

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EXPRESIÓN DE TRAIL PARA INDUCIR APOPTOSIS EN CÁNCER
PULMONAR USANDO UN SISTEMA BASADO EN
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y QUITOSÁN**

POR

CYNTHIA ARACELY ALVIZO BÁEZ

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

JUNIO, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**EXPRESIÓN DE TRAIL PARA INDUCIR APOPTOSIS EN CÁNCER
PULMONAR USANDO UN SISTEMA BASADO EN
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y QUITOSÁN**

POR

M.C. CYNTHIA ARACELY ALVIZO BÁEZ

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

JUNIO, 2016

**EXPRESIÓN DE TRAIL PAR INDUCIR APOPTOSIS EN CÁNCER
PULMONAR USANDO UN SISTEMA BASADO EN NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS Y QUITOSÁN**

Comité de tesis

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Director de Tesis

Dra. Lydía Gpe. Rivera Morales
Secretario

Dr. Pablo Zapata Benavides
Primer vocal

Dr. Cristina Rodríguez Padilla
Segundo vocal

Dra. Diana Reséndez Pérez
Tercer vocal

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de investigación fue financiado:

Por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el proyecto titulado: “**Expresión de Trail para inducir apoptosis en cáncer pulmonar usando un sistema basado en nanopartículas magnéticas y quitosán**”

Por el apoyo brindado a la investigación científica de este trabajo por parte del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología de la UANL.



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en la Unidad de Inmunología Molecular (UIM) del Laboratorio de Inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. bajo la dirección general del Dr. Juan Manuel Alcocer González.

DEDICATORIA

A Dios

Por guiarme y darme siempre fuerzas de seguir adelante pese a cualquier
circunstancia,
Por las personas que ha puesto en mi camino.

A mi madre †

Por sus consejos y enseñanzas,
Por los valores que me inculcó y que siempre llevo presentes y me han hecho ser la
persona que ahora soy.

A mi padre

Por su infinito amor,
Por su apoyo,
Por su gran esfuerzo y sacrificios que han valido la pena ya que muchos de mis
logros se los debo a él.

A mi esposo

Por su gran amor, comprensión, paciencia, apoyo y estar siempre.

A mis hermanas

Por siempre estar dispuestas siempre a escucharme y apoyarme.

Porque ustedes son parte indispensable de mi vida
Las personas que más quiero y admiro.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González

Asesor de esta tesis, le agradezco sinceramente la oportunidad y confianza al aceptarme como su estudiante, por transmitirme sus conocimientos científicos, por su gran paciencia en guiarme y orientarme durante todo este proceso de la tesis doctoral.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Jefe del Depto. de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis.

Al Comité doctoral

- *Dra. Lydia Rivera*
- *Dr. Pablo Zapata*
- *Dra. Diana Reséndez*

Por su apoyo, revisión y recomendaciones de esta tesis.

A todo el personal del L2:

Mis compañeros que se convirtieron en amigos y parte fundamental de este trabajo por compartir sus conocimientos y apoyo.

A todas las personas:

Que de alguna manera contribuyeron para que esta tesis llegara a su término.

GRACIAS

JUNIO, 2016

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
NOMENCLATURA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Cáncer de pulmón.....	2
2.1.1 Limitaciones en los tratamientos convencionales en cáncer de pulmón.....	3
2.1.2 Cirugía.....	3
2.1.3 Quimioterapia.....	3
2.1.4 Radioterapia.....	4
2.2 Terapia génica en cáncer de pulmón.....	4
2.2.1 Inducción de la expresión de genes como medida terapéutica.....	5
2.3 Inductor de apoptosis relacionada al factor de necrosis tumoral (TRAIL) como agente biológico anticancerígeno.....	6
2.3.1 Estructura y función de TRAIL.....	6
2.3.2 TRAIL, sus receptores y vía apoptótica	7
2.3.3 TRAIL en supresión de tumores.....	8
2.4 Nanopartículas como acarreadores de genes.....	9
2.5 Nanopartículas de quitosán.....	11
2.6 Nanopartículas magnéticas.....	15
2.7 Promotores activados por campos magnéticos	19
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.1.1 Objetivos específicos.....	22
5. ESTRATEGIA GENERAL	23

6. MATERIALES.....	25
7. METODOLOGÍA.....	26
7.1 Transformación de bacterias competentes.....	29
7.2 Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala	30
7.3 Purificación de pCEM-TRAIL a gran escala	31
7.4 Producción de nanopartículas magnéticas de quitosán con el plásmido pCEM-TRAIL	32
7.5 Caracterización de las nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán y plásmido pCEM-TRAIL	32
7.5.1 Forma y tamaño por microscopía electrónica de transmisión.....	32
7.5.2 Forma y tamaño por microscopía de fuerza atómica.....	33
7.5.3 Medición del potencial zeta de las nanopartículas.....	33
7.5.4 Prueba de liberación de plásmido de las nanopartículas.....	33
7.6 Determinación del efecto de los complejos formados por nanopartículas magnéticas de quitosán para inducir la expresión del gene terapéutico TRAIL en la línea celular B16F10 de melanoma murino bajo la influencia de un campo magnético.....	33
7.6.1 Transfección (Magnetofección).....	34
7.7 Detección de células apoptóticas	34
7.7.1 Microscopía óptica.....	36
7.7.2 Detección de activación de caspasas.....	36
7.8 Identificación la proteína TRAIL en las células B16F10 mediante extracción de proteínas y Western blot	37
7.8.1 Extracción de proteínas.....	37
7.8.2 Cuantificación de proteínas.....	37
7.9 Determinación del efecto de los complejos formados por nanopartículas magnéticas de quitosán para inducir la expresión del gene terapéutico TRAIL en pulmón de ratón C57BL6 bajo la influencia de un campo magnético	39
7.9.1 Inducción de tumor en pulmón en ratones C57BL6.....	39
7.9.2 Administración de nanopartículas a ratones C57Bl6 y magnetofección	40
7.10 Evaluación de apoptosis en tejido pulmonar después de la administración de nanopartículas mediante diferentes técnicas.....	43
7.10.1 Detección de alteraciones citomorfológicas en cortes de tejido pulmonar mediante tinción con hematoxilina y eosina.....	44
7.10.2 Detección de degradación de DNA en células individuales por medio de marcaje del DNA	44

7.11 Detección de la proteína TRAIL en tejido pulmonar.....	46
7.12 Evaluación de la sobrevivencia.....	46
8. RESULTADOS.....	47
8.1 Obtención y caracterización del vector.....	47
8.2 Producción de nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán y caracterización	49
8.2.1 Forma y tamaño de nanopartículas.....	50
8.3 Prueba de liberación <i>in vitro</i> del plásmido	51
8.4 Evaluación del nivel de apoptosis y transfección de las nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán y el plásmido pCEM-TRAIL en células B16F10	51
8.4.1 Alteraciones citomorfológicas mediante tinción hematoxilina y eosina ..	51
8.4.2 Activación de caspasa	52
8.4.3 Detección de la proteína TRAIL	54
8.5 Inducción tumores pulmonar en ratones y administración de nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán	55
8.5.1 Tinción de tejido pulmonar con hematoxilina y eosina	55
8.5.2 Prueba de TUNEL	56
8.6 Evaluación de sobrevivencia	58
9. DISCUSION.....	60
10. CONCLUSIONES.....	63

BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN BIOGRÁFICO

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Grupos experimentales de ratones	41
II. Uso adecuado de magnetos <i>in vivo</i> obtenida del manual OZ Bioscience.....	42
III. Tiempo de incubación magnético sugerido para varios tejidos.....	43
IV. Preparación de buffer de incubación rTdT para reacciones y de control positivo.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Receptores de TRAIL en humano y ratón.....	8
2. Representación del proceso de gelación iónica entre quitosán y TPP.....	15
3. Nanopartículas magnéticas para transfección de genes.....	17
4. Magnetotransfecciones <i>in vivo</i>	18
5. Representación esquemática del envío sistémico del gen TRAIL por nanopartículas magnéticas de quitosán y su activación por un campo magnético externo para inducir apoptosis en pulmones de ratón.....	23
6. Diagrama de flujo de la metodología.....	24
7. Mapa del vector pORF5-mTRAIL.....	27
8. Mapa del vector PCEM-Luc.....	29
9. Placa magnetofectora.....	34
10. Esquema sobre las pruebas que se harán al cultivo celular para detectar apoptosis	35
11. Mecanismo de detección de caspasa 3 activa por medio del kit de tinción rojo.....	36
12. Cuantificación de proteínas en placa eppendorf de 96 pozos.....	38
13. Administración de células vía vena caudal del ratón en una caja especial inmovilizadora	40
14. Administración de nanopartículas en vena caudal de ratones.....	41
15. Técnicas utilizadas para observar apoptosis en tejido pulmonar.....	43
16. Amplificación de la secuencia TRAIL a diferentes temperaturas.....	46
17. Fragmento TRAIL insertado en el vector de clonación pGEM-T Easy.....	46

18. Pgem-TRAIL digerido y bandas correspondientes a pCEM y la de luciferasa	47
19. Vector final PCEM-TRAIL	48
20. Imágenes de MET de las nanopartículas de quitosán producidas por el método de gelación iónica	49
21. Imágenes de MFA de los complejos con la nanopartícula magnética.....	49
22. Gel de agarosa donde se incorporación complejos plásmido- quitosán a diferentes radios	50
23. Tinción de células B16F10 con hematoxilina y eosina después de diferentes tratamiento.....	51
24. Expresión de caspasa 3 en línea celular B16F10 a las 24 y 48 horas	52
25. Proteína TRAIL detectada por western blot en células B16F10.....	53
26. Tejido de pulmón de ratón con diferentes tratamientos analizados con H&E.....	54
27. Tejido pulmonar de ratón H&E y TUNEL con el porcentaje de células apoptóticas	56
28. Gráfica del porcentaje de la señal de apoptosis en tejido pulmonar con diferentes tratamientos	57
29. Western blot revelado por colorimetría con la proteína B-actina y TRAIL	58
30. Supervivencia de ratones con melanoma pulmonar después de diferentes tratamientos	59

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
Cm	Centímetro
CPM	Cáncer pulmonar de células pequeñas
CPNM	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
g	Gramos
h	Horas
H ₂ O	Agua
kDa	Kilodatos
mL	Mililitro
nm	Nanómetros
ng	Nanogramo
ng/μL	Nanogramo por microlitro
NK	Células asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
PBS	Solución básica de fosfatos
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCR	Receptor de células T
TPP	Tripolifosfato de pentasodio
VAA	Virus adenoasociado
VEGFs	Factores de crecimiento endotelial
μg	Microgramo
μg/μL	Microgramo por microlitro
μL	Microlitro
%	Por ciento
C	Grados centígrados
+	Positivo
-	Negativo

RESUMEN

Las nanopartículas metálicas han sido estudiadas intensamente como vectores para transportar diferentes moléculas biológicamente activas. En estudios previos nuestro grupo ha descubierto un promotor eucariótico que es inducido con la aplicación de un campo magnético externo (Rodríguez-De la Fuente *et al.*, 2009, Rodríguez-De la Fuente *et al.*, 2012). Dicho promotor presente en un plásmido (pCEM) incorporado en un complejo de nanopartículas metálicas cubiertas con quitosán forman un nanovector que es capaz de transfectar células *in vitro* y su promotor es activado por influencia de un campo magnético externo (Alvizo-Baez *et al.*, 2014). Con este sistema, el campo magnético tiene un doble efecto por un lado produce una magnetofección sobre las células y a la vez activa externamente el gen transfectado en la célula.

Estos estudios han demostrado que los nanovectores desarrollados son capaces de dirigirse, retenerse y expresar el gen que transportan en el sitio deseado. La propuesta de este proyecto es utilizar este sistema basado en nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán para activar y retener un plásmido (pCEM-TRAIL) que se activa utilizando un campo magnético externo y que expresa el gen TRAIL con el propósito de inducir apoptosis en tejido de cáncer pulmonar como una alternativa para disminuir el desarrollo de focos tumorales en pulmones de ratones ya que guiados y activados por un campo magnético externo pueden tener una potencial aplicación en cáncer de pulmón como una alternativa de terapia génica.

ABSTRACT

Iron oxide nanoparticles have been studied intensively as vectors to transport different biologically active molecules. In previous studies our group has discovered a eukaryotic promoter that is induced by applying an external magnetic field (Rodríguez De la Fuente *et al.*, 2009; Rodríguez De la Fuente *et al.*, 2012). This promoter in a plasmid (PCEM) incorporated into a complex metal nanoparticles coated with chitosan can form a nanovector that is capable of transfecting cells *in vitro* and its promoter is activated under the influence of an external magnetic field (Alvizo-Baez *et al.*, 2014). With this system, the magnetic field has a dual effect on the one hand produces a magnetofection on cells and activates both externally transfected gene into the cell.

These studies have shown that the developed nanovectors are capable of targeting, retained and express the gene carrying the desired site. The purpose of this project is to use these nanovectors based coated magnetic nanoparticles with chitosan to activate and retain PCEM-TRAIL plasmid that is activated using an external magnetic field and expressing TRAIL gene in order to induce apoptosis in lung cancer tissue as an alternative to inhibit tumor development. These guided and activated by external magnetic field may have potential application in lung cancer as an alternative to gene therapy.

1. INTRODUCCION

La eficacia del envío de genes no virales para terapias dependen críticamente de una concentración local de plásmido de DNA en el tejido deseado y superando algunas barreras incluyendo la rápida degradación por endonucleasas intra y extracelulares. Para ello se han utilizado acarreadores magnéticos que son comúnmente a base de polímeros, ya que tienen una variedad de grupos funcionales que pueden ser utilizados para aplicaciones específicas. Estos polímeros ya sean naturales o sintéticos han sido utilizados en la preparación de estos acarreadores por años. En 1995 Mumpher *et al.*, fueron los primeros en proponer el uso del quitosán como acarreador de ADN.

Las nanopartículas a base de quitosán se forman de acuerdo a una aproximación de tipo 'bottom-up' como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones intra-moleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas el fármaco puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida

In vivo, los campos magnéticos son enfocados debajo del sitio que se requiera para promover la transfección y también para hacer llegar el gen terapéutico a un órgano o sitio específico dentro del cuerpo (Kavaz *et al.*, 2008).

Las terapias anti cancerígenas ideales son aquéllas que puedan destruir selectivamente las células malignas sin afectar a las células sanas. Actualmente existen agentes que son verdaderos específicos en células de cáncer en términos de eficacia e inducción de muerte celular. TRAIL es un ejemplo de la molécula que selectivamente destruye células malignas pero no células normales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la causa líder de muertes por cáncer en el mundo, con alrededor de un millón de casos diagnosticados cada año. En México cada año se diagnostican nueve mil personas con este tipo de neoplasia, de los cuáles ocho mil fallecen en este periodo. Esta enfermedad cobra más vidas que los tumores malignos de próstata, mama y colon juntos, lo anterior es debido a que en México, el 75% de los casos de cáncer de pulmón se detectan en etapas avanzadas, lo que disminuye en gran medida la sobrevivencia, ya que 90% de estos pacientes fallecen antes del primer año del diagnóstico. Existen múltiples opciones para el tratamiento de cáncer de pulmón que han sido descritas incluyendo cirugía, quimioterapia y radiación, sin embargo, la eficacia terapéutica es frecuentemente ausente para la enfermedad avanzada. Por otro lado, las drogas anti-cancerígenas causan efectos indeseables sistémicos; si fueran solamente dirigidas hacia el sitio del tumor se podría eliminar la exposición sistémica a otros tejidos (Roa *et al.*, 2011). Por lo tanto, la necesidad de nuevas y mejores alternativas para terapia en cáncer de pulmón es evidente.

