron cargas altas y muy similares entre sí (Tabla V). Por otro lado los valores observados para los complejos de Nova O15, O25 y quitosán Coyote con pDNA con partículas magnéticas CombyMAG mostraron que solo los complejos con Coyote mantenían una carga positiva utilizando la misma cantidad de partículas magnéticas para cada prueba. Posiblemente porque el quitosán Coyote es de mayor peso molecular (20 Kda) que el de los de Novafect (3-5 kDa). Se utilizó como control los complejos PEI/pDNA.

Tabla V.- Resultados de Potencial Z de Complejos Preparados con Quitosán Soluble en Agua.

Tipo de partícula	Radio peso:peso	Potencial Z
PQ*	Nova O15/plásmido (60:1)	+ 19.4 ± 0.45
PQ	Nova O25 /plásmido (20:1)	+ 24.8 ± 0.242
PQ	NovaG214/plásmido (5:1)	+ 22.6 ± 1.38
PQ	Coyote/pDNA (40:1)	+ 24.4 ± 0.67
Control'	Comby solas	-16.6 ± 0.46
NPQ*	Comby/O15	-15.0 ± 0.309
NPQ	Comby/O25	-11.7 ± 0.201
NPQ	Comby/G214	+ 12.2 ± 0.688
NPQ	Comby/coyote	+ 12.9 ± 0.877
Control''	PEI/pDNA	+ 35 ± 1.67

*PQ = plásmido /quitosán.

**NPQ =nanopartícula magnética/plásmido/quitosán.

Control' = Partículas Magnéticas CombyMAG Solas.

Control'' = Complejo con PEI usado como control en transfecciones y en medición de potencial.

Potencial Z de partículas medido en NaCl 1 mM

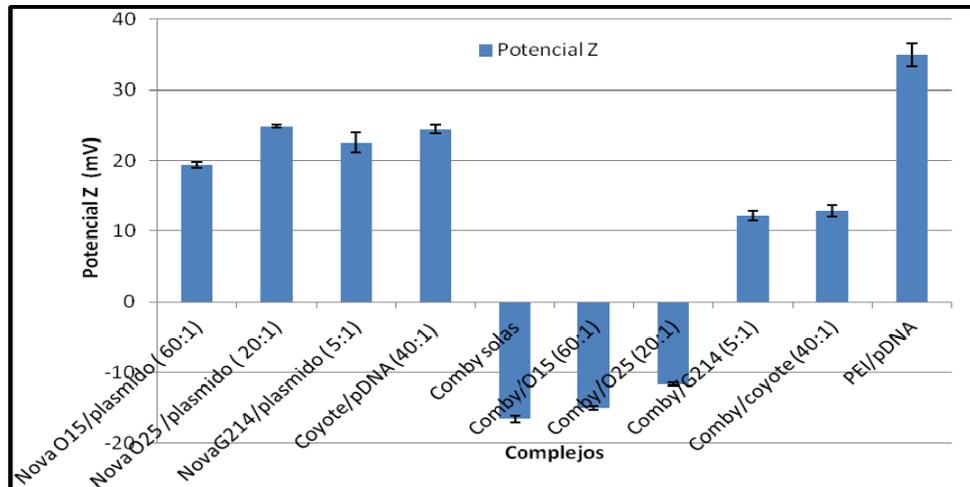


Fig.32. Potencial Z de partículas con quitosán soluble en agua. Complejos quitosán-plásmido (PQ), quitosán-plásmido quitosán-plásmido-CombyMAG (NPQ) a diferentes radios de peso: peso quitosán-plásmido.

8.5. Resultados de Tamaño de los Complejos por Dinamic Light Scattering

8.5.1.-Resultados de Tamaño de Complejos con Quitosan Insoluble en Agua.

Los resultados se obtuvieron con la ayuda del instrumento Zetasizer nano ZS90 de MALVERN y utilizando celdas para medición de tamaño desechables. Los resultados son la media de 4-6 repeticiones por cada muestra. Los complejos con quitosán insoluble en agua/pDNA se observaron de diferentes tamaños, observando una ligera disminución en el tamaño con forme aumentaba el radio quitosán: pDNA. (Tabla VI). Por otro lado en los complejos preparados con PolyMAG y CombyMAG se observó una tendencia de disminuir el tamaño desde el radio 2:1 hasta el radio 8:1, posteriormente en el radio 10:1 el tamaño vuelve a aumentar en ambos casos. (Tabla VI).

Tabla VI.- Resultados de Tamaños de Complejos Preparados con Quitosán Insoluble en Agua/pDNA con y sin Partículas Magnéticas.

Radio N:P	Complejo PQ*	Complejo NPQ** PolyMAG	Complejo NPQ CombyMAG
4:1	611.7 ± 17.97	781.74 ± 67.46	650.6 ± 20
6:1	657.35 ± 58.32	591.06 ± 64.03	640 ± 32.43
8:1	490.33 ± 17.90	434.63 ± 67.26	480 ± 25.41
10:01	488.06 ± 8.25	636.44 ± 40.23	602.5 ± 15.03

Tamaño de Partículas
En Agua

PolyMag	182.3 nm
CombyMag	109 nm

*PQ = plásmido /quitosán.

**NPQ =nanopartícula magnética/plásmido/quitosán.

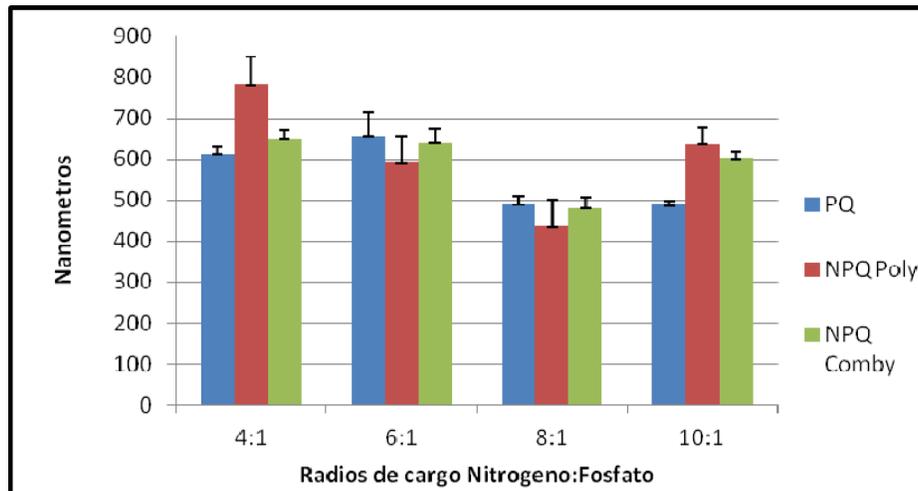


Fig.33.- Tamaño de partículas de complejos con quitosán insoluble en agua. Quitosán-plásmido (PQ), quitosán-plásmido-PolyMag (NPQ Poly), quitosán-plásmido-CombyMAG (NPQ Comby) a diferentes radios de nitrógeno: fosfato.

8.5.2.-Resultados de Tamaño en Complejos con Quitosan Soluble en Agua

Al igual que con los resultados de quitosán insoluble en agua los complejos con quitosán soluble en agua también se obtuvieron con la ayuda del instrumento Zetasizer nano ZS90 de MALVERN y utilizando celdas para medición de tamaño desechables. Los resultados son la media de 4-6 repeticiones por cada muestra. Los resultados muestran que los complejos preparados con O15 muestran una reducción de tamaño conforme aumenta el radio (30:1-60:1). En los resultados con el Novafect O25 sucede lo contrario el tamaño aumenta si se aumenta el radio de 10:1-20:1 y con el quitosán Coyote Foods el tamaño disminuye considerablemente al aumentar el radio de 33:1 a 60:1. A estos complejos de quitosán/plásmido al agregarles partículas magnéticas los tamaños aumentan entre 50-100 nm mas dependiendo del tipo de quitosán ver tabla VII.

Tabla VII.- Resultados de Tamaños de Complejos Preparados Quitosán Soluble en Agua/pDNA con y sin Partículas Magnéticas.

Complejos	Tamaño de complejos (nm)
Nova O15/plásmido (30:1)	237.4 ± 37.37
Nova O15/plásmido (60:1)	193 ± 14.74
Nova O25 /plásmido (10:1)	175.5 ± 10.02
Nova O25 /plásmido (20:1)	308.1 ± 59.91
NovaG214/plásmido (5:1)	229.9 ± 29.88
Coyote/pDNA (33:1)	334 ± 31.34
Coyote/pDNA (60:1)	161.8 ± 21.21
Comby solas	109 ± 12.67
Comby/O15 (60:1)	246.6 ± 23.82
Comby/O25 (10:1)	283 ± 13.38
Comby/G214 (5:1)	296.8 ± 64.4
Comby/coyote (40:1)	278 ± 26.07
PEI/pDNA	100 ± 5.33

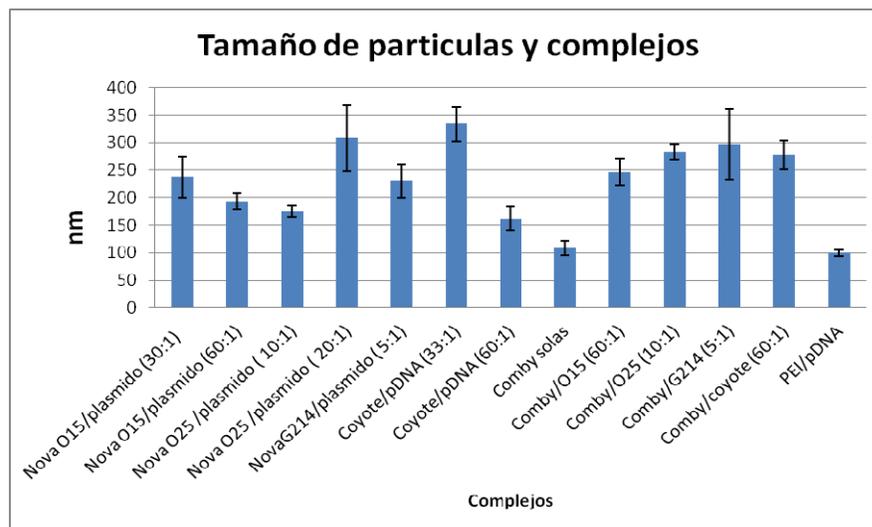


Fig.34.- Tamaño de partículas de complejos con quitosán soluble en agua. Distintos complejos de quitosán a diferentes radios de carga peso: peso.

8.6.- Microscopia Electrónica de Complejos NQP (Quitosan Insoluble en Agua).

Se tomaron fotografías de microscopia electrónica de transmisión con un microscopio Jeol modelo 200CX utilizando celdillas recubiertas de oro. En una muestra están las partículas magnéticas solas y en otra están los complejos de quitosán/pDNA/CombyMAG. Se observan partículas magnéticas de alrededor de unos 200 nm (fig. 35) y los complejos quitosán/pDNA/CombyMAG de alrededor de unos 800 – 1000 nm (fig. 36). Se puede observar en las figuras 36 y 37 el centro de hierro de los complejos.

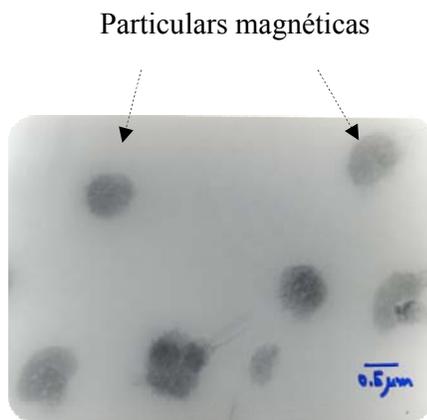


Fig. 35.- Microscopia electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas magnéticas Combymag.

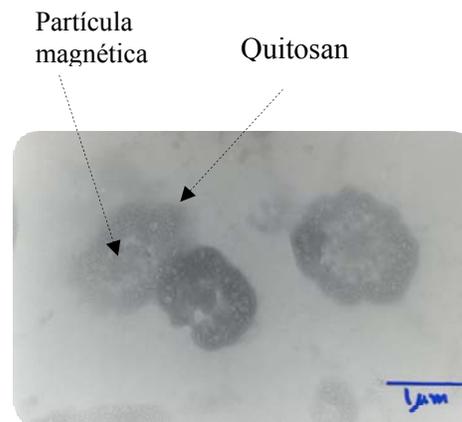


Fig. 36.- Microscopia electrónica de transmisión (TEM) de complejos (NPQ CombyMAG) Radio 8:1.

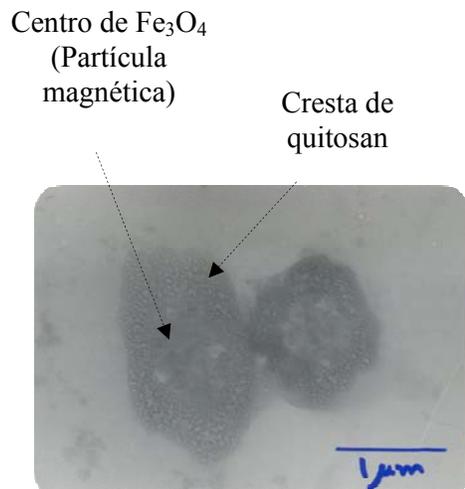


Fig. 37.- Acercamiento de microscopia electrónica de transmisión (TEM) de complejos (NPQ CombyMAG.) Radio 8:1

8.6.1.- Microscopia Electrónica de Complejos NQP (Quitosan Soluble en Agua).

Para los complejos preparados con quitosán soluble en agua, se utilizó un microscopio de transmisión (TEM) modelo Titán 80-300 G2 marca FEI, en el cual se utilizaron unas celdas para TEM denominadas “holey carbón” las cuales cuentan con una red de orificios que nos permiten identificar a la muestra rápidamente ya que la muestra se queda adherida en los bordes de algunos de los orificios. En los resultados fotográficos se observaron complejos quitosán/pDNA/CombyMAG con radio de 40:1 con el quitosán soluble en agua COYOTE FOODS. En la figura no. 38 se muestra una vista panorámica de los complejos los cuales se observan como pequeñas bolitas adheridas en los bordes de la red. En la figura no. 39 se diferencia la matriz utilizada y los complejos los cuales se observan con formas redondas de tipo centro rodeado de una cresta, donde el quitosán el cual formaría la cresta se observa claro-transparente y el centro se observan las partículas magnéticas las cuales se ven oscuras. En las figuras no. 40-42 se observa el alineamiento de los electrones en las partículas magnéticas que forman parte de los complejos quitosán/pDNA/CombyMAG (ya que las partículas magnéticas al ser vistas en un microscopio electrónico este hace incidir electrones sobre la muestra las cuales consecuentemente alinean sus electrones observándose los alineamientos en las fotografías, caso típico al observar este tipo de muestra y esto nos ayuda a diferenciar muy bien la capa o cresta que los cubre de quitosán. En la figura no. 42 se desenfoca a propósito la toma de la fotografía para observar mejor el alineamiento de electrones de los complejos que si tienen partículas magnéticas (complejos izquierda) y diferenciarlos de los que no tienen partículas magnéticas, es decir cuentan con puro plásmido/quitosán (complejos derecha).

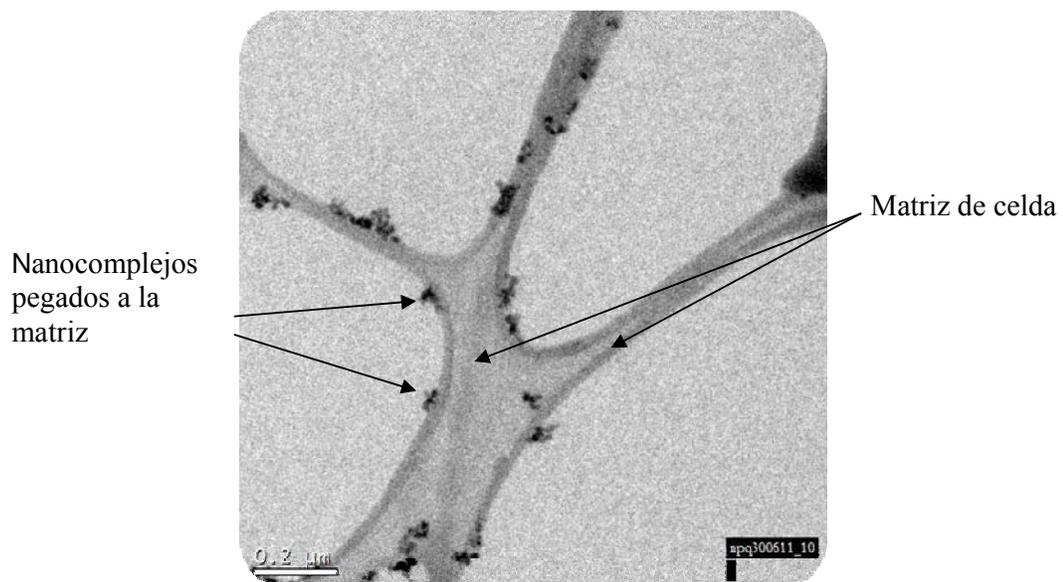


Fig. 38.- Matriz para TEM con complejos adheridos. Matriz especial para Microscopia electrónica de Transmisión, usada para observar complejos de nanopartículas magnéticas y plásmido envueltos en quitosán.

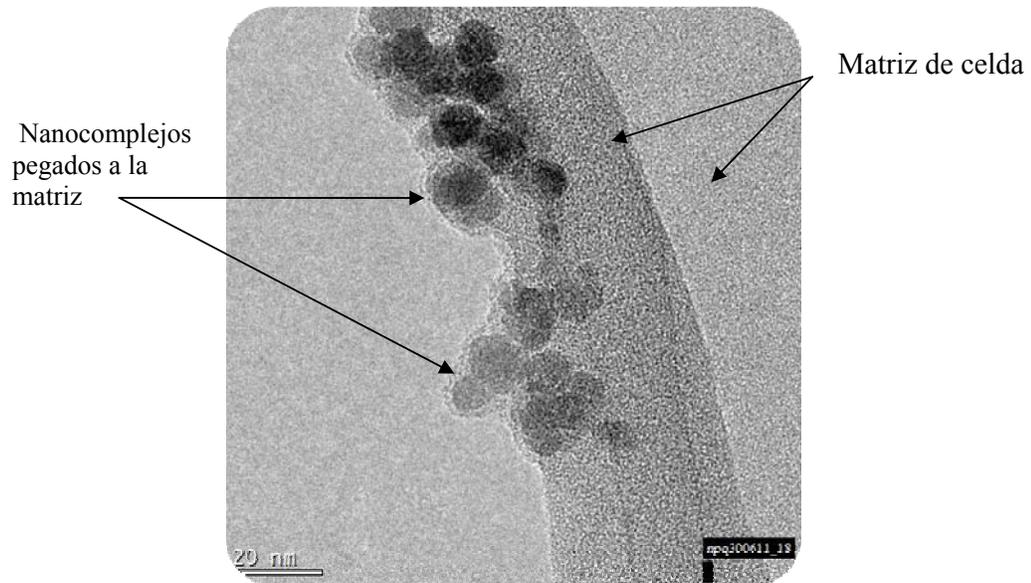


Fig. 39.- Imagen en TEM de complejos NPQ (QSA) adheridos a la matriz y enfocados. Acercamiento a la matriz con complejos adheridos de nanopartículas magnéticas envueltas con quitosán y el plásmido pCEM.

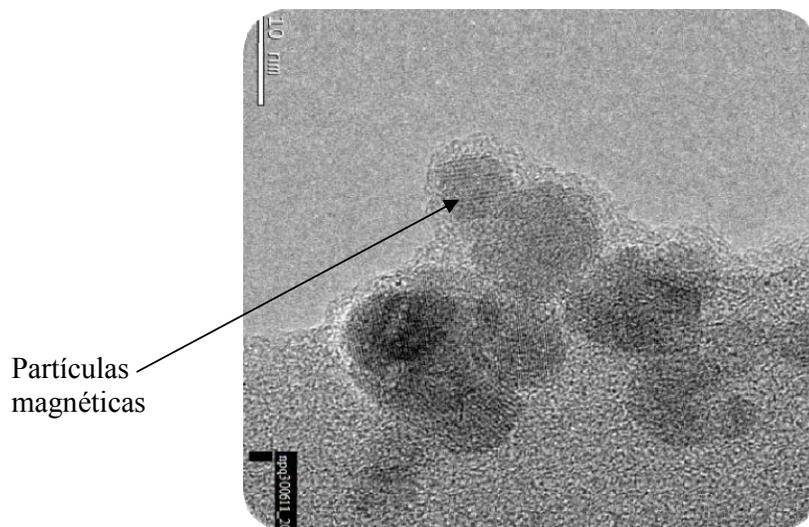


Fig. 40.- Imagen TEM de complejos NPQ (QSA) A. Complejos de nanopartículas magnéticas envueltas con quitosán. Se puede observar alineamiento de los electrones de las partículas de hierro en forma de pequeñas líneas formadas.

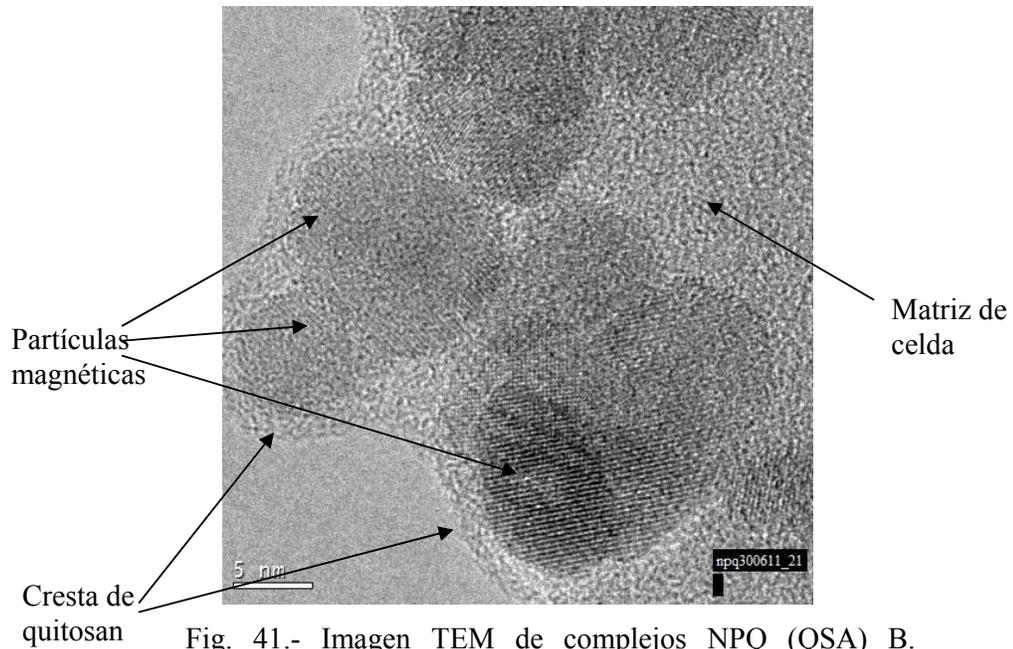


Fig. 41.- Imagen TEM de complejos NPQ (QSA) B. Complejos de nanopartículas magnéticas envueltas con quitosan. Se puede observar alineamiento de los electrones de las partículas de hierro en forma de pequeñas líneas

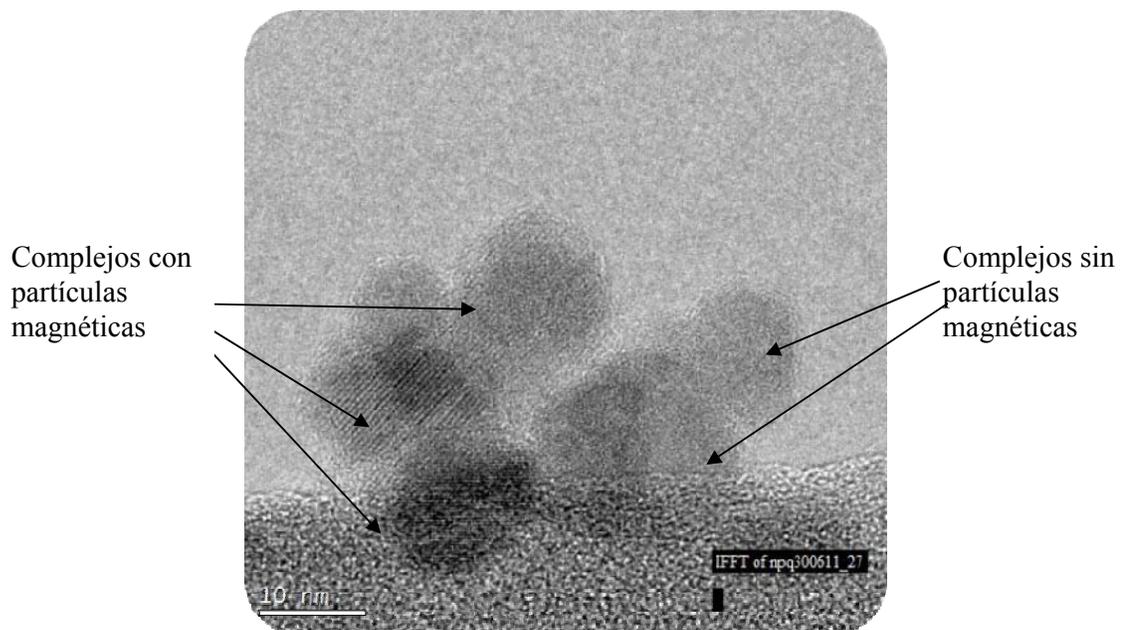


Fig. 42.- Imagen TEM de complejos NPQ desenfocados. Complejos desenfocados para observar mejor cuales complejos tienen partículas magnéticas. Se puede observar alineamiento de los electrones de las partículas de hierro en forma de pequeñas líneas formadas. Complejos con partículas

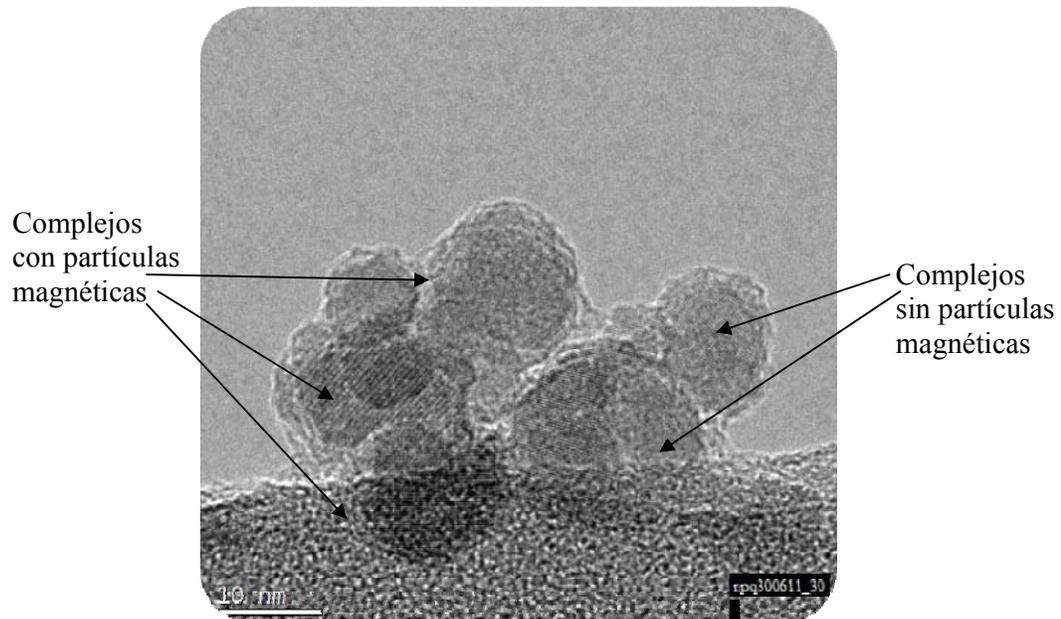


Fig. 43.- Imagen TEM de complejos NQP (QSA) enfocados. Complejos enfocados para observar mejor cuales complejos tienen partículas magnéticas. Se puede observar alineamiento de los electrones de las partículas de hierro en forma de pequeñas líneas formadas.

8.7.- Experimentos de Transfección de la Línea B16f10 con Complejos PQ y NPQ con Quitosán Insoluble en Agua Marcado con FITC

Se realizaron experimentos de transfección con el quitosán insoluble en agua marcado con FITCS para demostrar la adherencia del quitosán sobre las células lo cual ayuda a la transfección de los genes. En este experimento se plaquearon 6×10^3 y se les agregaron los complejos quitosán-FITCS/pDNA/CombyMAG, 24 horas después se retiró el medio de cultivo y se le dio un lavado con PBS 1x, posteriormente se observaron al microscopio confocal de fluorescencia con un filtro para luz fluorescente de 518 nm. En la fig. no. 44 se puede ver que el quitosán se queda adherido en los lugares solo donde hay células por su naturaleza catiónica. En las figuras no. 45 y 46 se observa como quitando completamente la luz visible se observa mejor la fluorescencia que abarca casi toda la forma de la célula (fig. 38).

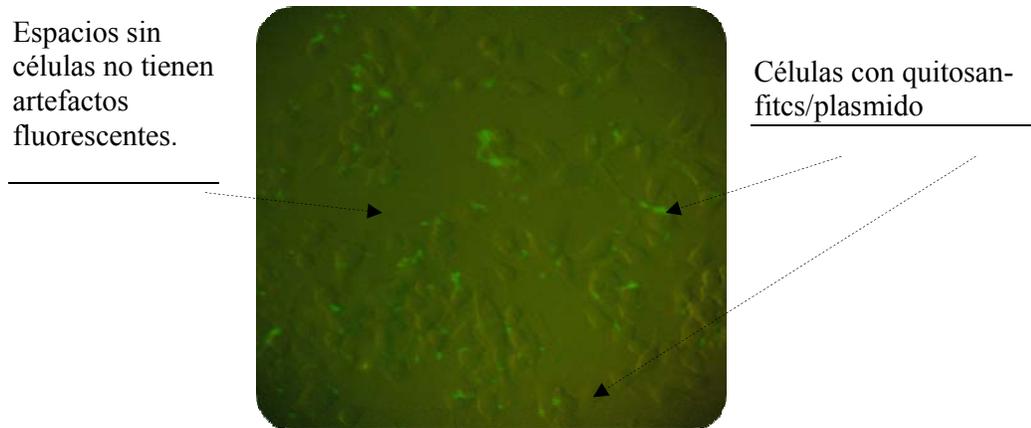


Fig. 44.- Imagen confocal 30X con filtro 480 nm de células transfectadas con complejos PQ-FITCS. Línea celular B16F10, vista 24 hrs después de transfección.

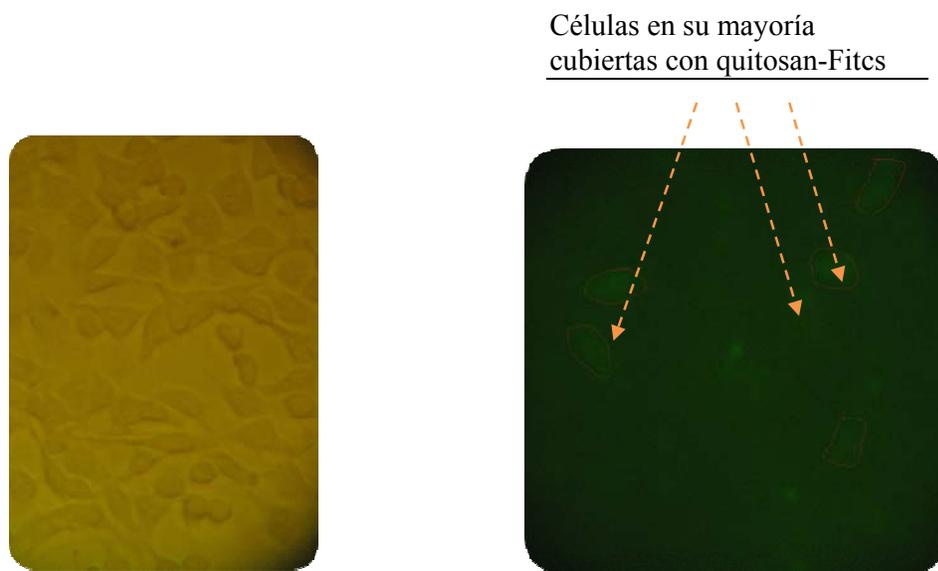


Fig. 45.-Imagen confocal 40X con luz visible de células transfectadas con complejos NPQ-FITCS. Línea celular B16F10, vista 24 hrs después de transfección.