Los cánceres originados en los pulmones se dividen en dos tipos: cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (CPNM) y el cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPM). El CPNM se subdivide en: – Carcinoma epidermoide: asociado al tabaquismo, su localización suele ser central, cerca de un bronquio. – Adenocarcinoma: se localizan más frecuentemente en la periferia. El subtipo de adenocarcinoma conocido como carcinoma bronquioloalveolar tiende a tener mejor pronóstico. – Carcinoma de células grandes: suele crecer y propagarse rápidamente, por lo que su pronóstico es más desfavorable. – Carcinoma indiferenciado: tiene un comportamiento muy agresivo. El cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico crece con mayor rapidez y suele diseminarse a otros órganos del cuerpo, como hígado, cerebro o hueso. En muy pocas ocasiones este tipo de tumor es subsidiario de intervención quirúrgica (Campos H *et al.*, 2003).

2.1.1 Limitaciones en los tratamientos convencionales en cáncer de pulmón

El cáncer metastático puede ser tratado con terapia sistemática (quimioterapia, terapia biológica, terapia dirigida), terapia local (cirugía, radiación), o una combinación entre éstas. La elección de tratamientos depende del tipo de cáncer (tamaño, ubicación y el número de tumores metastáticos), estado de salud del paciente, edad y obviamente el estadio del cáncer. La terapia puede ser curativa (posible erradicación) o paulatina. Se ha reportado que más de un tipo de terapia se prescribe para potenciar los efectores de la terapia primaria y es referida como terapia adyuvante. Algunos ejemplos de estas incluyen quimioterapia o radioterapia, que son administradas después de cirugías de tumores para eliminar cualquier célula maligna (2).

2.1.2 Cirugía

La eliminación quirúrgica de tumores. Es generalmente aplicada para pacientes con cáncer de pulmón en estadio I y algunas veces II previniendo que el cáncer no se esparza más allá de los pulmones. Algunas técnicas empleadas para remover células cancerosas dentro de los pulmones incluyen lobectomías (escisión quirúrgica de lóbulos pulmonares que contienen células cancerosas) y neumonectomía (remoción de todo el pulmón). No es recomendable en casos en donde el tumor este muy cerca de órganos vitales y en presencia de metástasis distantes. Cerca del 10-35% del cáncer puede ser removido, pero nunca es posible erradicar las células malignas. Un cierto porcentaje persiste o reaparece incluso después de una cirugía. Como sea, la cirugía está restringida a pacientes con enfermedades cardíacas o respiratorias ya que no sobrevivirían a ella.

2.1.3 Quimioterapia

Como ya se mencionó antes, las cirugías no son eficientes para pacientes que se encuentran en un estadio avanzado de cáncer de pulmón, existen métodos de tratamientos más radicales (quimioterapias o radioterapia). La quimioterapia es basicamente la administración de drogas en los pacientes incluso después de una cirugía o sola para prevenir el crecimiento de células cancerosas ya sea matándolas o

obstruyendo el proceso de división celular. La quimioterapia puede darse en pastillas, infusiones intravenosas o una combinación entre las dos. El proceso básico de la quimioterapia se basa en la permeabilidad y efecto de retención de los tumores. Los tumores muestran hiperpermeabilidad debido a la sobreexpresión de los factores de crecimiento endotelial (VEGFs), óxido nítrico (NO), prostaglandinas, colagenasas, etc. Por lo tanto, las macromoléculas de objetivos tumorales (proteínas, DNA, RNA, etc.) se pueden orientar fácilmente y difundirse a través de las vasculaturas tumorales débiles. Por el contrario, los tumores además exhiben alta habilidad de retención de cualquier molécula extraña (Onishi H *et al.*, 2004)

2. 1.4 Radioterapia

La radioterapia puede estar indicada como tratamiento neoadyuvante o adyuvante; como tratamiento primario en enfermedad médicamente inoperable; y como terapia paliativa. La irradiación profiláctica del sistema nervioso central mejora la tasa de supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes que han alcanzado una remisión completa, igualmente, reduce el riesgo de metástasis cerebrales. La radiación en las metástasis óseas con esquemas de fraccionamiento consigue buenos resultados (De las Heras García B *et al.*, 2001)

2.2 Terapia génica en cáncer de pulmón

El pulmón es un órgano importante como objetivo para la terapia génica en cáncer, es un órgano blanco especialmente atractivo debido a la accesibilidad relativamente no invasiva a través de las vías respiratorias y vasculatura. Sin embargo, una vez en el pulmón, los vectores de transferencia génica se pueden encontrar defensas muy eficaces que se han evolucionado para proteger las vías respiratorias de partículas de todos los tamaños, incluyendo alérgenos y virus (Grill D *et al.*, 2004).

Muchos estudios han demostrado la efectividad en la transferencia de genes de pulmón, y el progreso reciente se concentra en la búsqueda para su validación en modelos animales o en la clínica. La mayoría de los avances que se han logrado han sido realizados en el tratamiento de cáncer de pulmón y la fibrosis quística, éstas se consideran como enfermedades representativas, ya que con las que requieren una expresión genética pulmonar aguda y crónica, respectivamente. En los últimos años se ha tratado de lograr una terapia funcional dirigida, las nanopartículas han sido propuestas como vehículos adecuados para el transporte de macromoléculas terapéuticas hacia el epitelio pulmonar, evitando su eliminación rápida por mecanismos fagocíticos (Schurch *et al.*, 1990). Además, en algunos casos se ha comprobado su capacidad para ser captadas por células epiteliales bronquiales y alveolares (Dailey L *et al.*, 2003).

2. .2.1 Inducción de expresión de genes como medida terapéutica

Hay varios problemas que se tienen que solucionar para obtener una expresión de genes en el pulmón como: (a) mejorar la calidad y la cantidad de proteína que llega al sitio de acción (ya sea extracelular o intracelular) y, en consecuencia, la disminución de efectos adversos debido a la administración de fármacos no específicos al tejido blanco, (b) la protección de la proteína y la mejora de su estabilidad *in vivo*; (c) prolongar el tiempo de residencia de drogas en su sitio de acción, y d) se pueden emplear para proporcionar orientación pasiva o activa (Yamamoto *et al.*, 1997).

La elección del vehículo apropiado depende de varios factores, incluyendo la naturaleza del fármaco a administrar, el dispositivo de entrega, el tipo de enfermedad, además del lugar de acción, la naturaleza y la seguridad del acarreador.

Junto con el desarrollo de nuevas tecnologías para la administración de fármacos capaces de representar la administración eficaz de un fármaco seleccionado, una inversión en la mejora de los materiales aplicados al diseño de los sistemas es un tema muy importante. La seguridad del adyuvante utilizado para desarrollar acarreadores al pulmón para la entrega de proteínas tiene que ser determinado y las cuestiones locales relacionadas a irritación y toxicidad a largo plazo, la acumulación y la inmunogenicidad (Heinneman *et al.*, 2000).

2.3 Inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL) como agente biológico anticancerígeno

Mucho tiempo y dinero se ha invertido en intentar desarrollar nuevas y mejores opciones de tratamientos con terapia génica para pacientes con cáncer. A pesar de los avances en los últimos años los pacientes con cáncer avanzado siguen siendo difíciles de tratar y las terapias estándares como la quimioterapia y radioterapia resultan ineficientes, además relacionadas con toxicidades. Por estas razones las terapias biológicas se han estado explorando como alternativas, debido a su especificidad potencial para lograr erradicar solo células malignas tumorales, y a que muchos de los efectos asociados con terapias estándar pueden ser evitados. (Lyse *et al.*, 2011).

Las terapias anti-cancerígenas ideales son aquellas que puedan destruir selectivamente las células malignas sin afectar a las células sanas. Actualmente existen agentes que son verdaderamente específicos para células de cáncer y que además provocan una inducción de muerte celular. TRAIL es un ejemplo de una molécula que selectivamente destruye células malignas pero no células normales. A mediados de los 90's dos grupos independientes de investigadores, descubrieron una proteína nueva que llamaron Apo2L o ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL). Estudios recientes mostraron que la administración de TRAIL en ratones con tumores sólidos se suprimió la progresión del tumor se mejoró la supervivencia y no causó toxicidad detectable. Aún más, se ha observado que TRAIL coopera sinérgicamente con drogas quimioterapéuticas para causar la regresión sustancial del tumor, y en algunos casos, eliminarlo definitivamente. Con estos datos se sugiere que TRAIL puede actuar como un potente agente anti cancerígeno agregando como ventaja que no causa toxicidad significativa en tejido normal (Wiley *et al.*, 1995).