Fig. 46.-Imagen confocal 40X de figura 43 con filtro 480 nm.

8.8.- Experimentos de Transfección de los Plásmidos pCEM y pNFkb-Luc en la Línea HeLa.

Se realizó experimento de transfección de los plásmidos pCEM y pNFkb-luc con el vector comercial Novamatrix O15 para observar el grado de transfección de ambos plásmidos, ayudados o no con una fuente externa de campos magnéticos. La transfección se llevó a cabo en una placa de 96 pozos y los campos magnéticos fueron de 250 mT/ 20 min. (placa descrita en métodos), observando en los resultados que hubo una mayor transfección en las células con el plásmido pCEM con una media aproximadamente 3.3×10^5 URL comparada con el del plásmido pNFkb-luc de aproximadamente 1.9×10^5 URL con una diferencia significativa de $p < 0.05$. Se observa también que el campo magnético influencia a que la transfección con plásmido pCEM sea mayor en la presencia de CM que sin ella ya que se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) de entre 3.3×10^5 y 5.7×10^4 de la transfección de pCEM con y sin campo magnético. (Tabla VIII y Fig. 47).

Tabla VIII. Resultados de transfección de pCEM & pNFkb-luc con y sin campo magnético (CM)

pCEM (+)	pCEM (-)	pNFkb-luc (-)	pNFkb-luc (+)
727,427	307,739	452,569	424,569
662,983	340,366	391,301	329,016
730,060	333,751	410,530	380,000
706,823	327,285	418,133	377,862

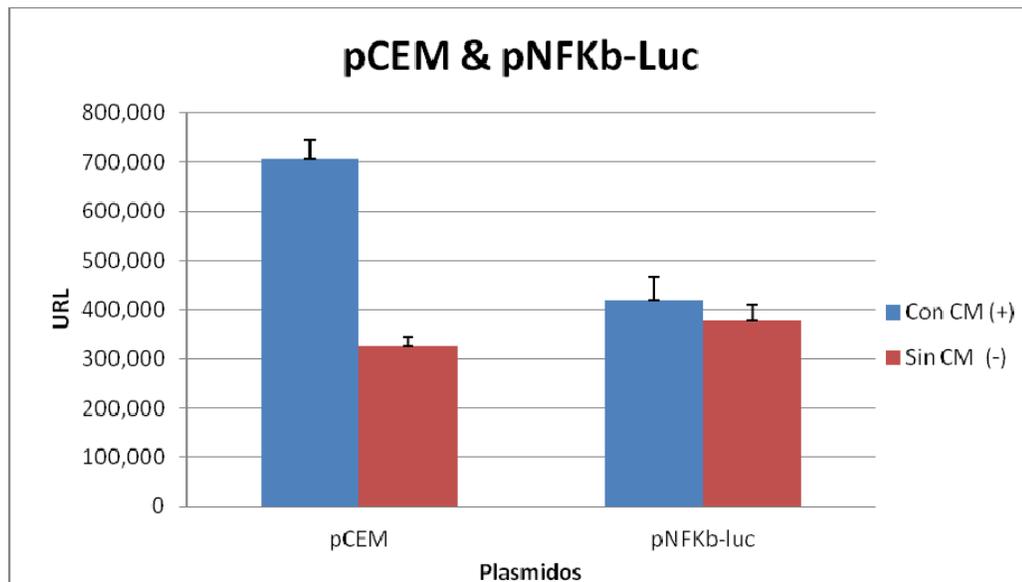


Fig. 47. Comparativa de transfección de pCEM y pNFkb-Luc con campo magnético. Transfección de los plásmidos pCEM y pNFkb-Luc con el vector Novamatrix O15 (campo magnético 15 min).

TRANFECCIONES CON QUITOSAN INSOLUBLE EN AGUA

8.9 -Experimentos de Transfección de la Línea B16f10 con Complejos Plásmido-Partículas Magnéticas y Quitosan Insoluble en Agua.

Se realizó experimento de transfección con diferentes ratios de quitosán insoluble en agua (descrito anteriormente) y plásmido pCEM para ver el mejor ratio de transfección entre quitosán y el plásmido. Este experimento se realizó en placa de 96 pozo (8×10^3 /células por pozo) con exposición a campos magnéticos con una placa magnética de Chemicell de 250 mT/20 min (fig. no 2). La lectura de luciferasa se realizó a las 24 horas. Los resultados de las transfecciones son muy bajas pero se observa un incremento en el ratio 2:1 y 8:1 comparado con el resto de los ratios (fig. 48).

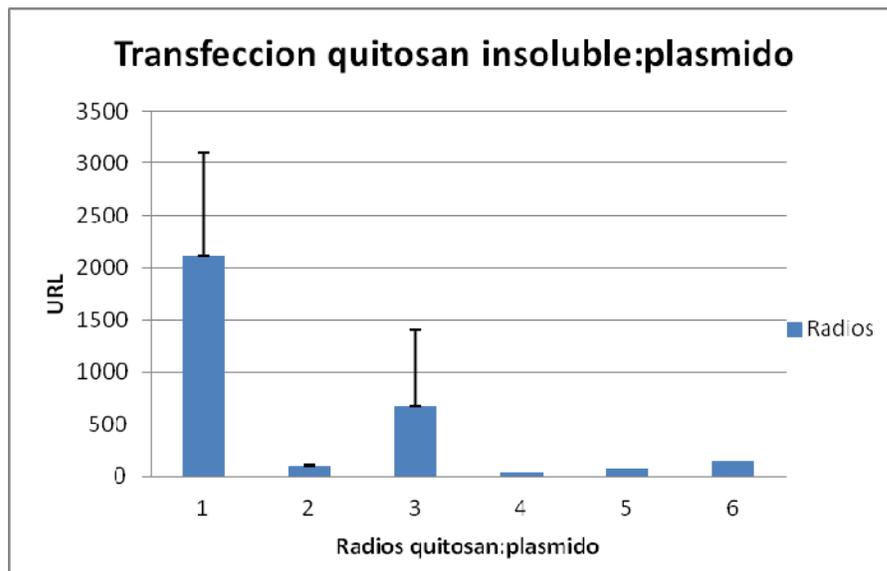


Fig. 48.- Estandarización de transfección con quitosán insoluble en agua. Ratios 2:1, 4:1,8:1,12:1,16:1,20:1

8.10.-Estandarización de Transfección con PolyMAG

Este experimento se realizó para encontrar el mejor radio de plásmido: nanopartículas PolyMAG. Se realizaron experimentos de transfección en la línea B16f10 Melanoma de ratón, con complejos plásmido pCEM y partículas magnéticas PolyMAG, en placa de 96 pozos (8×10^3 /células por pozos), lectura/24 horas. En las figuras no. 49-51 se observan los resultados de los tres radios probados (1:1.5, 1:2 y 1:2.5) y resumidos en la figura no. 52 los cuales muestran que el mejor radio plásmido:nano partículas PolyMAG para transfectar fue el de 1:1.5 (fig. 52) con la cantidad de $0.3 \mu\text{g}$ de plásmido por pozo con más de 8.0×10^5 URL comparados con otros radios probados con la misma cantidad de plásmido que fueron entre $1.2-2.8 \times 10^5$ URL en los radios de 1:2 y 1:2.5 respectivamente (fig. 52). Posteriormente ya obtenido el mejor radio para transfectar entre quitosán: plásmido y entre plásmido: PolyMAG, se realizaron mezclas de los tres componentes usando como base el radio 1: 1.5 de plásmido: PolyMAG con diferentes cantidades de quitosán. El mejor resultado se obtuvo con un radio de 2:1 entre plásmido: quitosán y el ya mencionado 1:1.5 de PolyMAG con un resultado de más de 1.5×10^6 URL (fig. 53).

Tabla IX. Resultados de transfección de pCEM con PolyMAG a diferentes radios.

Radio 1:1.5				
1.2 μg	0.6 μg	0.3 μg	0.15 μg	0.076 μg
151,005	581,189	733,642	631,630	232,454
113,727	471,620	901,004	726,949	193,398

Radio 1:2				
1.2 μg	0.6 μg	0.3 μg	0.15 μg	0.076 μg
6,772	12,513	111,133	157,905	84,106
19,083	13,271	248,827	132,050	76,383

Radio 1:2.5				
1.2 μg	0.6 μg	0.3 μg	0.15 μg	0.076 μg
3	12,291	98,414	85,241	69,116
182	5,307	131,204	127,483	86,668

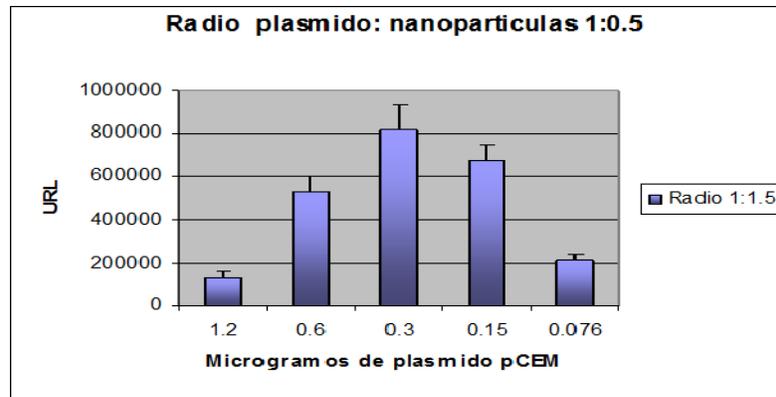


Fig. 49.-Transfección de complejos NP (*PolyMAG* -pDNA-), radio 1:1.5.
Células B16F10/lectura a las 24 hrs.

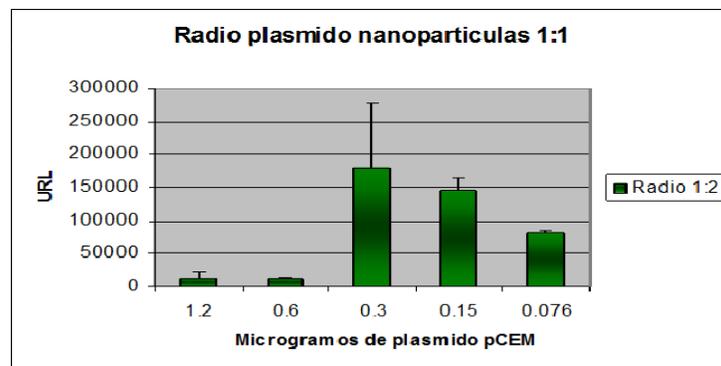


Fig. 50.- Transfección de complejos NP con (*PolyMAG* -pDNA-), radio 1:2.
Células B16F10/lectura a las 24 hrs.

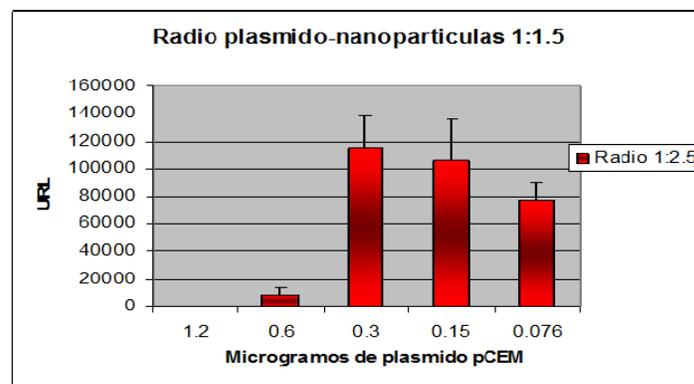


Fig. 51.- Transfección de complejos NP con (*PolyMAG* -pDNA-), radio 1:2.5.
Células B16F10/lectura a las 24 hrs.

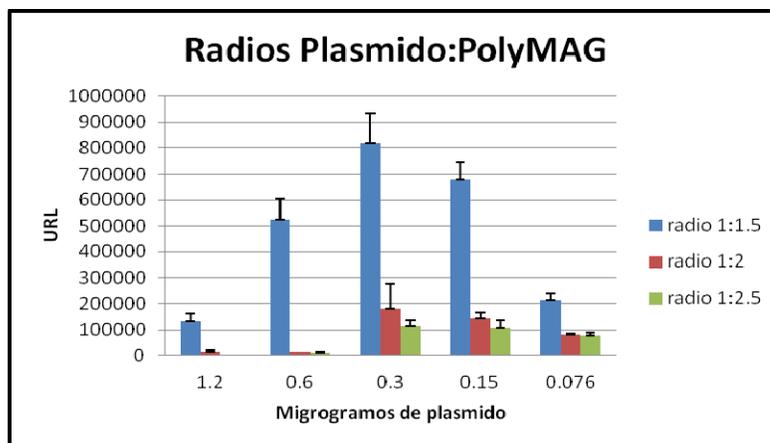


Fig. 52.-Comparativa de transfección de Complejos pDNA-PolyMAG. Radios 1:1.5, 1:2 y 1:2.5 (plásmido: nanopartículas magnéticas). Línea B16F10

Tabla X: Resultados de transfección de pCEM con PolyMag (1:1:5) a diferentes radios de quitosán (transfección B16F10/ 24 horas)

Radio de transfección quitosán: plásmido con PolyMAG 1:1:5					
2:1	4:1	8:1	12:1	16:1	20:1
1006554	-----	-----	-----	-----	-----
942179	-----	123043	-----	-----	-----
1695212	165650	131734	51531	54633	244895
1163579	157984	104966	165515	626634	270860

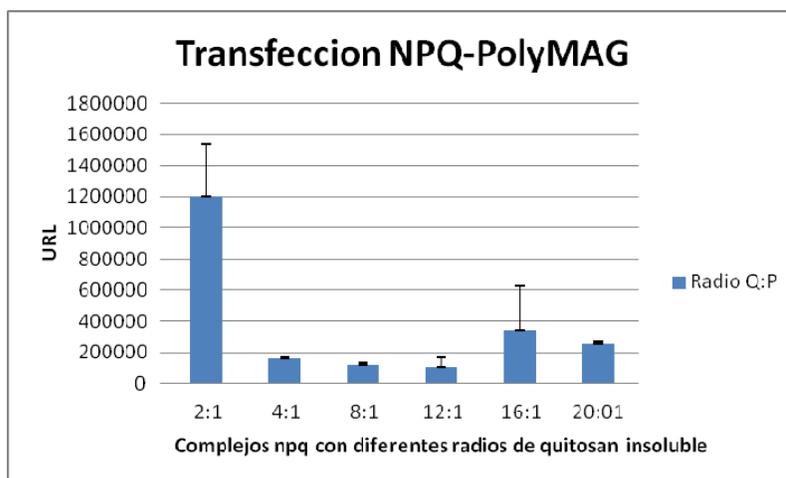


Fig. 53.- Transfección de complejos NPQ con quitosán insoluble en agua y PolyMAG. Estandarización de transfección con NPQ a diferentes radios de quitosán insoluble en agua en placa de 6 pozos. Se transfectó 1.5 μ g de plásmido con un radio de 1:1.5.

Se realizó también experimentos con y sin campos magnéticos usando los complejos con nanopartículas magnéticas (npq) con el mejor radio obtenido (1:1.5) versus complejos sin partículas magnéticas (pq) y plásmido desnudo. Los resultados aunque un poco bajos comparados con los anteriores muestran una tendencia clara de no funcionar si no tienen campos magnéticos. (Fig. 54), ya que la transfección se observa más elevada en todas las pruebas donde se aplicó el campo magnético ($p < 0.05$).

Tabla XI: Resultados en URL de transfección de pCEM con PolyMAG (1:1:5). Radio de 1:1.5 con y sin campo magnético (transfección B16F10/ 24 horas).