2.3.1 Estructura y función de TRAIL

Antes del descubrimiento de TRAIL, se identificaron otros dos miembros de la familia del factor de necrosis de tumor (TNF) como potentes inductores de muerte celular. Desafortunadamente se observó una toxicidad significativa por ejemplo, la

muerte de células de tejido sano después de la administración sistémica ya fuera del TNF y su ligando FasL, lo cual pone en cuestionamiento la utilidad de estas moléculas como terapias anti cancerígenas. Aunque la habilidad de Apo2L/TRAIL para matar ciertas células transformadas por el mecanismo de apoptosis está bien establecida, su rol fisiológico no está del todo definido. Algunos estudios con ratones deficientes de APO2L/TRAIL indican que la señalización de este no es esencial para el desarrollo embrionario normal. El mayor rol de APO2L/TRAIL se encontró en el sistema inmune, jugando un rol en regulación de la respuesta inmune. En humanos, el RNAm TRAIL está presente en una gran variedad de tejidos incluyendo el bazo, timo, próstata, ovario, intestino delgado, colon y placenta. Dentro del compartimiento hematopoyético, TRAIL es expresado en linfocitos T activados, células B, NK, monocitos, células dendríticas y neutrófilos. Dentro de los estudios *in vitro* de la función de TRAIL se reveló que preferentemente induce apoptosis en células transformadas, mientras que deja las células normales y tejidos intactos. Otras investigaciones en la función de TRAIL en sistemas de modelos tumorales han demostrado que pueden inducir apoptosis en poblaciones específicas de células sin transformar como linfocitos activados y células epiteliales de pulmón infectadas con influenza (Mahalingam *et al.*, 2009).

2.3.2 TRAIL, sus receptores y vía apoptótica

Como los demás miembros de la familia TNF, TRAIL forma homotrímeros que se unen a tres moléculas receptoras. TRAIL induce apoptosis por medio de interacciones con sus receptores. Hay 5 receptores TRAIL incluyendo DR4, DR5 (KILLER, TRAIL R-1) DcR1 (TRID, TRAIL-R·3 o LIT), DcR2 (TRUNDD o TRAIL-R4) y osteoprotegrina (OPG). DR4 y DR5 contienen un dominio de muerte conservado (DD) y son receptores pro-apoptóticos. Diferente a DR4 y DR5, TRUNDD tiene un DD truncado. Mientras que estos dos receptores actúan como señuelo para antagonizar apoptosis inducida por TRAIL por competencia de unión al ligando. Cuando TRAIL se une a DR4 y/o DR5, estos receptores se trimerizan para formar el DISC y así reclutar la proteína adaptadora FADD y caspasa 8 o 10, permitiendo la activación de caspasas ejecutoras, incluyendo caspasa 3 y causar la escisión de sustratos de muerte y causar muerte celular (Gen Sheng Wu., 2009). (Fig 1).

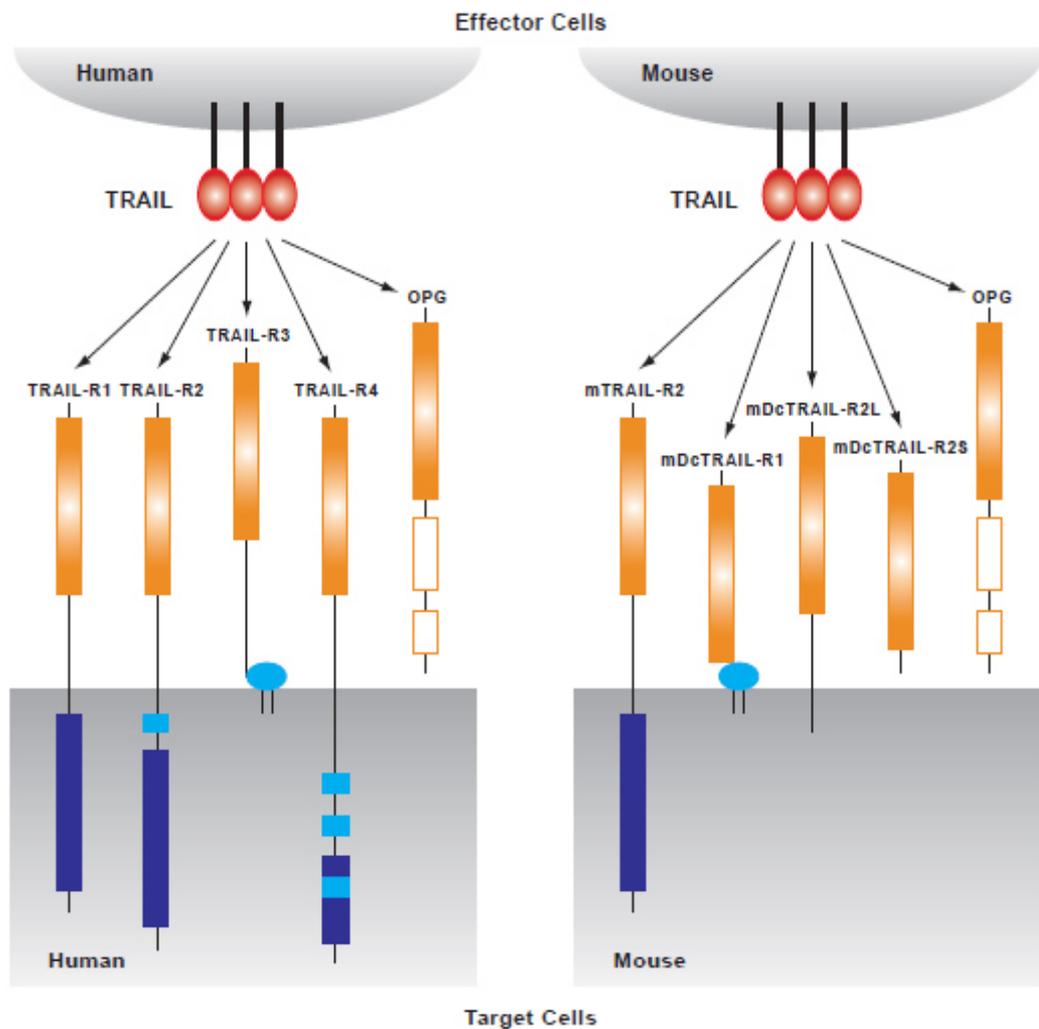


Fig.1. Receptores de TRAIL en humano y ratón

Obtenido de: *TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy*: H. Yagita, *et al*; *Cancer Sci.* 95, 777 (2004) (Review)

2.3.3 TRAIL en supresión de tumores

TRAIL es expresado por distintas células del sistema inmunitario, como linfocitos T, células NK, monocitos y células dendríticas (Griffith *et al.*, 1999). La estimulación de dichas células a través de interferones o del TCR, en el caso de los primeros, induce la expresión de este ligando y así se favorece o se estimula su capacidad de inducción de apoptosis sobre las células tumorales (Takeda *et al.*, 2002).

La Capacidad de TRAIL para inducir apoptosis selectivamente en células transformadas y la necesidad de terapias antitumorales menos agresivas que las utilizadas actualmente, han propiciado el desarrollo de numerosos estudios dirigidos al empleo de éste ligando en la erradicación de tumores. En la actualidad, anticuerpos frente a los receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1 y -R2 se encuentran en ensayos clínicos de fase I y de fase II tras comprobar su capacidad para inducir apoptosis en líneas tumorales y tumores primarios *in vitro* (Georgakis *et al.*, 2005)

TRAIL soluble recombinante es de interés para terapia en cáncer por un gran número de razones. Hay algunos agentes que son cáncer específicos en términos de eficacia o inducción de muerte celular. La administración de TRAIL recombinante soluble en experimentos con animales incluyendo ratones y primates induce significativamente una regresión del tumor sin toxicidad sistémica. TRAIL induce apoptosis en una variedad de líneas celulares sin tener en cuenta el status de p53 y por lo tanto debe ser una estrategia terapéutica eficiente, particularmente en células en las cuales la vía de respuesta de p53 ha sido inactivada. (Hersey P *et al.*, 2001).