	URL CON CAMPO MAGNÉTICO	URL SIN CAMPO MAGNÉTICO
NPQ 2:1	90,535	9,309
	73,943	3,804
	80,132	3,401
PQ 2:1	2,815	390
	1,416	229
	1,272	350
PLÁSMIDO SOLO	643	72
	493	42
	620	55

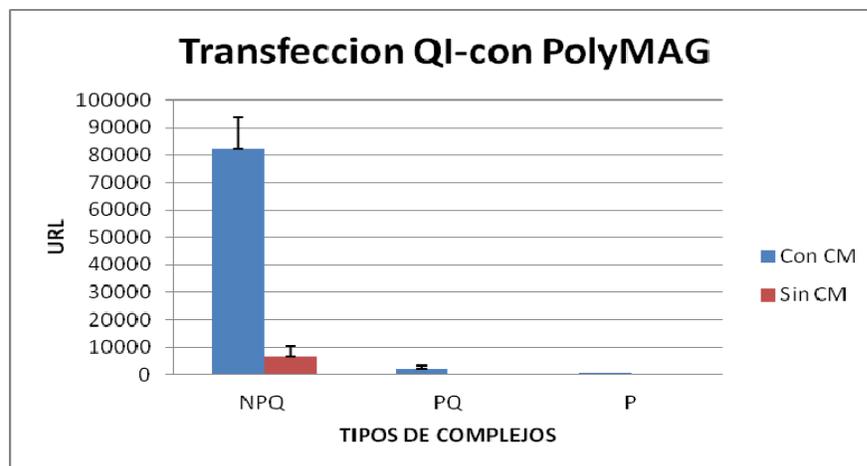


Fig. 54.- Comparación de transfección de complejos NPQ PQ y P. Transfección de células Hela de complejos & pDNA desnudo a un radio de quitosán de 2:1. Para el complejo NPQ se usó un radio de partículas magnéticas de 1:1.5.

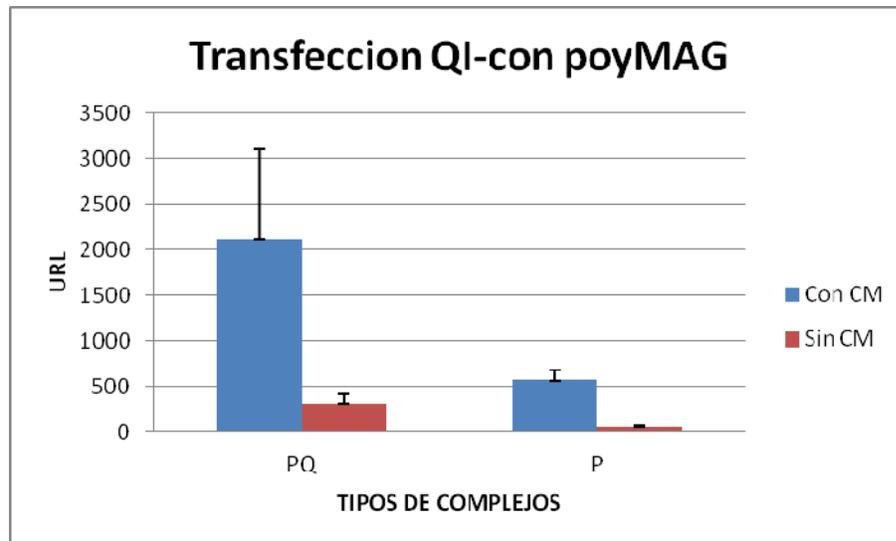


Fig. 55.- Comparación de transfección de complejos NPQ y PQ .Transfección de células Hela con complejos & pDNA desnudo a un radio de quitosán de 2:1. Para el complejo NPQ se usó un radio de partículas magnéticas de 1:1.5.

TRANSECCIONES CON QUITOSAN SOLUBLE EN AGUA

8.11.- Experimentos de Transfección de la Línea HeLa con Complejos Plásmido-Quitosan Soluble en Agua.

Se realizó estandarización de transfección para ver mejor cual era el mejor tiempo para la toma de lectura de luciferasa (24, 48 o 72 hrs). Se estandarizó la lectura de la transfección con la línea celular HeLa, los radios de transfección probados 10:1, 20:1 y 30:1, los experimentos fueron leídos a las 24, 48 y 72 hrs con una sola repetición. Los resultados mostraron que el mejor de tiempo para la toma de la lectura fue de 72 horas en todos los radios probados (fig. 56). Posteriormente se realizaron transfecciones con tres quitosanes solubles en agua (O15 y O25 de Novamatrix y el quitosán Coyote de Coyote Foods).

De todos los quitosanes probados solubles en agua se realizó un análisis estadístico entre los diferentes radios usados (Prueba de Tukey) de cada quitosán para observar si había diferencia significativa en cuanto a los diferentes radios probados, el resultado fue que el quitosán soluble en agua O15 de Novamatrix obtuvo su mejor radio para transfectar en el radio 60:1, obteniéndose los resultados más altos a este radio y mostrando el análisis estadístico una diferencia significativa con respecto a los otros dos radios probados que fueron de 10:1 y 30:1 con una diferencia significativa de $p < 0.05$ (Fig. 57). Por otro lado el quitosán de Novamatrix O25, obtuvo su mejor radio para transfectar a un radio de 10:1, mostrando en análisis que este radio era significativamente diferente a los grupos 20:1 y 30:1 los cuales estadísticamente son iguales entre ellos con una $p < 0.05$ (Fig. 58). Finalmente el quitosán local Coyote Foods obtuvo su mejor radio de transfección a un radio de 40:1 el cual se observa también diferente al radio de 30:1 pero igual que el radio 60:1, por lo que se puede decir que estadísticamente los radios de 40:1 y 60:1 en el quitosán coyote funcionan igual y el único que se observa considerablemente más bajo es el radio de 30:1 (con una $p < 0.05$ (Fig. 60).

De los tres quitosanes el quitosán O15 mostró mucha reproducibilidad por lo cual se eligió para probar transfecciones con ambas partículas magnéticas (PolyMAG y CombyMAG). Los resultados posteriores mostraron que al transfectar O15 con PolyMAG se tiene una baja en la transfección, es decir el agregar partículas magnéticas PolyMAG al complejo O15:plásmido, hace que haya una baja en la transfección en todos los radios probados con una $p < 0.05$ (fig. 63) ya que se transfecta mejor O15:plásmido sin PolyMAG, esto concuerda con lo indicado por el proveedor el cual menciona que estas partículas al tener ya un polímero adherido, no necesitan de otro polímero para transfectar, por lo que también se transfecta mejor utilizando PolyMag:plásmido, es decir la mezcla de los tres componentes O15, Plásmido y PolyMAG no fue buena (fue mejor para cada vector por separado con el plásmido). Por otro lado los complejos NPQ hechos con CombyMAG mostraron ser mejor que los complejos elaborados con PolyMAG, mostrando una mejora en la transfección, es decir el agregar partículas CombyMAG a los complejos O15:plásmido ayudo a que la cantidad de quitosán utilizada sea menor que cuando no se utilizan partículas magnéticas para obtener niveles similares de transfección (fig. 64).

En general se observa una tendencia de ser mejor para este modelo de transfección el uso de partículas magnéticas CombyMAG ya que ayuda a reducir la cantidad de quitosán utilizada. ($p < 0.05$).

Tabla XII: Resultados en URL de transfección de pCEM con O15 con lecturas a 24, 48 y 72 hrs

		Tiempo		
		24 hrs	48 hrs	72 hrs
radios	10:1	3,607	18,694	23,822
	20:1	724	6,642	14,402
	30:1	579	525	4,365

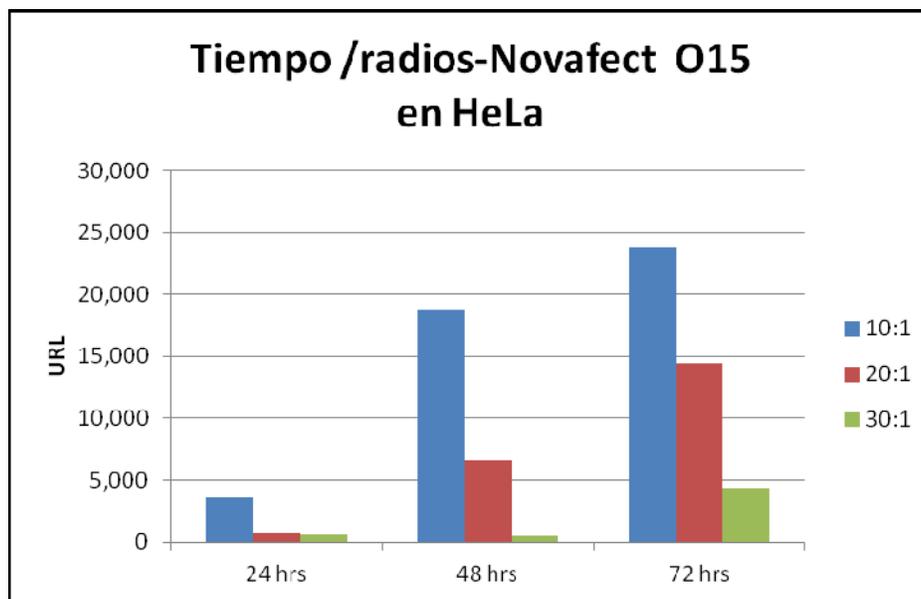


Fig. 56.- Estandarización de tiempo de toma de lectura luciferasa. Transfección en línea celular HeLa. Radios de transfección probados 10:1, 20:1 y 30:1 experimentos leídos a las 24, 48 y 72 hrs. Quitosán Novafect O15.

Tabla XIII: Resultados en URL de transfección de pCEM O15 a diferentes radios.

10:1	30:1	60:1
15,245	341,976	715,046
17,586	340,366	662,983
16,982	307,739	519,442
--	321,583	594,740
--	408,365	971,722
--	--	730,060
--	--	727,427
--	--	581,766

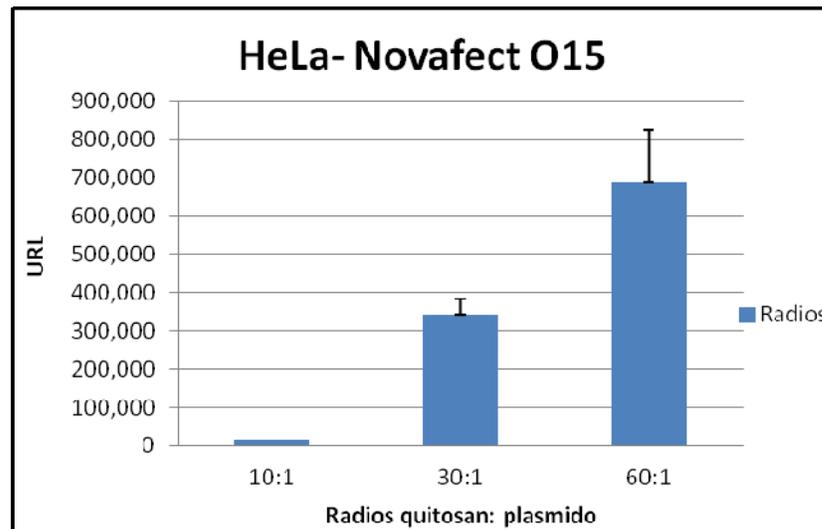


Fig. 57.- Transfección con quitosán soluble en agua O15/pCEM. Ratios de transfección probados 10:1, 30:1 y 60:1. Lectura a las 72 hrs.

Tabla XIV: Resultados en URL de transfección de pCEM O25 a diferentes radios

10:1 (O25)	20:1 (O25)	30:1 (O25)
59,275	8,393	1,195
46,387	4,573	3,120
53,769	----	1272
61,207	----	1825
50,620	----	----

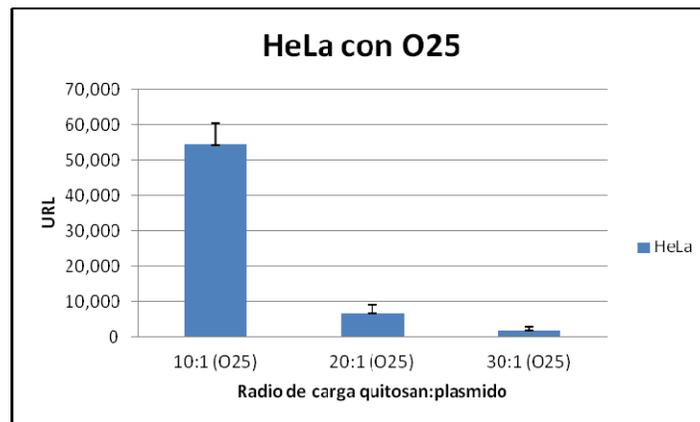


Fig. 58.- Transfección con quitosán soluble en agua O25/pCEM. Radios de transfección probados 10:1, 20:1 y 30:1. Lectura a las 72 hrs.

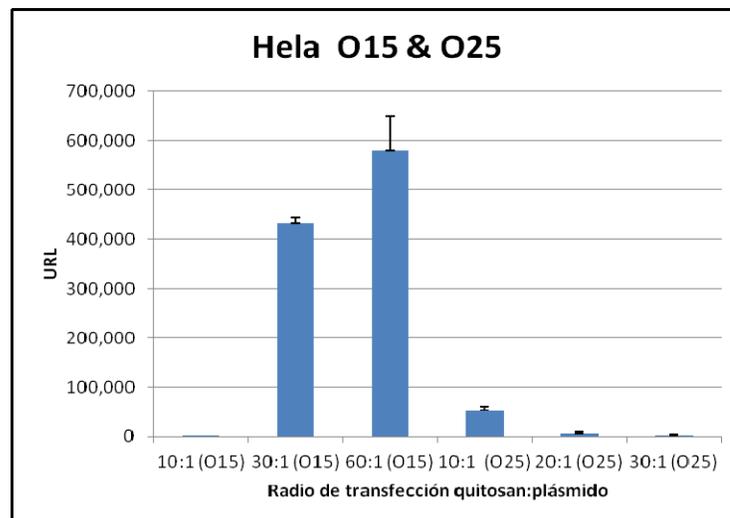


Fig.59.- Comparación de transfecciones O15 & O25 (PQ). Lectura 72 hrs. Línea celular HeLa.

Tabla XV: Resultados en URL de transfección de pCEM con quitosán Coyote a diferente radio

30:1	40:1	60:1
207,331	609,577	424,494
293,381	639,993	485,732
301756	482,615	458123
---	645,876	---
---	485,953	---

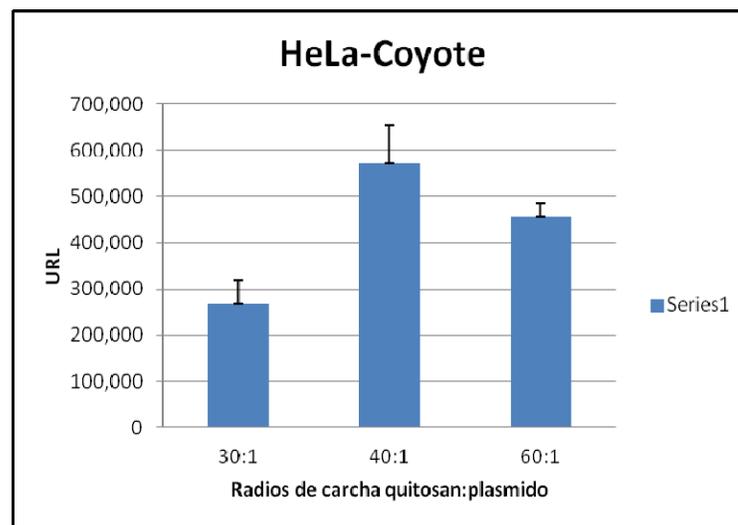


Fig.60.- Transfección de línea Hela con quitosán Coyote, Foods. Lectura a las 72 horas. Línea celular Hela.

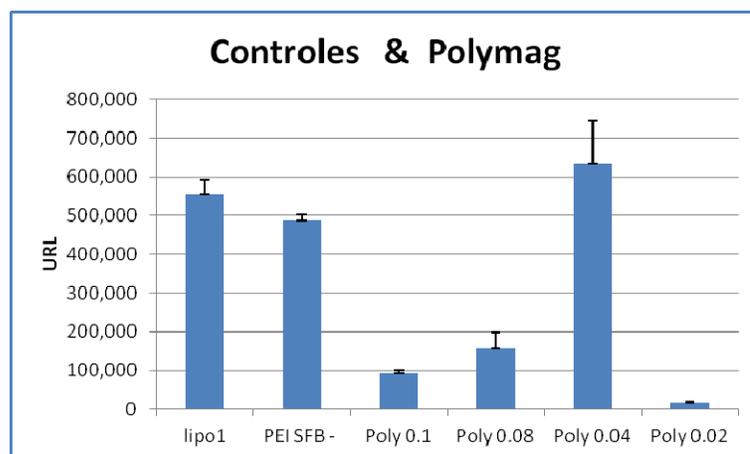


Fig.61.-Estandarización de transfección de pCEM-PolyMAG. Línea HeLa. Controles Lipofectamine (1 μ l/ 0.33 μ g plásmido) y PEI 25 kda radio 5:1

Tabla XVI: Resultados en URL de transfección de pCEM con diferentes acarreadores comerciales y de prueba.

	promedio	SD
Naked	7,025	3,753
O15 60:1	687,898	138,138
O25 10:1	52,831	9,113
Coyote 40:1	572,803	81,981
Lipofectamine	552,829	40,949
PEI	485,806	15,772
Poly MAG	634,353	111,702

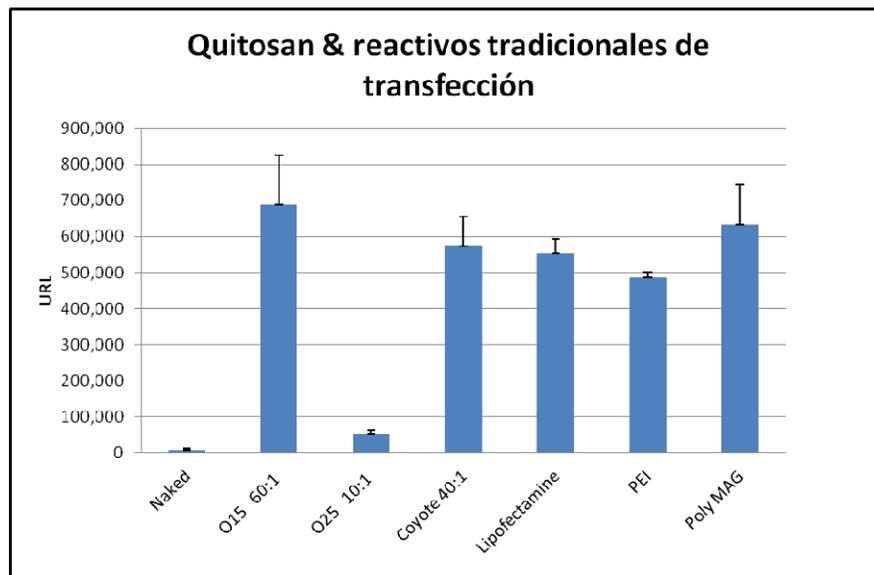


Fig. 62. Comparación de transfecciones de quitosanes de prueba & comerciales. Quitosanes O15, O25, coyote y reactivos tradicionales para transfección como lo son Lipofectamine (lipo1), PEI 25 kDa y PolyMag (poly).

Tabla XVII: Resultados en URL de transfección de pCEM con partículas magnéticas PolyMAG a diferentes radios de quitosán O15.

Radio quitosán: plásmido	URL	URL	media
5:1	569	870	720
10:1	7,178	10,201	8,690
30:1	1,453	1,230	1,342
60:1	1,894	2,100	1,997
60:1 sin Comby	531,166	628,530	579,848

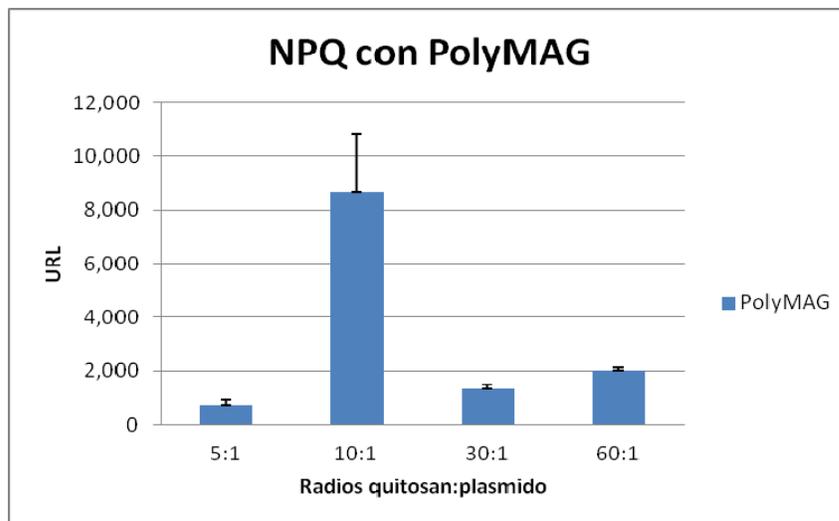


Fig.63 Transfección de complejos NQP con O15/PolyMAG en HeLa.

Tabla XVIII: Resultados en URL de transfección de pCEM con partículas magnéticas CombyMAG a diferentes radios de quitosán O15.

Radio quitosán:plásmido	URL	URL	media
5:1	7,223	4,088	5,656
10:1	169,127	154,033	161,580
30:1	448,521	679,122	563,822
60:1	148,193	84,945	116,569
60:1 sin Comby	531,166	628,530	579,848

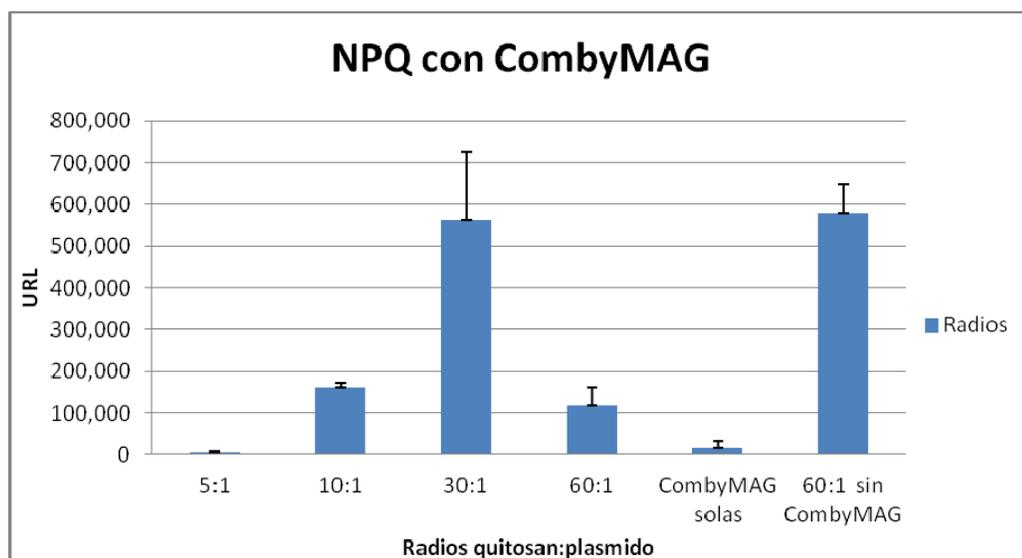


Fig.64.-Estandarización de transfección de complejos NQP con quitosán O15 y partículas magnéticas CombyMAG en HeLa.

En experimentos posteriores se determinó la mejor cantidad de partículas magnéticas para cada uno de los quitosanes que se disolvieron en agua (O15, O25 y Coyote) partiendo del mejor radio que se obtuvo para cada uno de los quitosanes, encontrando que cada uno tiene una cantidad específica de partículas magnéticas con la cual se observa una mejor transfección: O15 con 0.1 μl , O25 con 0.2 μl y coyote con 0.4 μl . (figs. 65,67 y 68). Pero se observó que las diferencias no fueron significativas comparadas con el control sin partículas magnéticas para ninguna de los tipos de quitosán probados (O15, O25 y Coyote) con diferentes cantidades de partículas magnéticas. Este dato nos indica como en el caso del O15, que la transfección se ve mejorada adicionando partículas magnéticas ComyMAG a un radio menor de quitosán es decir en lo que nos ayudan las CombyMAG es a la disminución de la cantidad de quitosán utilizada y no agregando las partículas al mejor radio de quitosán que se haya obtenido como fue el caso de los experimentos anteriores donde no se observó diferencia significativa agregando más partículas magnéticas al mejor radio obtenido (fig.66).

Tabla XIX.- Resultados en URL de transfección de pCEM con diferentes dosis de partículas magnéticas CombyMAG y quitosán O15 a un radio de 60:1

Comby-O15	URL
O15 solo 60:1	727,427
O15 60:1/0.1 μ l Comby	950,643
O15 60:1/ 0.2 μ l Comby	584,938
O15 60:1/ 0.3 μ l Comby	451,499
O15 60:1/ 0.5 μ l Comby	456,821

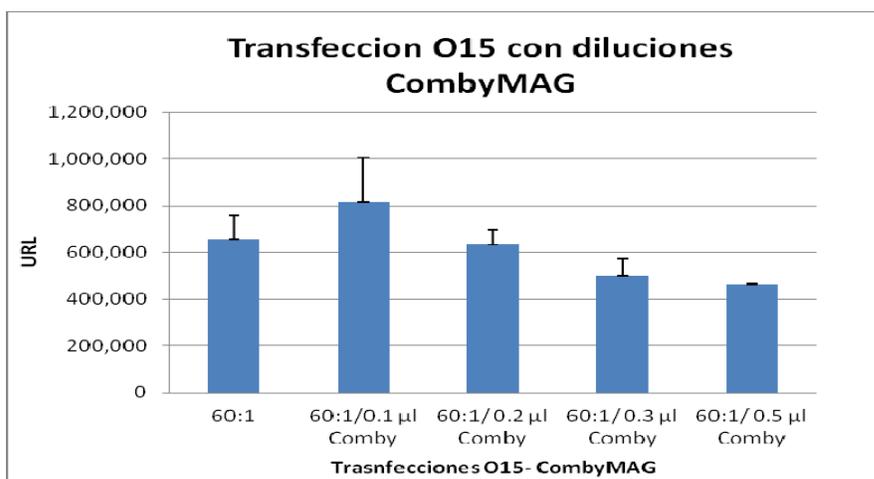


Fig.65.- Transfección de NPQ (O15 60:1) con diferentes cantidades de CombyMAG.

Tabla XX.- Comparativa de resultados de transfección de complejos NPQ y PQ con O15.

	Complejos npq	Complejos pq
10:1	161,580	2,869
30:1	563,822	432,145
60:1	116,569	579,848

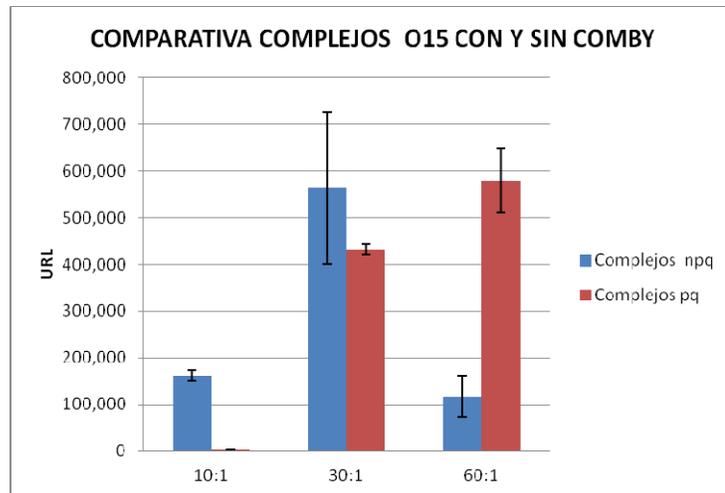


Fig.66.-Transfección comparativa de complejos O15 con y sin CombyMAGb1

Tabla XXI.-Resultados en URL de transfección de pCEM con diferentes dosis de partículas magnéticas CombyMAG y quitosán O25 a un radio de 10:1

Comby O25	URL
O25 10:1	79,558
O25 10:1/0.2 μ l	162,228
O25 10:1/0.3 μ l	69,392
O25 10:1/0.4 μ l	46498

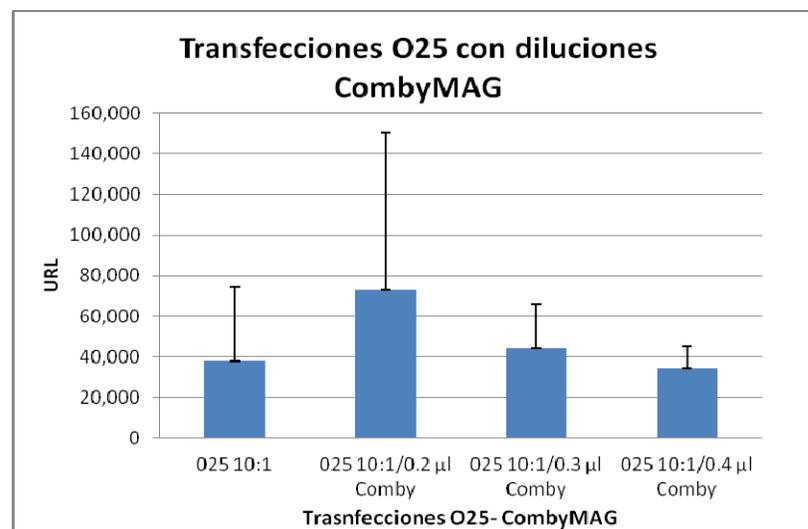


Fig.-67 Transfección de NPQ (O25 10:1) con diferentes cantidades de CombyMAG.

Tabla XXII: Resultados en URL de transfección de pCEM con diferentes dosis de partículas magnéticas CombyMAG y quitosán COYOTE a un radio de 40:1

Comby-O15	URL
Coyote solo	293,381
Coyote 40:1/ 0.1µl comby	176,519
Coyote 40:1/ 0.2µl comby	223,104
Coyote 40:1/ 0.3µl comby	400,088
Coyote 40:1/ 0.4µl comby	509,525
Coyote 40:1/ 0.5µl comby	248,019

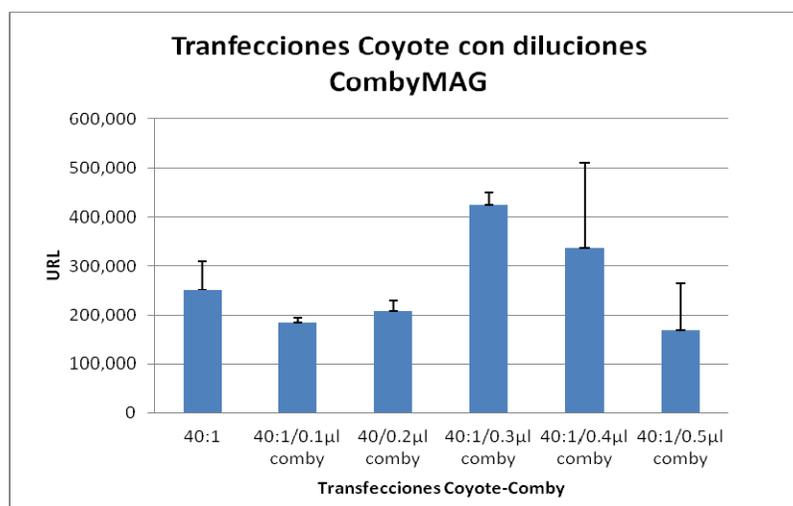


Fig.-68- Tranfección de NPQ (Coyote Foods 40:1) con diferentes cantidades de CombyMAG.

Se realizaron pruebas también para determinar si el orden de los reactivos podría influir en el grado de transfección. Estos experimentos fueron realizados con el reactivo O15 y los resultados mostraron que el grado de transfección se ve afectado cuando el orden de los complejos es pDNA-Comby/Nova, (fig.70) disminuyendo considerablemente la transfección en ese orden, esto comparado con los complejos que se realizaban en el orden Nova-pDNA/Comby o Nova-Comby/pDNA, es decir mezclando primero reactivos con cargas opuesta y luego agregando el reactivo faltante. Sin embargo el análisis estadístico de Tukey nos muestra que el grupo Nova-Comby/pDNA es el único que tiene la diferencia significativa con el grupo pDNA-Comby/Nova, observándose también que no existe una diferencia significativa entre este último grupo y el grupo Nova-pDNA/Comby ni de este grupo con el Nova-Comby/ pDNA, por lo que la diferencia significativa en el orden de los reactivos está en la línea de ser o no importante. Finalmente se adiciona una fotografía (fig. 69) de cómo lucen los complejos al momento de ser transfectados en la línea celular HeLa.