2.4 Nanopartículas como acarreadores de genes

En años recientes, la terapia génica ha tenido un considerable desarrollo y por consiguiente ha tomado un gran auge en la biomedicina, sin embargo ésta utilidad clínica se enfrenta a un principal obstáculo, el cual radica en la inhabilidad de los vectores comunes para ser eficientes y seguros en el envío de tras-genes a un tejido específico *in vivo* (Somia *et al.*, 2000). La elección del vehículo apropiado depende de varios factores, incluyendo la naturaleza del gen a administrar, el dispositivo de entrega, el tipo de enfermedad y lugar de acción y, la naturaleza y seguridad del acarreador.

Mientras que progresos considerables se han hecho en el desarrollo de vectores, las metas a futuro incluyen: una forma de administración segura y tejido específica, resistencia a degradación por nucleasas, y la posibilidad de controlar la duración del ADN plasmídico (ADNp) tanto en dosis como en administración lo cual aún no se ha logrado con eficiencia (Cohen *et al.*, 2000).

Hay un gran interés en el envío de genes dirigidos, a la fecha se han desarrollado sistemas de envío de genes basados en vectores virales y no virales, éstos últimos como su nombre lo indica, no requiere el uso de vectores virales, los cuales están asociados con inmunogenicidad, propiedades oncogénicas y efectos de largo término desconocidos. Aunque los sistemas no virales son menos efectivos, imitan muchas funciones biológicas de sistemas virales, pero difieren fundamentalmente de éstos en su composición, perfil terapéutico, bajos riesgos clínicos y seguridad.

La eficacia del envío de genes por sistemas no virales para terapia depende críticamente de una concentración ideal de ADNp en el tejido deseado. Además, para obtener una expresión específica de genes dirigidos a órganos blanco, otros problemas que se tienen que solucionar, algunos de ellos son: (a) mejorar la calidad y la cantidad de proteína que llega al sitio de acción (ya sea extracelular o intracelular) y, en consecuencia, la disminución de efectos adversos debido a la administración de fármacos no específicos al tejido blanco, (b) la protección de la proteína y la mejora de su estabilidad *in vivo*; y (c) prolongar el tiempo de residencia de drogas en su sitio de acción. Además, los sistemas no virales se pueden emplear para proporcionar orientación pasiva o activa (Yamamoto *et al.*, 1997).

Recientemente la nanotecnología ha tenido un impacto significativo en muchas áreas principalmente en el área de la medicina. La nanomedicina se ocupa en aplicar la nanotecnología en tratamientos, diagnóstico, monitoreo y control de sistemas biológicos. El uso de materiales a nanoescala proporciona la libertad para modificar propiedades fundamentales como son: solubilidad, difusividad, características de liberación de fármacos y vida media en circulación sanguínea, así como la inmunogenicidad, proporcionando más eficiencia y/o más vías de administración convenientes, menor toxicidad terapéutica, extendiendo el ciclo de vida del producto, y finalmente reducción de los costos de salud. Sin embargo el mayor reto es el de diseñar nanopartículas (NP) como sistemas de envío, con el poder controlar el tamaño, las propiedades de superficie y la liberación de agentes farmacológicamente activos, para lograr la acción en el sitio específico de la droga y a la dosis óptima (Langer R., 2000).

En las últimas dos décadas, se han desarrollado diversas nanopartículas a base de agentes terapéuticos y de diagnóstico para el tratamiento del cáncer, la diabetes, el dolor, asma, alergia e infecciones (Zhang L *et al.*, 2008). En la actualidad, más de 20 terapias de nanopartículas están en uso clínico, así como su validación para mejorar el índice terapéutico de los fármacos.

2.5 Nanopartículas de quitosán

Junto con el desarrollo de nuevas tecnologías para la administración de fármacos, la inversión para la mejora de los materiales aplicados al diseño de los sistemas es un tema muy importante. La seguridad del adyuvante utilizado para desarrollar acarreadores para la entrega de proteínas tiene que ser determinada, así como las cuestiones locales relacionadas a irritación y toxicidad a largo plazo, la acumulación y la inmunogenicidad (Heinneman L *et al.*, 2000).

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

En 1995, Mumper *et al.* Propusieron el uso del quitosán para envío dirigido de ADN. Desde entonces ha sido ampliamente investigado en la industria farmacéutica,

especialmente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos y comercialmente en la manufactura de parches cicatrizantes. Este es el segundo polisacárido natural más abundante en la tierra. Debido a sus características favorables como buena biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad antimicrobiana y capacidad de cicatrización, así como un gran número de aplicaciones (Kumar R and Hudson S., 2008).

El quitosán es un aminopolisacárido derivado de la quitina aislada de los desechos de crustáceos y es obtenido a escala industrial por un proceso denominado “N-desacetilación termoalcalina”. Químicamente la quitina consiste de unidades repetitivas de glucosamina y N-acetil-glucosamina, las cuales determinan el grado de desacetilación del polímero. No es tóxico, es hidrofílico, biocompatible, biodegradable, anti-bacterial y tiene una gran afinidad por muchas biomacromoléculas. Las nanopartículas de quitosán representan una alternativa para el envío de péptidos, proteínas, antígenos, oligonucleótidos y genes, con una alta capacidad de carga de medicamentos. Otro aspecto importante de éste biopolímero es que posee propiedades mucoadhesivas (Paños *et al.*, 2006) y ha sido aplicado en liberación de drogas con una dosis controlada (Kavaz *et al.*, 2008).

En los últimos años, el estudio del quitosán se ha centrado sobre todo en mejorar la liberación y la absorción de las llamadas biomoléculas terapéuticas, como son los fármacos proteicos. Existen resultados contradictorios sobre la mayor eficiencia ya sea en solución, en polvo o en forma de nanopartículas en la liberación *in vivo* (Agnihotri *et al.*, 2004). En general, se ha visto que la eficiencia de la absorción de macromoléculas en mucosas utilizando nanopartículas de quitosán como vehículo de encapsulación es inferior a la obtenida con formulaciones en solución o en polvo (Dyer *et al.*, 2002).

Para un eficiente y versátil envío de genes, las propiedades fisicoquímicas de complejos de ADN, como el tamaño y el potencial zeta son importantes. En el caso de quitosán como mediador de envío de genes, dichas características dependen del radio (el número de nitrógenos de quitosán por fosfato de ADN), las condiciones de preparación (pH), peso molecular, y el grado de desacetilación (DDA) (Hai-Quan Mao *et al.*, 2001).

Las características fisicoquímicas y distribución subcelular de los complejos de quitosán/ADN han sido investigadas para entender el mecanismo bajo el cual se lleva a cabo la expresión transgénica. En general, se piensa que el tráfico intracelular de complejos de ADN ocurre por endocitosis, seguido por una expresión del endosoma, transporte nuclear y transcripción. Primero el complejo quitosán/ADN se absorbe en la superficie celular por medio de interacciones electrostáticas y entran a la célula por endocitosis. Microscopía electrónica de transferencia y microscopía de láser confocal (CLMS) han revelado la distribución de complejos de ADN y quitosán en endosomas (Hashimoto *et al.*, 2005).

Específicamente las nanopartículas a base de quitosán se forman de acuerdo a una aproximación de tipo 'bottom-up' como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas el fármaco puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida (Goyccolea *et al.*, 2008). Existen varios métodos de preparación de nanopartículas de quitosán, las más utilizadas son, la de gelación iónica y la de coacervación. Estos métodos ofrecen ventajas como la simplicidad del método y evitar la utilización de solventes orgánicos, además pueden ser aplicables a una gran categoría de drogas (Krishna A *et al.*, 2010).