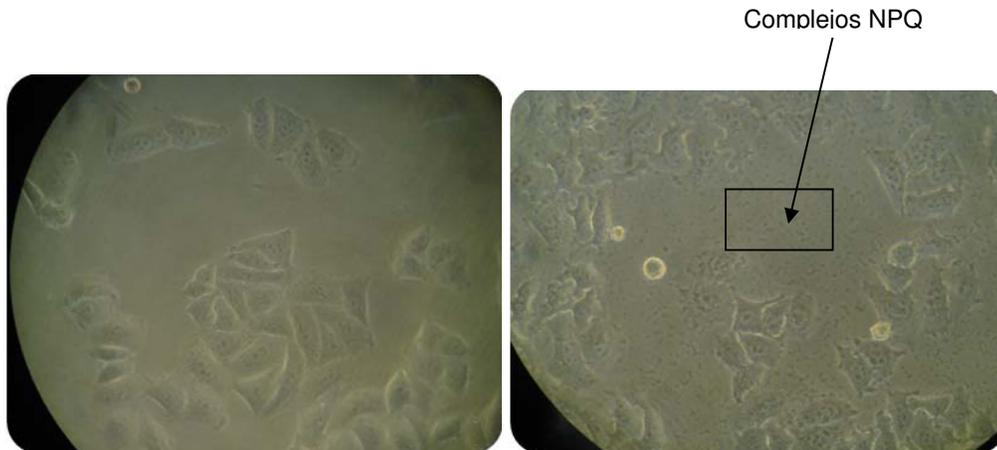


Fig. 69.-Transfección de células HeLa con complejos NPQ quitosán COYOTE. Células antes de transfección (izq) y después de aplicar complejos NPQ con quitosán Coyote (der)

Tabla XXIII Resultados en URL de transfección de pCEM acompañado con quitosán (60:1) y CombyMAG (0.1 μ l)

Orden de reactivos	URL
Nova-pDNA/Comby	728,207
Nova-comby/ pDNA	687,114
pDNA-Comby/NOVA	438,936

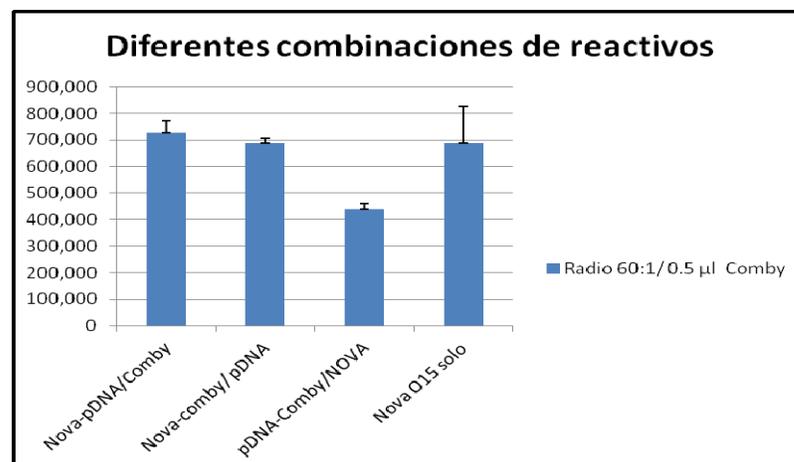


Fig.70.- Comparativa de transfección con reactivos en diferente orden. Experimento realizado con Novamatrix O15, plásmido pCEM y partículas magnéticas CombyMag.

9. DISCUSIÓN

La vida en la tierra se ha creado alrededor de campos magnéticos naturales y es normal que la mayoría de los seres vivos tengan algún tipo de sensibilidad contra este tipo de energía. En el ser humano como en muchos otros animales se ha encontrado esta sensibilidad directamente relacionada con la secuencia física de ciertos genes y/o proteínas los cuales se sabe que tienen algún tipo de respuesta o cambio frente a una determinada frecuencia y/o intensidad de un campo magnético. El plásmido aquí presentado como pCEM fue construido con un promotor de la proteína de choque térmico HSP70 la cual se ha demostrado que es sensible a campos electromagnéticos y el cual fue usado (en este proyecto) para controlar la expresión de genes mediante la influencia de un campo magnético producido de una placa hecha de Neodimio (fuente de magnetismo), demostrando que con la ayuda de nanopartículas magnéticas y el polímero quitosán unidos entre sí como un complejo nanotecnológico adheridos a este plásmido se puede aumentar y controlar la expresión del gen significativamente.

Se realizaron pruebas para determinar la sensibilidad de pCEM a magnetismo, así como también pruebas con diferentes quitosanos y con diferentes partículas magnéticas para dilucidar cuales eran mejor para realizar los complejos nanopartícula magnética-plásmido-quitosán (npq) ya que por la naturaleza de cada uno de estos componentes, la mezcla de estos potenciaría el resultado de la transfección. Dentro de los quitosanos usados se encontraban: un quitosán insoluble en agua de 340 kda de la marca SIGMA y tres quitosanos solubles en agua de bajo peso molecular: dos Novafect (O15 y O25) de la compañía Novamatrix y uno de la marca Coyote Foods al cual se le denominó en este proyecto como quitosán “Coyote”. Las partículas magnéticas usadas fueron PolyMAG y CombyMAG de la compañía Chemicell ambas con distintas formas de uso.

De los resultados obtenidos inicialmente se puede confirmar los resultados obtenidos por Rodríguez de la fuente, *et al* (2005) al transfectar la línea celular HeLa donde se observó una diferencia estadísticamente significativa de $p \leq 0.05$ cuando se agrega el plásmido pCEM y se aplica un campo magnético que si se agrega otro plásmido con un campo magnético (llámese otro plásmido pNFkb-Luc), donde pCEM al poseer un promotor con elementos de respuesta a campos magnéticos (fig.10) estimula una mayor transfección que sin el campo magnético y en pNFkb-Luc no hay diferencia significativa en aplicar o no un campo magnético (fig. 47). Por otro lado por los resultados obtenidos se puede observar que es muy importante que el pDNA pueda formar complejos con el quitosán pero de una manera en que el pDNA pueda ser liberado rápidamente una vez entrando al interior de la célula de lo contrario la transfección no sería lo suficientemente alta (por quedarse el pDNA “atrapado” en el quitosán), como es el caso del quitosán insoluble en agua, el cual forma complejos tan estables con el pDNA que después le es difícil liberarlo, esto se observa bien en los experimentos de retardo que se realizaron ya que desde radios de

2:1 se tiene una gran estabilidad de los complejos quitosán:plásmido (fig. 14) y esto hace que sean menos efectivos al momento de transfectar ya que el quitosán no libera al pDNA estando dentro de la célula y esto provoca que el gen no se transcriba y consecuentemente que la transfección sea más baja y deficiente en la mayoría de los radios probados con este quitosán (fig. 48), esto a pesar de haber mostrado buenas características de potencial Z de alrededor de 10-12 mV (fig. 31). Así mismo los tamaños observados de estos complejos fueron considerablemente mayores (fig.33) a los que regularmente forman los vectores comerciales que se usan para transfectar que andan alrededor de 100-150 nm como es el caso del PEI: pDNA o del Lipofectamine: pDNA.

Por otro lado las características del quitosán que nos ayudaron a que la transfección se haya logrado con valores similares a los obtenidos con vectores comerciales como PEI y Lipofectamine fueron con algunos de los quitosanes solubles en agua de bajo peso molecular. En estos resultados se observa que para transfectar con este tipo de polímero se necesitan diversas variables a considerar. Una de estas variables (para el caso de polímero comercial Novafect) fue el largo de los oligómeros usados, donde se observa que el quitosán O15 fue mejor que el quitosán O25 y que el quitosán G214 de la misma marca (datos no mostrados) por que el O15 está formado por oligómeros más cortos (O15 = 15-24 mer y O25 = 25-40 mer) y donde se puede ver claramente el grado de transfección sobresaliente del quitosán con oligómeros más cortos (fig. 57-59), esto considerando que ambos quitosanes fueron estables a los mismos radios probados (fig.17-23) y que ambos tenían el mismo grado de deacetilación (97%). Observamos también que los complejos quitosán: plásmido muestran tamaños mucho más pequeños que sus similares con quitosán insoluble en agua (tablas VI y VII) y en los cuales se observa que los mejores radios de transfección tanto para O15, O25 fueron los que tuvieron tamaños más pequeños, como es el caso del radio 60:1 de O15 y el caso de 10:1 de O25 (tabla VII, fig. 57 y 58). Al considerar las características anteriores se probó también un quitosán elaborado en México el cual no es comercial para su uso como reactivo de transfección y al cual se le determinaron sus cualidades como agente transfectante en la línea HeLa. Este quitosán de la compañía Coyote Foods y al cual no se le dio ni un tratamiento químico al usarse, resulto con cualidades muy parecidas al quitosán Novafect O15 (el cual es considerablemente más caro) ya que mostró valores de transfección tan altos como este y también como de otros vectores comerciales de transfección (fig. 62) mostrando también tener al igual que los otros quitosanes solubles en agua, la característica de que el mejor radio de transfección mostrara el tamaño más pequeño (tabla VII). Por otro lado las cualidades en las que difieren con su homólogo de Novafect son por el peso molecular, ya que el quitosán Coyote tiene un peso molecular de 20 kDa aproximadamente y con el de Novafect O15 es de 2-5 KDa, siendo este último considerablemente menor. Por otro lado el quitosán coyote mostró una ligera alza en el potencial Z (24.4 mV) comparándolo con el quitosán O15 (19.4 mV) ambos con niveles de transfección similares, pero observado que aunque el quitosán O25 tenga un potencial Z muy similar al del Coyote sus resultados de transfección fueron significativamente bajos comparados con los de este último. Por lo que se recalca que no solo el potencial Z alto es importante al momento de transfectar si no también otras características como el tamaño de los complejos que forman, el radio que se utiliza y el largo de las cadenas poliméricas, que generalmente siendo más pequeños resultan ser mejores agentes transfectantes.

Seguidamente la adición de partículas magnéticas a los complejos quitosán: plásmido (quitosanes tanto solubles como insolubles) mostraron resultados variados. Las partículas magnéticas de PolyMAG no fueron tan eficientes como las CombyMAG ya que las PolyMAG a como lo indica el proveedor se deben de usar solas con el plásmido (sin revolvearse con otro polímero) ya que estas partículas ya cuentan con un polímero adherido a su superficie (PEI) y el cual les confiere una carga positiva (tabla V), observándose en las pruebas que con estas partículas se tienen malas transfecciones agregándoles el polímero quitosán comparadas con los controles (sin quitosán y con PolyMAG) como veremos más adelante. Por otro lado las partículas magnéticas CombyMAG las cuales son para combinarse con polímeros al momento de transfectar mostraron resultados mucho mejores (fig. 64).

Dentro de los resultados observados usando las partículas magnéticas PolyMAG se observó un excelente grado de transfección al probar diferentes cantidades de plásmido con diferentes cantidades de partículas magnéticas en la línea B16F10 (figuras 49-51), observando resultados muy repetibles y altos, pero al usarse en conjunto con el quitosán insoluble en agua se observan resultados bajos y variados, algunas veces con transfecciones altas y otras con transfecciones bajas y esto se piensa que puede se pudo haber dado por que el tipo de partícula magnética no fue la indicada ya que está hecha para transfectar sin la ayuda de otro polímero, así al agregarle el polímero de quitosán la transfección descendió considerablemente. El radio de quitosán insoluble que se observó con mayor transfección con PolyMAG-pDNA fue el de 2:1 en el cual mostró una tendencia a tener la mejor transfección posiblemente por traer menos quitosán, pero estos resultados se observaban muy variados y no repetibles (fig.53-55). Dentro de los resultados de tamaño de este tipo de complejos con quitosán insoluble en agua y PolyMAG se observó que al combinarse forman complejos de tamaños bastante grandes en comparación con la mayoría de los agentes usados para transfección (tabla VI y VII). Finalmente se observa una morfología de tipo centro-cresta la cual es comúnmente formada con este tipo de polímeros, más aun cuando pueden tomar un centro solido al cual rodear (fig. 35 y 37).

Por otro lado tenemos que las transfecciones hechas con los complejos con quitosán soluble en agua y el plásmido pCEM mostraron resultados de transfecciones altas y con mucha reproducibilidad (fig. 57-60). Los resultados del potencial Z de estos complejos muestran cargas mayores que los elaborados con quitosán insoluble en agua (fig.31 y 32) lo que seguramente influencio a que las transfecciones fueran mucho mayores con el soluble en agua. En lo que se refiere al tamaño se observan dos cosas destacables: la primera es que estos complejos muestran tamaños menores que los elaborados con quitosán insoluble en agua (tabla VI y VII) y la segunda es que se observa una tendencia (para cada quitosán por separado) de tener mejores transfecciones en los radios que mostraron tamaños menores no importando si el radio quitosán:plásmido era alto o bajo, es decir para O15 el mejor radio de transfección mejor fue el de 60:1 porque fue el radio que mostró un tamaño menor comparado con el otro radio medido de 30:1 el cual tuvo un tamaño mayor (tabla VII y Fig.57), para O25 el mejor radio para transfectar fue el de 10:1 y para Coyote Foods fue de 40:1, se observa también que por tener un radio alto no significa que los tamaños serán mayores, lo cual aplica para el caso de Novafect O15 y el quitosán Coyote Foods los cuales en radios mayores como 60:1 y 40:1 respectivamente

mostrando tamaños menores en los complejos y las cuales transfectaron mejor.

Para los experimentos agregando las partículas magnéticas a estos complejos con quitosán-soluble-en-agua:plásmido se decidió obtener los tamaños y los potenciales Z solo de los complejos elaborados con las partículas CombyMAG ya que en resultados de transfecciones preliminares se observó que las partículas con CombyMAG eran superiormente sobresalientes en transfección que los complejos preparados con PolyMAG por lo que las pruebas de potencial y tamaño con PolyMAG se omitieron, optando así por no realizar más experimentos de transfección con PolyMAG. Dentro de estos resultados se observa que el quitosán Coyote conserva su carga positiva un tanto baja pero positiva al fin, cuando le son agregadas las partículas CombyMAG, característica muy deseada para lograr un mayor contacto eléctrico con la membrana celular, caso contrario con los otros quitosanes Novafect, los cuales aún que obtuvieron cargas negativas finales al agregarles las partículas magnéticas CombyMAG (tabla V), mostraron transfecciones considerablemente altas en particular el quitosán O15 (fig. 57 y 62). Por otro lado en cuanto al tamaño de los complejos con las partículas magnéticas se observa una ligera alza en el tamaño de los complejos quitosán: plásmido cuando les son agregadas las partículas magnéticas CombyMAG pero ninguno de los complejos rebasa de los 300 nm (tabla VII), los cuales son considerablemente menores a los elaborados con quitosán insoluble en agua los cuales andan entre los 433-781 nm (tabla VI).

Dentro de los resultados obtenidos al transfectar el quitosán O15 con CombyMAG se observa un dato interesante, el cual consiste en que cuando agregamos las partículas magnéticas al complejo de quitosán-plásmido (pq), el radio mejor para transfectar se convierte ahora en el radio de 30:1, es decir sin partículas magnéticas el mejor radio de quitosán mejor fue de 60:1, pero el agregar partículas magnéticas al complejo hace que el mejor radio de quitosán cambie a uno menor (cambie de 60:1 a 30:1) (fig. 64), lo que indica que cuando transfectamos si agregamos partículas magnéticas CombyMAG voy a gastar menos quitosán y a obtener resultados similares ($p \leq 0.05$) a las mejores transfecciones de quitosán solo con el plásmido, esto puede indicar que no solo las interacciones electrostática del quitosán están en función si no también la fuerza física de la partícula magnética que es empujada a entrar dentro de la célula.

Los complejos hechos a base de CombyMAG y los diferentes quitosanes solubles en agua fueron la combinación de parámetros que mejores resultado obtuvo. Se probaron cantidades distintas de partículas magnéticas para observar si estas influenciaban el grado de transfección, pero se observó que no existen diferencias estadísticas entre las diferentes cantidades de nanopartículas magnéticas usadas en este proyecto ($p \leq 0.05$) las cuales fueron variadas en concentraciones ligeramente diferentes (fig. 65, 67 y 68), con cada uno los quitosanes solubles en agua. Finalmente se tiene que la combinación de los diferentes reactivos en un orden determinado juega un papel crucial en el resultado final, observándose una baja en el desempeño de transfección cuando los complejos son preparados mezclando primero dos componentes con cargas iguales, es decir plásmido: CombyMAG y al final el quitosán (fig. 70), siendo significativamente diferente mejor cuando se mezclan primero el quitosán soluble con las partículas magnéticas y al final se agrega el pDNA ($p \leq 0.05$).

10. CONCLUSIONES

1.- De los plásmidos probados pCEM y pNFkb-luc, se observa que el plásmido pCEM transfecta significativamente mejor con exposición a un campo magnético que sin él ($p \leq 0.05$) ya que tiene un secuencia promotora con elementos de respuesta sensibles a magnetismo, por otro lado con el plásmido pNFkb-luc el cual posee otra secuencia promotora no se observa diferencia en el grado de transfección con y sin campo magnético.

2.-De los quitosanes probados tanto insoluble como solubles en agua, ambos tipos ayudan al proceso de transfección con el plásmido pCEM, pero se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) donde los quitosanes solubles en agua 20 kDa y de 3-5 kDa fueron mejores agentes transfectantes que el que es insoluble en agua y el cual es de 370 kDa.

3.-El quitosán insoluble en agua mostró su mejor desempeño en un radio de 2:1 mezclado con las partículas magnéticas de PolyMAG, pero estos resultados no están claros debido a que las partículas magnéticas de PolyMag transfectan muy bien sin el quitosán insoluble el agregarlo hace de hecho que la transfección baje considerablemente.

4.-Los resultados de transfección con los quitosanes solubles en agua mostraron los mejores resultados en especial los de la marca de Novamatrix (Novafect O15) y de la marca Coyote Foods, (Quitosán Coyote) con radio de 60:1 y 40:1 respectivamente los cuales son comparables estadísticamente con agentes transfectantes como PEI y Lipofectamine. ($p \leq 0.05$).

5.-La transfección conseguida por los complejos de quitosanes solubles en agua más el plásmido pCEM se ve mejorada con la adición de partículas magnéticas ComyMAG. Esto se ve reflejado porque cuando se adicionan partículas magnéticas CombyMAG a los complejos quitosán-plásmido, se utiliza 50% menos quitosán ($p \leq 0.05$) que cuando no se adicionan partículas magnéticas a los complejos. Así los complejos con 50 % más de quitosán sin partículas magnéticas y la mezcla con 50% menos quitosán pero con partículas magnéticas se obtienen resultados similares.

7- En la formación de los complejos varias características fueron relacionadas con los mejores resultados de transfección: El tipo de plásmido (pCEM), ($p \leq 0.05$) el pH el cual juega un papel primordial al momento formar los complejos quitosán: plásmido (ya que a pHs menores de 7.4 los complejos son más estables que a pH's mas alcalinos) y también tamaños menores de 331 nm observándose que estas características influenciaron mucho para obtener los mejores resultados.

8.- Se concluye también por las fotografías que los complejos con quitosán, plásmido

y partículas magnéticas están de formas redondeadas con un centro magnético rodeado de quitosán, tanto para los complejos con quitosán soluble como los de quitosán insoluble.

9.- Se observa que el orden de mezclado de los componentes: quitosán, plásmido y CombyMAG es muy importante, ya que al combinar primero los dos reactivos con cargas iguales, la transfección se baja significativamente, es decir si se mezcla primero el plásmido + CombyMAG + quitosán la transfección se ve disminuida comparada que las otras dos formas existentes, las cuales no afectan la transfección (quitosán + plásmido + ComyMAG ó quitosán + ComyMAG + plásmido), pero estadísticamente fue mejor la mezcla quitosán + ComyMAG + plásmido ($p \leq 0.05$).

10.-Se demostró en este proyecto que el quitosán Coyote Foods el cual no es un reactivo de transfección comercial, transfecta tan bien como un comercial como PEI y Lipofectamine, ($p \leq 0.05$) aunando que la adición de partículas magnéticas CombyMAG a este quitosán con la adición del plásmido pCEM, eficientiza la transfección en línea celular HeLA a la par de agentes transfectantes comerciales, con la ventaja que se tendría el manejo del gen por medio de un dispositivo auxiliar magnetizado.

11. APÉNDICE

Solución	Cantidades	Conc. Final
Ampicilina Ampicilina	100 ml 1 gr	100X 100 mg/ml
Buffer de cargado Tris-HCl pH 6.8 B-mercaptoetanol SDS Azul de Bromofenol Glicerol		2X 100 mM 4% 1% 0.02% 24%
Bromuro de Etidio EtBr	100 ml 1 gr	10mg/ml
Buffer Fosfato de sodio Na ₂ HPO ₄ 0.1 M NaH ₂ PO ₄ 0.1 M	100 ml 38 ml 24 ml	0.1M
Buffer Mg MgCl ₂ β-mercaptoetanol 14.4 M H ₂ O	1 ml 100 μl 347 μl 553 μl	100X
Buffer TBE Tris Base Ácido Bórico EDTA 0.5 M	1 L 54 gr 27.5 gr 20 ml	5X
Solución CaCl₂ CaCl ₂	200 ml 7.35 gr	0.25 M
Solución I Tris-HCl (pH 8.0) EDTA (pH 8.0)	200 ml 5 ml 4 ml	25 mM 10 mM

Solución II	200 ml	
NaOH 10 N	5 ml	0.2 N
SDS	2 gr	1%
Solución III	100 ml	
Acetato de Potasio	29.4 gr	
Ácido acético	11.5 ml	
Tris-Glicina	1L	5X
Tris Base	15.1 gr	
Glicina	94 gr	
SDS 10%	50 ml	

12. LITERATURA CITADA

1. Abe M, Hiraoka M, Takahashi M, Egawa S, Matsuda C, Onoyama Y, Morita K, Kakehi M, Sugahara T. 1986. Multi-institutional studies on hyperthermia using an 8-MHz radiofrequency capacitive heating device (Thermotron RF-8) in combination with radiation for cancer therapy. *Cancer*; 58, 1589–1595.
2. Alexious C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lubbe AS. 2001. Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting. *Cancer research* 60, 6641–6648.
3. Arai Y, Kubo T, Kobayashi K, Ikeda T, Takahashi K, Takigawa M, Imanishi J, And Hirasawa Y. 1999. Control of delivered gene expression in chondrocytes using heat shock protein 70B promoter. *J. Rheumatol* 26, 1769–1774.
4. Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA: 2004. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood*. 104:1217–1223.
5. Babincova M, Altanerova V, Lampert M, Altaner C, Machova E, Sramka M and Babinec P. 2000. Site-specific In vivo targeting of magnetoliposomes using externally applied magnetic field, *Z. Naturforsch (C)*, 55 278–281.
6. Barregård L, Järvholm B, Ungethüm E. 1985. Cancer among workers exposed to strong static magnetic fields. *Lancet* N8460:892.
7. Benderbous S, Corot C and Jacobs P. 1996. Superparamagnetic agents: physicochemical characteristics and preclinical imaging evaluation. *Acad Radiol*.3:S292–S294.
8. Berry C. and Curtis A. J. 2002. The influence of elastin-coated 520-nm- and 20-nm-diameter nanoparticles on human fibroblasts in vitro. *Phys. D.*; 35, R1.
9. Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. 2004: Radiation oncology. A century of achievements..*Nature Rev Cancer*; 4:737-747.
10. Blackburn RV, Galoforo SS, Corry PM, And Lee YJ. 1998. Adenoviral-mediated transfer of a heat-inducible double suicide gene into prostate carcinoma cells.*Cancer Res*. 58, 1358–1362
11. Blank M and Goodman R.1997. Do electromagnetic fields interact directly with DNA? *Bioelectromagnetics* 18, 111-115.

12. Blank M, Khorkova O and Goodman R.1994. Changes in polypeptide distribution stimulated by different level of electromagnetic and thermal stress. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 33, 109-114.
13. Borrelli MJ, Schoenherr DM, Wong A, Bernock LJ, and Corry PM. 2001. Heat-activated transgene expression from adenovirus vectors infected into human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 61, 1113–1121.
14. Brade AM, Ngo D, Szmítko P, Li PX, Liu FF, And Klamut HJ 2000. Heat-directed gene targeting of adenoviral vectors to tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 7, 1566–1574.
15. Braiden V, Ohtsuru A., Kawashita, Y., Miki, F., Sawada, T., Ito, M., Cao, Y., Kaneda, Y., Koji, T., And Yamashita, S. 2000. Eradication of breast cancer xenografts by hyperthermic suicide gene therapy under the control of the heat shock protein promoter. *Hum. Gene Ther.* 11, 2453–2463.
16. Budinger T.F. y col. 1984. Biological effects of static magnetic fields, In: "Proceedings of the 3rd Annual Meeting of the Society for Magnetic Resonance in Medicine", Society for Magnetic Resonance in Medicine, Berkeley, pp. 113-114.
17. Capan, Y., Woo, B. H., Gebrekýdan, S., Ahmed, S., and Deluca, P. 1999. Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of poly(L-lysine) complexed plasmid DNA. *Pharm. Res.* 16:509–513.
18. Cavaliere, R., Ciocatto, E.C., Giovanella, B.C., Heidelburger, C., Jonson, R. O., Margottini, M., Mondovi, B., Moricca, B. G. and Rossi-Fanelli, A. 1967. Selective heat sensitivity of cancer cells. *Biochemical and clinical studies. Cancer,* 20: 1351-1381.
19. Cavazzano-Calvo, M., Thrasher, A., and Mavilio, F. 2004. The future of gene therapy. *Nature (London)* 427: 779–781.
20. Chen J, Yang L.M., Liu Y.F., et al.2005. Preparation and characterization of magnetic targeted drug controlled-release hydrogel microspheres. *Macromolec.Symp* 225: 71-80.
21. Cohn, M. J. Freitas, R., Zhang, G., Jun, A., James S., James, E., David H. 2006. Developmental origin of shark electrosensory organs. *Evolution & Development* 8: pp. 74.
22. Corsi K., Chellat F., Yahia L. and Fernandes J. C., 2003. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 24: 1255-64
23. Cui Z. and Mumper R. J., 2001. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic vaccines *J. Control. Release* 75: 409-419.

24. Dandliker PJ, Holmlin RE and Barton Jk .1997. Oxidative thymine dimer repair in the DNA helix. *Science* 275: 146-167
25. Dickson, D. P. E., Walton, S. A., Mann, S. and Wong, K., 1997. Properties of magnetoferritin: a novel biomagnetic nanoparticle. *Nanostructured Materials* 9: 595-598.
26. Dobson J: 2004. Magnetic iron compounds in neurological disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1012:183–192.
27. Dreano M, Brochot J, Myers A, Cheng-Meyer C, Rungger D, Voellmy R, Bromley P. 1986. High-level, heat-regulated synthesis of proteins in eukaryotic cells. *Gene* 49:1-8.
28. Druet, E., Mahieu, P., Foidart, J.M. and Druet, P.: 1982. Magnetic solid-phase enzyme immunoassay for detection of anti-glomerular basement membrane antibodies. *J. Immunol. Methods*, 48, 149-157.
29. Dunnill, P. and Lilly, M.D.: 1974. Purification of enzymes using magnetic bioaffinity materials. *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 987-990.
30. Engin K. 1996. Biological rationale and clinical experience with hyperthermia Control. *Clin. Trials* 17 316–342.
31. Farber, E. 1995: Cell proliferation as a major risk factor for cancer: A concept of doubtful validity. *Cancer Res* 55:3759-3762.
32. Feyerabend, T., Steeves, R., Wiedemann, G.J., Richter, E. and Robins H.I.: 1997. Rationale and clinical status of local hyperthermia, radiation, and chemotherapy in locally advanced malignancies, *Anticancer Res.* 17 2895–2897.
33. Goodman, EM, Greenebaum, B., and Marron M.T. 1993. Altered protein synthesis in cell-free system exposed to a sinusoidal magnetic field. *Biochim Biophys Acta.* 1202: 107-112.
34. Goodman, R. and Henderson A. 1988. Exposure of salivary gland cells to low-frequency electromagnetic field alters polypeptide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 3928-3932.
35. Goodman, R., Blank M, Lin H, Khorkova O, Soo L, Weisbrot, D., Henderson A. (1994). Increased levels of hsp transcripts are induced when cells are exposed to low frequency electromagnetic fields. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 33, 115-120.
36. Guesdon, J.L., Thiery, R. and Avrameas, S.: 1978. Magnetic enzyme immunoassay for measuring human IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 6, 23-27.
37. Gupta, P. K., and Hung, C. T. 1993. Magnetically controlled targeted chemotherapy. In: N. Willmott and J. Daly (eds.), *Microspheres and Regional Cancer Therapy*, Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. pp. 71–116.

38. Häfeli, U., Shutt, W., Teller, J. and Zborowski, M. (ed.): 1997. Scientific and clinical applications of magnetic carriers. Plenum Press, New York.
39. Hallahan, D.E., Mauceri, H.J., Seung, L.P., Dunphy, E.J., Wayne, J.D., Hanna, N.N., Toledano, A., Hellman, S., Kufe, D.W., And Weichselbaum, R.R. 1995. Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Nat Med.* 1:786–791.
40. Hanawalt PC, Spivak G. 2008: Transcription-coupled DNA repair. Two decades of progress and surprises. *Nature Rev Mol Cell Biol*; 9:958-970.
41. Hirosue, S., Muller, B. G., Mulligan, R. C., and Langer, R. 2001. Plasmid DNA encapsulation and release from solvent diffusion nanospheres. *J. Control Release.* 70:231–242.
42. Huang Q, Hu JK, Lohr F, Zhang L, Braun R, Lauzen J, Little JB, Dewhirst MW, Li CY . 2000. Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy. *Cancer Res.* 60:3435-9.
43. Ikeda, N., Hayashida, O., Kameda, H., Ito, H. and Matsuda, T.: 1994. Experimental study on thermal damage to dog normal brain. *Int. J. Hyperthermia* , 10, 533-561.
44. Illum, L. 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.* 15 (9):1326–1331.
45. Issels, R.: 1999. Hyperthermia combined with chemotherapy-biological rationale, clinical application, and treatment results, *Onkologie* 22 374–381.
46. Ito A, Matsuoka F, Honda H, Kobayashi T. 2004. Antitumor effects of combined therapy of recombinant heat shock protein 70 and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 53: 26–32. A
47. Ito A, Shinkai M, Honda H, Yoshikawa K, Saga S, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T .2003. Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles. *Cancer Immunol Immunother* 52:80. A
48. Ito, A., Hibino, E., Honda, H., Hata, K., Kagami, H., Ueda, M and Kobayashi, T.: 2004. A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles. *Biochem. Eng.*, 20, 119-125. B
49. Ito, A., Hibino, E., Kobayashi, C., Terasaki, H., Kagami, H., Ueda, M. Kobayashi, T. and Honda, H.: 2005. Construction and delivery of tissue-engineering human retinal pigment epithelial cell sheets using magnetic nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng.*, 11 489-496. A
50. Ito, A., Hyashida, M., Honda, H., Hata, K., Kagami, H., Ueda, M. and Kobayashi T. 2004. Construction and harvest of multilayered keratinocytes

- sheets using magnetic nanoparticles and magnetic force, *Tissue Engineering*. 10: 873-880. C
51. Ito, A., Shinkai, M. Honda H., and Kobayashi.: 2005. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles *J. Biosci. Bioeng.* 100. 1-11 b
 52. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Yashikawa, K., Saga, S., Wakabayashi, T., Yoshida, J. and Kobayashi, T.: 2003. Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 80-82. B
 53. Ito, A., Tanaka, K, Honda H., Abe, S., Yamaguchi, H., and Kobayashi, T.: 2003. Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequency repeated hyperthermia using magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bieng.*, 96, 364-469. C
 54. Ito, A., Tanaka, K., Kondo, M., Shinkai, M., Honda, H., Matsumoto, K., Saida, T. and Kobayashi, T.: 2003. Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. *Cancer Sci.*, 94, 308-313. D
 55. Joki T, Nakamura M, Ohno T .1995. Activation of the radiosensitive EGR-1 promoter induces expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and sensitivity of human glioma cells to ganciclovir. *Human Gene Ther* 6:1507-13.
 56. Jordan A, Wust P, Fahling H, John W, Hinz A, Felix R. 1993. Inductive heating of ferromagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 9:51.
 57. Josephson L, Groman EV, Menz E, Lewis JM, Bengel H. 1990. A functionalized superparamagnetic iron oxide colloid as a receptor directed MR contrast agent. *Magn Reson Imaging* 8:637-46.
 58. Kamau, S.W., Hassa, P.O., Steitz, B., Petri-Fink, A., Hofmann, H., Hofmann-Amttenbrink, M., Rechenberg, B.v., and Hottiger, M.O. 2006. Enhancement of the efficiency of non-viral gene delivery by application of pulsed magnetic field. *Nucleic Acids Research*, 15, 34(5).
 59. Kas, H. S. 1997. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J. Microencap.* 14:689-711.
 60. Kavet R.1996. EMF and current cancer concepts. *Bioelectromag* 17:339-357,
 61. Kawashita, Y., Ohtsuru, A., Kaneda, Y., Nagayama, Y., Kawazoe, Y., Eguchi, S., Kuroda, H., Fujioka, H., Ito, M., Kanematsu, T., And Yamashita, S. 1999. Regression of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation. *Hum. Gene Ther.* 10: 1509-1519.

62. Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee JK, Cho MH. 2006. Toxicity and Tissue Distribution of Magnetic Nanoparticles in Mice *Toxicological Sciences* 89(1), 338–347.
63. Koda J, Venook A, Walser E et al.; 2002. A multicenter, Phase I/II trial of hepatic intraarterial delivery of doxorubicin hydrochloride adsorbed to magnetic target in patients with Hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Cancer* 38(Suppl. 7), S18.
64. Kondo, A. and Fakuda, H.: 1997. Preparation of thermo-sensitive magnetic hydrogel microspheres and application to enzyme immobilization. *J. Ferment Bioeng.*, 84: 337-341.
65. Kondo, A., Kamura, H., and Higashitani, K.: 1994. Development and application of thermosensitive magnetic immunomicrospheres for antibody purification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 99-105.
66. Krueger, G.R. 1989. Abnormal variation of the immune system as related to cancer. *Cancer Growth Prog.* 4:139-161.
67. Lacava, Z. G. M., Azevedo, R. B., Martins, E. V., Lacava, L. M., Freitas, M. L. L. Garcia, V. A. P., Rebula, C. A., Lemos, A. P. C., Sousa, M. H., Tourinho, F. A., Da Silva, M. F. and Morais, P. C., J. 1999. Toxic effects of ionic magnetic fluids in mice. *Journal of magnetism and magnetic materials.* 194:90-95.
68. Le, B., Shinkai, M., Kitade, T., Honda, H., Yoshida, J., Wakabayashi, T. and Kobayashi, T.: 2001. Preparation of tumor specific magnetoliposomes and their application for hyperthermia. *J. Chem. Eng. Jpn.* 34: 66-72.
69. Lee, K. Y., Kwon, I. C., Kim, Y. H., Jo, W. H., and Jeong, S. Y. 1998. Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. *J. Control. Release.* 51:213–220.
70. Lee, M., Nah, J.W., Kwon, Y., Koh, J. J., Ko, K. S., and Kim, S.W. 2001. Watersoluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharm. Res.* 18:427–431.
71. Leong, K.W., Mao, H. Q., Trung-Le, V. L., Roy, K., Walsh, S. M., and August, J. T. 1998. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J. Control. Rel.* 53:183–193.
72. Lieb WR, Stein WD. 1986. Simple Diffusion across the Membrane Barrier, Transport and Diffusion across Cell Membranes, Chapter 2. San Diego: Academic Press. pp. 69–112.
73. Li X. W., Lee D. K., Chan A. S. and Alpar H. O., 2003. *Biochim. Biophys. Acta* 1630, 7.
74. Lin H, Head M, Blank M, Han L, Jin M and Goodman R. 1998. Myc-mediated transactivation of HSP70 expression following exposure to magnetic field. *J. Cell. Biochem.*, 69: 181.

75. Lin H, Opler M, Head M, Blank M. and Goodman R. 1997. Electromagnetic field exposure rapid, transitory heat shock factor activation in human cells. *J. Cell Biochem.* 66, 482-488.
76. Litovitz, T.A., Krause D. and Mullins J.M. 1991. Effects of coherence time of the applied magnetic field on ornithine decarboxylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Common.* 178,862-865.
77. Litovitz, T.A., Krause D. Montrose, C.J., and Mullins, J.M.1994. Temporally incoherent magnetic fields mitigate the response of biological systems to temporally coherent magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 15, 399-409.
78. Litovitz, T.A., Montrose, C.J., Doinov, P., Brown, K.M. and Barber, M. 1993. Superimposing spatially coherent electromagnetic noise inhibits field-induced abnormalities in developing chick embryos. *Bioelectromagnetics* 15, 105-113.
79. Lohr, F., Hu, K., Huang, Q., Zhang, L., Samulski, T.V., Dewhirst, M.W., And Li, C.Y. 2000. Enhancement of radiotherapy by hyperthermia-regulated gene therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 48, 1513–1518.
80. Lubben, I. M., Verhoef, J. C., Borchard, G., and Junginger, H. E. 2001. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug Del. Rev.* 52:139–144.
81. Lübbe AS, Bergemann C, Huhnt H et al.: 1996. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy. *Cancer Res.* 56, 4694-4701 [A]
82. Lübbe AS, Bergemann C, Reiss H et al.: 1996. Clinical experiences with magnetic drug targeting: A Phase 1 study with 4-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumor. *Cancer Res.* 56,4686-4693. [B]
83. Maclaughlin, F. C., Mumper,R. J.,Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M., and Rolland, A. P. 1998. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J. Control. Rel.* 56:259– 272.
84. Manome, Y., Kunieda, T., Wen, P.Y., Koga, T., Kufe, D.W., And Ohno, T. 1998. Transgene expression in malignant glioma using a replication-defective denoviral vector containing the Egr-1 promoter: Activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iododeoxyuridine. *Hum. Gene Ther.* 9, 1409–1417.
85. Mansouri S., Lavigne P., Corsi K., Benderdour M., Beaumont E.and Fernandes J. C., 2004. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 1-8.
86. Mao H. Q., Roy K., Troung, L., Janes, K. A Lin, K. Y. Wang, Y. August J. T. and Leong K. W.,J. 2001. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Control. Rel.* 70, 399-421.

87. Mao, H. Q., Roy, K., Troung-Le, V. L., Janes, K. A., Lin, K., Wang, Y., August, J. T., and Leong, K. W. 2001. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Control. Rel.* 70:399–421.
88. Maxwell J.C. 1865. A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* p. 459-513.
89. McClellan JA, Boublikova P, Palcek E and Lelley DMJ.1990. Superhelical torsion in cellular DNA responds to environmental and genetic factors. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 87,8373-8377.
90. Ménoret A, Chandawarkar R . 1998. Heat-shock protein-based anticancer immunotherapy: an idea whose time has come. *Sem Immunol* 25:654
91. Mikhaylova1, M., Jo1, Y. S., Kim1, D. K., Bobrysheva, N., Andersson Y., Eriksson, T., Osmolowsky, M., Semenov V. And Muhammed M. 2004. The Effect of Biocompatible Coating Layers on Magnetic Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Hyperfine Interactions* 156/157: 257–263.
92. Minamimura T, Sato H, Kasaoka S, Saito T, Ishizawa S, Takemori S, Tazawa K, Tsukada K. 2000. Tumor regression by inductive hyperthermia combined with hepatic embolization using dextran magnetite-incorporated microspheres in rats. *Int J Oncol* 16:1153.
93. Mise, K., Kan, N., Okino, T., Nakanishi, M., Satoh, K., Teranuma, Y., S., Ohgaki, K. and Tobe, T.: 1990. Effects of heat treatment on tumor cells and antitumor effector cells. *Cancer Res.*, 50, 6199-6202.
94. Mondalek FG, Zhang YY, Kropp B, Kopke RD, Ge X, Jackson RL, Dormer KJ. 2006. The permeability of SPION over an artificial three-layer membrane is enhanced by external magnetic field. *J Nanobiotechnology*, 7; 4:4.
95. Mondovi B, Santoro AS, Strom R, Faiola R, Fanelli AR. 1972. Increased immunogenicity of Ehrlich ascites cells after heat treatment. *Cancer* 30:885.
96. Moos T, Morgan EH: 2004. The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: Review. *Ann N Y Acad Sciences* 1012:14–26,
97. Morimoto R, Tissieres A, Georgopoulos C (eds) 1990. *Stress proteins in biology and medicine.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
98. Morimoto R, Tissières A, Georgopoulos C. 1990. The stress response, function of the proteins and perspectives. *Stress proteins in biology and medicine*, Cold Spring Harbor, CSH Press, p 1-36.
99. Morimoto, K. J., Okumura, M., Sugibayashi, K, Kato Y .1981. *J Pharm Dyn* 4:624.

100. Mosbach, K. and Anderson, L.: 1997. Magnetic ferrofluids for preparation of magnetic polymers and their application in affinity chromatography. *Nature*, 270, 259-261.
101. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. 2000. The chaperon function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20:7146
102. Muldoon LL, Sandor M, Pinkston KE, Neuwelt EA. 2005. Imaging, distribution, and toxicity of superparamagnetic iron oxide magnetic resonance nanoparticles in the rat brain and intracerebral tumor. *Neurosurgery*. Oct; 57(4):785-96.
103. Nettelbeck, D.M., Jerome, V., And Muller, R. 2000. Gene therapy: Designer promoters for tumour targeting. *Trends Genet.* 16,174–181.
104. No, D., Yao, T.P., Evans RM. 1996. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:3346-51.
105. Ogris, M., Wagner, E.: 2002. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. *Somat Cell Mol Genet* 27:85–95.
106. Oswald P, Clement O, Chambon C, et al. 1997. Liver-positive enhancement after injection of Superparamagnetic nanoparticles: respective role of circulating and uptaken particles. *Magn Reson Imaging*. 15:1025–1031.
107. Ozdemirli M, Akdeniz H, el-Khatib M, Ju ST. 1991. A novel cytotoxicity of CD4+ TH1 clones on heat-shocked tumor targets, I: implications for internal disintegration model for target death and hyperthermia treatment of cancers. *J Immunol* 147:4027.
108. Patterson, A., And Harris, A.L. 1999. Molecular chemotherapy for breast cancer. *Drugs Aging* 14, 75–90.
109. Pazzagley, M., Kohen, F., Sufi, S., Masironi, N. and Cekan, S.Z.: 1988. Immuno assay for lutropin (hLH) based on the use of universal reagents for enzymatic labeling and magnetic separation and monitored by enhanced chemiluminescence. *J. Immunol. Methods*, 114, 62-68.
110. Purcell, Edward M. 1963. *Electricity and Magnetism*. New York: McGraw-Hill, pp 459.
111. Repacholi M.H. 1994. Guidelines on limits of exposure to static magnetic fields, *Health Phys.* 66:100-106.
112. Rosi NR, Mirkin CA: 2005. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem Rev* 105: 1547–152.
113. Safarik, I. and Safarikova, M. 2002. *Magnetic Nanoparticles and Biosciences*, *Mon. Chem.*, 133 737–759.

114. Safarik, I. and Safarikova, M.: 1999. Use of magnetic techniques for isolation of cells. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 722,33-53.
115. Safarik, I. and Safarikova, M. 2004. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagn. Res. Technol.*, 2, 7-34.
116. Saini, S., Stark, D.D., Hahn, P. F., Wittenberg, J., Brady, T.J. and Ferrucci, J.T.: 1987. Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology*, 162, 211-216.
117. Saiyed, Z. M., Telang, S. D. and Racnchand, C.N. 2003. Application of magnetic techniques on the field of drug discovery and biomedicine. *Biomagn. Res. Technol.*, 1,23-33.
118. Sato T., Ishii T. and Okahata Y., 2001. In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* 22, 2075-80.
119. Saunders, R. D., Sienkiewicz Z. J., Kowalczyk, C.I. 1991. Biological Effects of Exposure to Non-ionizing Electromagnetic Fields and Radiation. *J. Radiol. Prot.* **11** 27-42.
120. Scheich H, Langner G, Tidemann C, Coles RB, Guppy A. 1986. Electroreception and electrolocation in platypus. *Nature*. **319(6052)**: pp. 401-2.
121. Schlesinger MJ . 1990. Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265:12111.
122. Shinkai M, Matsui M, Kobayashi T. 1994. Heat properties of magnetoliposomes for local hyperthermia. *Jpn J Hyperthermic Oncol*; 10: 168–77.
123. Shinkai M, Suzuki M, Iijima S, Kobayashi T. 1995. Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer-cells and their application in hyperthermia. *Biotechnol. Appl. Biochem.*21, 125-137.
124. Shinkai M., Ito A. 2004. Functional Magnetic Particles for Medical Applications. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 91: 191–220
125. Shinkai, M., *J. Biosci.*2002. Functional magnetic particles for medical application. *Bioeng.* 94 606-13
126. Shinkai, M., Le, B., Honda, H., Yoshikawa, K., Simizu, K., Saga, S., Wakabayashi, T., Yoshida, J. and Kobayashi, T.: 2001. Targeting hyperthermia for renal cell carcinoma using human MN antigen-specific magnetoliposomes. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92 1138-1145.
127. Shinkai, M., Wang, J., Kamihira, M., Iwata, M., Honda, H., and Kobayashi, T.: 1992. Radio enzyme-linked immunosorbent assay with functional magnetic particles. *J. Ferment. Bioeng.*, 73, 166-168.

128. Shinkai, M., Yanase, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J. and Kobayashi, T.: 1996. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetic cationic liposomes: in vitro study. *Jpn. J. Cancer Res.*, 87, 1179-1183.
129. Somia, N., and Verma, I. M. 2000. Gene-therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* 1, 91-99.
130. Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade KL. 1998. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquired new roles in an adaptive world. *Immunity* 8:657.
131. Staba, M.J., Mauceri, H.J., Kufe, D.W., Hallahan, D.E., And Weichselbaum, R.R. 1998. Adenoviral TNF- α gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft. *Gene Ther.* 5, 293-300.
132. Stark, D.D., Weissleder, R., Elizondo, G., Hahn, P.F., Saini S., Todd, L.E., Wittenberg, J. and Ferrici, J.T.: 1998. Superparamagnetic iron oxide: clinical applications as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology*, 168, 297-301.
133. Stauffer, P. R., Cetas, T.C., Fletcher, A.M., DeYoung, D.W., Dewhirst, M. W., Oleson, J.R. and Roemer, R.B.: 1984. Observations on the use of ferromagnetic implants for inducing hyperthermia. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 31, 76-90.
134. Stechell, C.H. 1985. Magnetic separation in biotechnology a review. *J. Chemical Technology and Biotechnology*, 35B, 175-182.
135. Stevens, R.G. (1987). Electric power use and breast cancer: a hypothesis. *American Journal of Epidemiology*, 125, 556-561.
136. Stevens, R.G. & Davis, S. (1996). The melatonin hypothesis: Electric power and breast cancer. *Environ. Health Perspect.*, 104 (Suppl.), 1135-1140.
137. Stuchly, M.A. (1986): Human exposure to static and time-varying magnetic fields, *Health Phys.* 51:215-225
138. Sunil A. Agnihotri, Nadagouda N. Mallikarjuna and Tejraj M. Aminabhavi 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 100 (1): 5-28.
139. Tenforde T.S. 1991. ELF field interactions at the animal, tissue, and cellular levels. *Electromagnetics in biology and medicine.* 39: 225-245.
140. Tuinstaa R, Greenebaum B and Goodman EM (1997). Effects of magnetic fields on cell-free transcription in *E. coli* and HeLa extracts. *Bioelectrochem. Bioenerg* 43,7-12.
141. Wilson, B.W., Stevens, R.G. & Anderson, L.E. (1989) Neuroendocrine mediated effects of electromagnetic-field exposure: possible role of the pineal gland. *Life Sci.*, 45, 1319-1332

13. RESUMEN CURRICULAR

Teodora Cavazos Vallejo

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología

Tesis: CONSTRUCCIÓN DE NANOCOMPLEJOS BASADOS EN PARTÍCULAS MAGNÉTICAS, QUITOSAN Y UN PLÁSMIDO CON SECUENCIAS DE RESPUESTA A CAMPOS MAGNÉTICOS PARA MEJORAR LA TRANSFECCIÓN.

Campo de Estudio: Clínico

Datos Personales: Nacida en Comalcalco, Tabasco el 1 de Enero de 1981, hija de Héctor Cavazos Duran y Pety Vallejo Alejo.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2002, con reconocimiento especial por desarrollo de trabajo experimental, presentación y defensa del examen profesional. Además reconocimiento por el Instituto estatal de la juventud en el área de innovación tecnológica por importancia de trabajo de licenciatura.

Experiencia Profesional: Investigador Asociado en la Universidad Autónoma de Nuevo León del 2009-2011, actual Coordinadora de Investigación y Desarrollo e en Cosmocel S.A.