Los sistemas de liberación a base polímeros biodegradables necesitan ser entrecruzados para modular sus propiedades y mantener la estabilidad de la matriz y así cumplir el objetivo de liberar el fármaco a lo largo del tiempo deseado. El quitosán, como se ha comentado, se disuelve en condiciones ácidas, lo que limita su aplicación como sistema de liberación. El entrecruzamiento puede reducir la solubilidad del quitosán en solventes acuosos, aumentar su resistencia a la degradación química o biológica y ayudar a controlar la liberación de principios activos desde la matriz formada (Muzzarelli R., 2009).

El tripolifosfato sódico (TPP) es un agente entrecruzante no tóxico (reconocido como GRAS por la FDA) que es capaz de formar geles al unirse con el quitosán por interacción iónica. Desde que Bodmeier *et al.* (1989) Describieron la preparación de

complejos quitosán/TPP, la formación de complejos entre estas moléculas con cargas opuestas para obtener formulaciones que controlan la liberación de fármacos ha ganado interés puesto que se trata de un proceso muy simple. El mecanismo de la formación de nanopartículas de quitosán está basado en las interacciones electrostáticas entre los grupos amino de éste y las cargas negativas del grupo de un polianión como el tripolifosfato (TPP) (Fig.2). Ésta técnica ofrece un método simple y sencillo de preparación en un ambiente acuoso, la reacción que se produce ha sido descrita en la bibliografía (Ko J *et al.*, 2002; Mi F *et al.*, 1999). Primero el quitosán puede ser disuelto en ácido acético en ausencia o presencia de su agente estabilizante, después se añade al TPP y las nanopartículas se forman espontáneamente bajo agitación a temperatura ambiente.

El tamaño y la superficie de carga de las nanopartículas pueden ser modificados cambiando el radio del quitosán. Por su parte la Coacervación es un proceso durante el cual una solución homogénea de cargas líquido-líquido se somete a separación de fases, dando lugar a una fase rica densa en la parte inferior y una solución transparente arriba (sobrenadante). Estas dos fases líquidas son incompatibles y están en equilibrio. En una simple coacervación polielectrolítica, la adición de sal o alcohol normalmente promueve la coacervación (Biswaranjan M *et al.*, 2005).

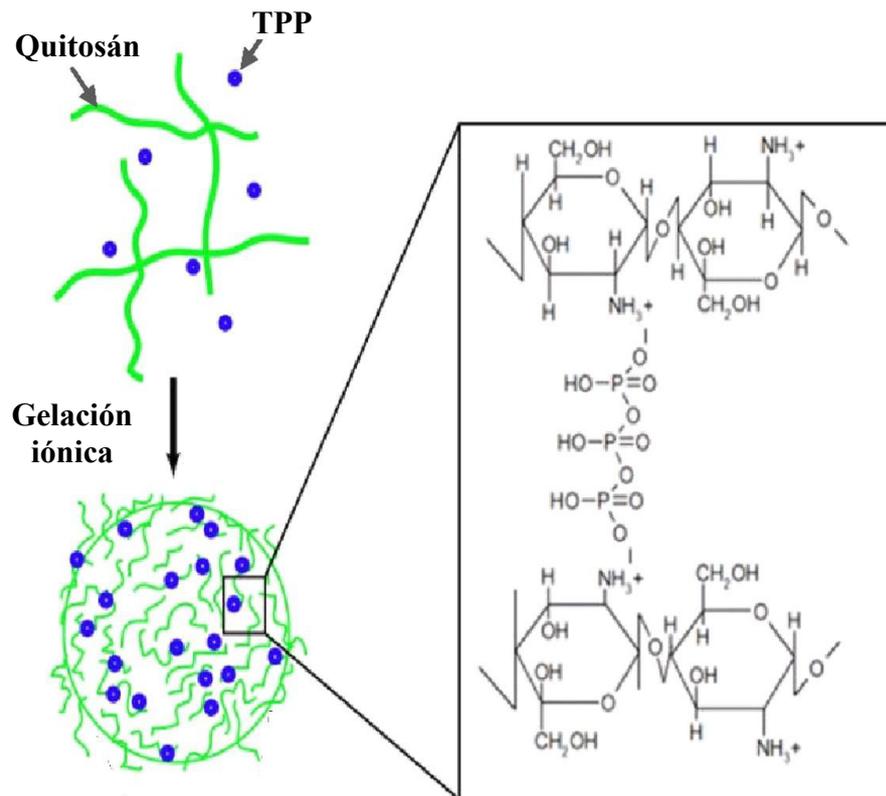


Fig.2. Representación del proceso de gelación iónica entre quitosán y TPP

2.6 Nanopartículas magnéticas

Desde que Freeman *et al* propuso la idea de que las partículas de hierro pueden ser transportadas por el sistema vascular y ser concentradas en alguna parte del cuerpo con la ayuda de un campo magnético, el uso de las nanopartículas magnéticas para envío de drogas o anticuerpos hacia órganos o tejidos alterados por alguna enfermedad se ha vuelto un campo atractivo de estudio. El uso de éstas para transfección es denominado “magnetofección”, la cual se basa en el acoplamiento de material genético a nano partículas magnéticas o acarreadores (Plank C *et al.*, 2003, Scherer F *et al.*, 2002). Esto fue demostrado por primera vez *in vitro* en células C12S y también se demostró *in vivo* en ratones utilizando el virus adenoasociado (VAA) ligado a microesferas magnéticas. Desde éstos estudios iniciales la eficiencia de dicha técnica, también llamada “magentofección” ha sido demostrada en una gran variedad de células (Dobson, 2006).

Los vectores magnéticos pueden transfectar genes en células con la ayuda de fuerza magnética. El gen/ADN y nanopartículas magnéticas son envueltas dentro de los vectores y estos lo liberan cuando son transportados en las células y después los genes son dirigidos al núcleo (Fig.3). Esta técnica incrementa hasta cien veces más la expresión del transgene que la técnica convencional (Chan P *et al.*, 2007) En aplicaciones dentro del campo de la biomedicina es necesario que las nanopartículas presenten un carácter superparamagnético donde no exista magnetización remanente una vez que se retira el campo magnético (Colombo et al., 2012). Las NPM sólo se “transforman” en magnéticas en presencia de un imán externo y retornan a su estado no magnético al retirar este. Esto evita la presencia de un momento magnético neto en las nanopartículas en ausencia de campo magnético.

In vivo, campos magnéticos enfocados sobre el objetivo deseado tienen un gran potencial, no solo para hacer llegar el gen terapéutico hacia un órgano o sitio específico dentro del cuerpo, si no para mejorar la transfección ya que los magnetos externos capturan las partículas cuando avanzan a través del flujo sanguíneo, una vez capturadas por el campo, las partículas son sostenidas en el sitio específico, donde son tomadas por el tejido (Fig.4) (Kavaz *et al.*, 2008) (McBain *et al.*, 2008).

Los métodos de transfección de nanopartículas magnéticas están basados en los principios que se establecieron en los 70's por Widder y cols. El uso de micropartículas magnéticas para transfección fue reportado por primera vez en el 2000 por Mah Catryn, Barry Byrne *et al.*, de la Universidad de Florida, mediante experimentos *in vitro* en células C12S y también *in vivo* en ratón utilizando el virus adenoasociado (VAA) ligado a microesferas magnéticas. Desde estos estudios iniciales se demostró la eficiencia de esta técnica, llamada “magnetofección” como se se ha comprobado que funciona en una gran variedad de células, ya que se basa en el acoplamiento de material genético a partículas nanomagnéticas (Dobson, 2006).

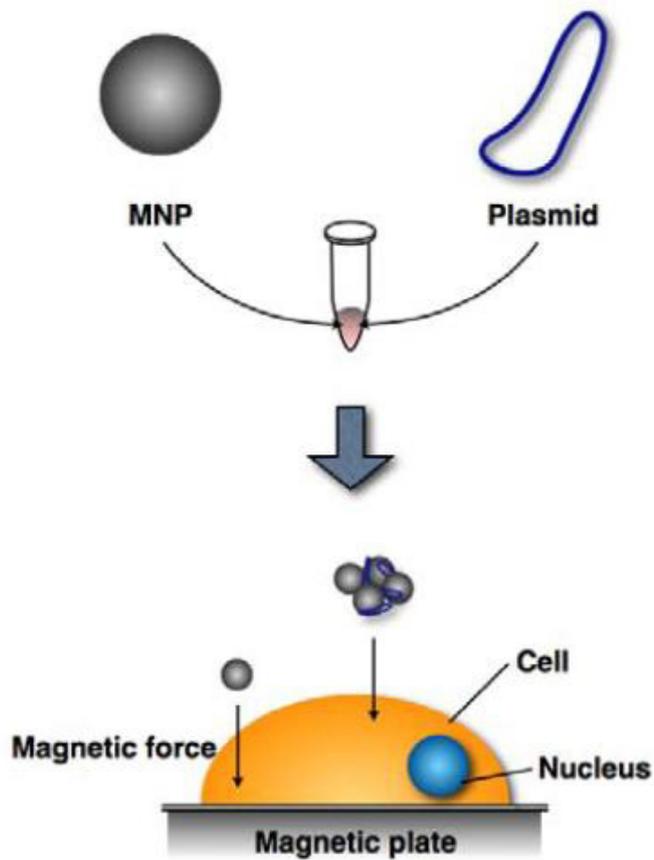


Fig. 3. Nanopartículas magnéticas para transfección de genes.

Tomada de: *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 3705-3722; doi:10.3390/ijms12063705

Debido a que se adjunta la nanopartícula al agente terapéutico y que estos se inyectan en el torrente sanguíneo, generalmente se utiliza un catéter en la posición del sitio de inyección cerca del objetivo para optimizar su efecto. De igual forma, los campos magnéticos, se enfocan encima del objetivo y las nanopartículas son capturadas y extravasadas al sitio deseado gracias al campo magnético (McBain *et al.*, 2008).



Fig. 4. Magnetofecciones *in vivo*

In vivo, la estrategia de enfocar los campos magnéticos sobre el objetivo deseado tiene un gran potencial no solo para mejorar la transfección, sino para hacer llegar al gen terapéutico hacia un órgano o sitio específico dentro del cuerpo. Además se pueden emplear magnetos externos son utilizados para capturar las partículas que vayan fluyendo en el flujo sanguíneo, ya que una vez capturadas por el campo, las partículas son sostenidas en el sitio específico, donde son tomadas por el tejido canceroso. Grief y Richardson concluyeron que las nanopartículas magnéticas utilizadas en el envío de drogas o genes, son más efectivas en sitios que están cerca del campo magnético (Dobson, 2006).

En la última década del siglo XX, comienza la aplicación en seres humanos de productos basados en NPM de óxido de hierro. El hierro como material presenta ventajas significativas para su uso en biomedicina: puede ser metabolizado por el organismo, la superficie de las NPM de óxido de hierro puede ser modificada para unir biomoléculas de interés, las partículas posean un elevado momento magnético y pueden ser manipuladas con un imán externo puesto que las líneas de campo pueden atravesar el cuerpo humano (Pankhurst et al., 2003).

Debido a su composición electrolítica los seres vivos por lo general son buenos conductores de electricidad. A través de las membranas celulares y de los fluidos corporales intra y extracelulares existen corrientes iónicas, especialmente en las células nerviosas y musculares a las cuales debe estar asociado un campo magnético. Además en los sistemas biológicos existen estructuras magnéticamente influenciadas como los radicales libres que presentan propiedades paramagnéticas y aquéllas en las

que intervienen sustancias ferromagnéticas. La respuesta de un sistema biológico a un campo magnético externo depende de las propiedades magnéticas intrínsecas del sistema (Lin *et al.*, 1999).

En el caso de la “magnetofección”, el gen es adjuntado directamente a la partícula magnética o acarreador. Estas partículas generalmente consisten de óxido-hierro magnético, cualquiera dispersado dentro de un polímero o caparazón metálico. Recientemente las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro han tenido una gran atención debido a su gran uso como materiales magnéticos así como su agente contraste imagen de resonancia magnética (IRM), pero la toxicidad de estas restringe el uso de estos materiales en humanos. Por lo tanto, muchas investigaciones se han enfocado en la encapsulación de partículas nano magnéticas con poliésteres como poliglicólico (PGA), y polímeros como el quitosán, porque ellos tienen propiedades biocompatibles y biodegradables así como baja toxicidad (Jong-Ryul *et al.*, 2004).

2.7 Promotores activados por campos magnéticos

Uno de los problemas a resolver en el envío de genes es la producción eficiente y protección de la proteína. Actualmente la mayoría de los plásmidos comerciales para la expresión de proteínas, utilizan el promotor de citomegalovirus (CMV), que induce expresión fuerte y constitutiva de en una variedad de tipos de células.

En su contexto natural, los promotores virales fuertes son requeridos para una propagación viral eficiente y frecuentemente inducen niveles más altos de transcripción que los promotores eucarióticos, pues utilizan mecanismos de control y reclutación en la maquinaria de transcripción del huésped. Más aun, por necesidad tienden a ser mucho más compactos y por tanto, más fáciles de manipular y acomodar en vectores de terapia génica. Algunos de los promotores más utilizados son el virus del simio 40 (SV40), repeticiones terminales largas del virus del Sarcoma Rous (RSV-LTR) y otros promotores retrovirales LTR.

Debido a su composición electrolítica los seres vivos por lo general son buenos conductores de electricidad. A través de las membranas celulares y de los fluidos

corporales intra y extracelulares existen corrientes iónicas, especialmente en las células nerviosas y musculares a las cuales deben estar asociadas a un campo magnético. Además, en los sistemas biológicos existen estructuras magnéticamente influenciadas, como los radicales libres, que presentan propiedades paramagnéticas y aquéllas en las que intervienen sustancias ferromagnéticas. La respuesta de un sistema biológico a un campo magnético externo depende de las propiedades magnéticas intrínsecas del sistema (Lin *et al.*, 1999).

En el caso de los promotores activados por campo magnético, estos tienen múltiples efectos en los sistemas biológicos, incluyendo la modulación de iones y el flujo de proteínas a través de membranas, alteraciones en la replicación del ADN, cambios en transcripción de ARN, alteraciones en la respuesta de células a hormonas. Existen trabajos donde se observa que la exposición a campos magnéticos incrementa la transfección de células, esto fue demostrado *in vivo* utilizando un plásmido con un promotor inducible por un campo magnético (Heredia R *et al.*, 2010).

3. HIPOTESIS

La expresión de TRAIL en el tejido de cáncer pulmonar inducida mediante un promotor que se activa con un campo magnético externo y localizado selectivamente en el pulmón mediante nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán, induce apoptosis a niveles que pueden inhibir el desarrollo del tumor.

4. OBJETIVOS

4. 1 Objetivo general:

Inducir la expresión de TRAIL en el pulmón mediante un promotor activado por campo magnético, usando nanoacarreadores basados en nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán, que estimule el proceso de apoptosis a un nivel que pueden inhibir el desarrollo de tumores *in situ*.

4. 1. 1 Objetivos particulares:

- 1.- Obtención y caracterización del plásmido pCEM-TRAIL
- 2.-Producir las nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán y caracterizarlas.
- 3.- Evaluar la capacidad de transfección de las nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán y el plásmido pCEM-TRAIL en células B16F10 de melanoma murino.
- 4.- Evaluar el nivel de expresión del TRAIL en el tejido de cáncer pulmonar usando nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán.
- 5.- Evaluar los niveles de apoptosis inducidos por expresión TRAIL en tejido de cáncer pulmonar usando nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán.
- 6.- Determinar la capacidad de inhibir el desarrollo de tumores en el pulmón mediante la expresión del gen TRAIL usando nanoacarreadores basados en nanopartículas magnéticas y quitosán bajo la influencia de un campo magnético externo.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

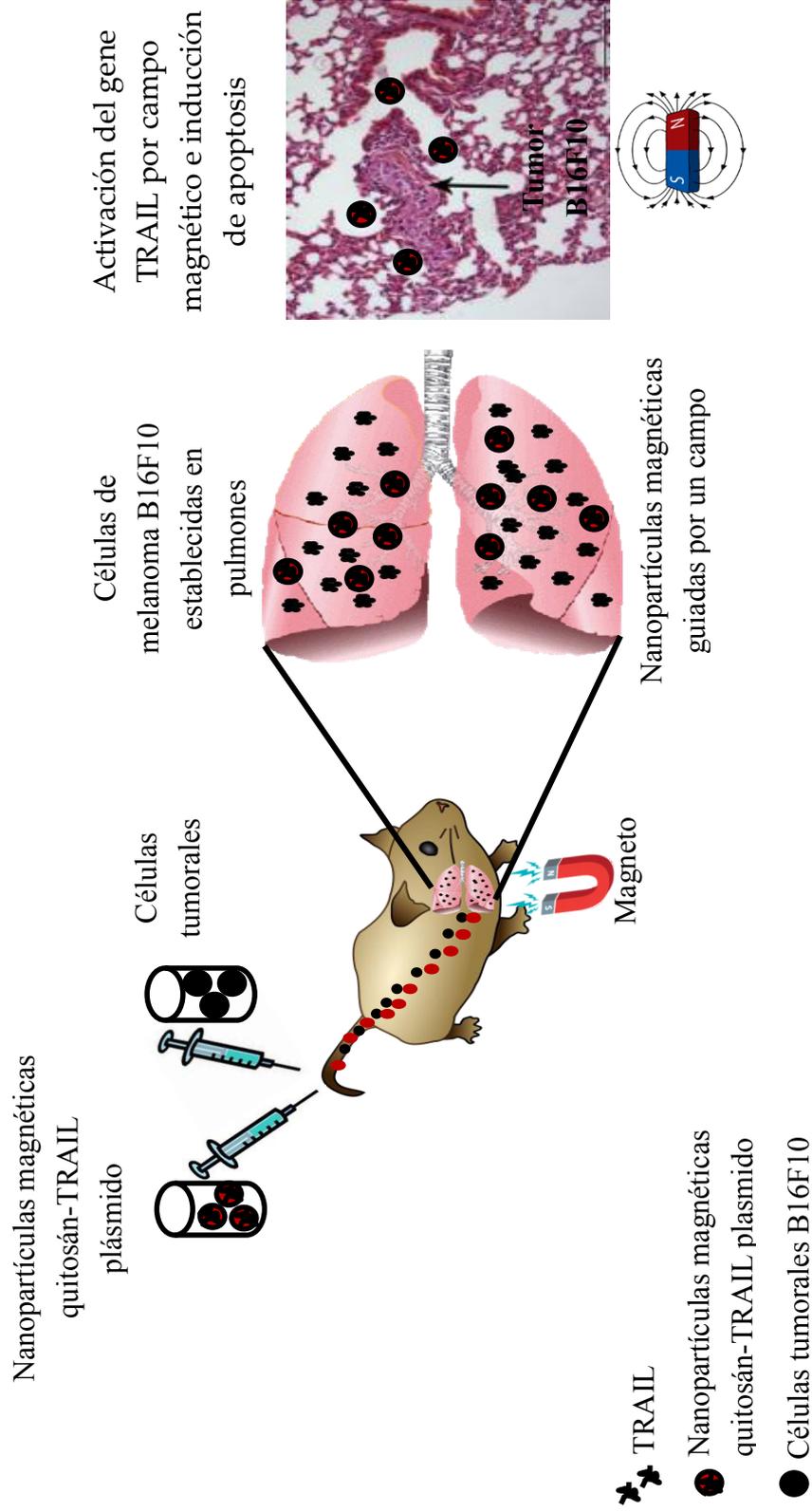


Fig.5. Representación esquemática del envío sistémico del gen TRAIL por nanopartículas magnéticas de quitosán y su activación por un campo magnético externo para inducir apoptosis en pulmones de ratón

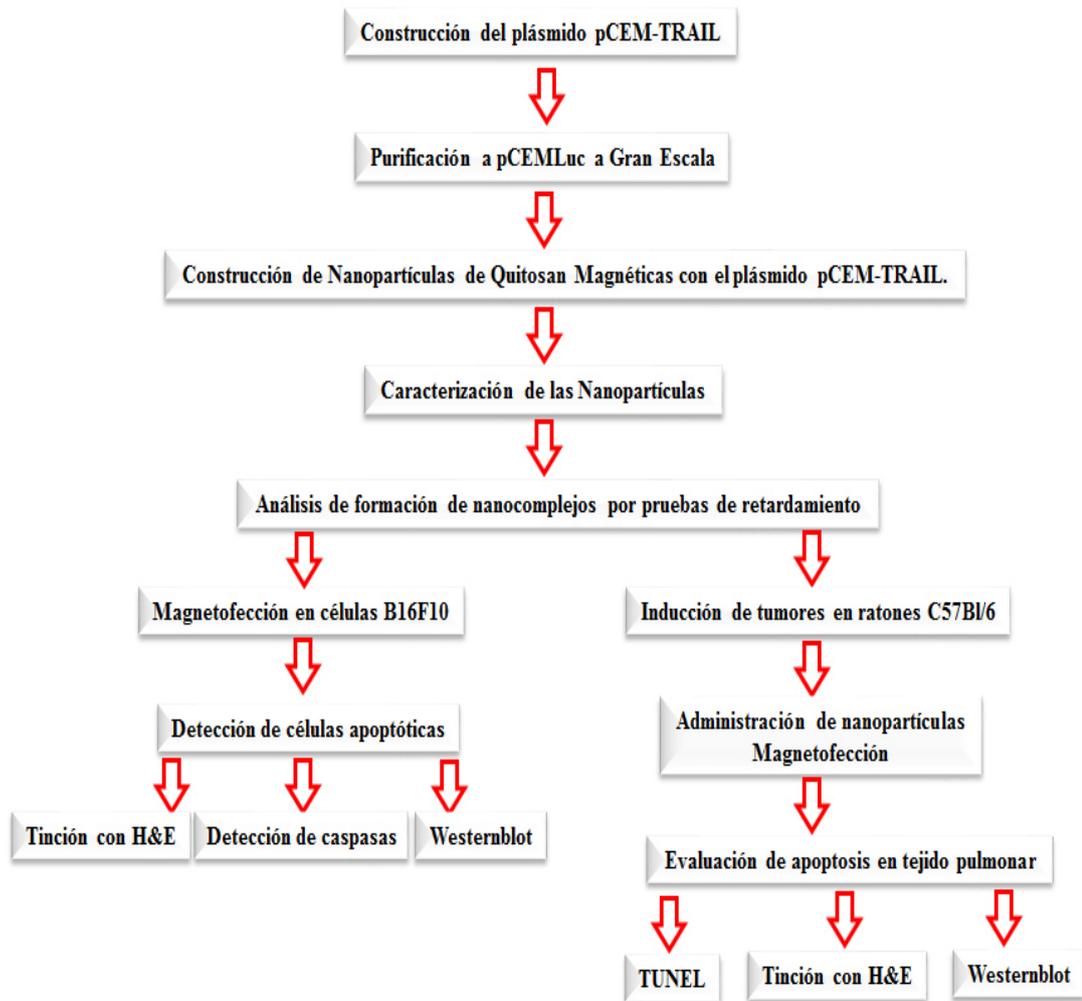


Fig.6. Diagrama de flujo de la metodología

6. MATERIALES

- Tripolifosfato de pentasodio (TPP) SIGMA®
- Quitosán soluble en agua de 20 kDa Coyotefoods®
- Nanopartículas magnéticas Combimag de Oz Biosciences®.
- DMEM NUTRIENT MIX F12 Invitrogen®
- OPTI MEM I Invitrogen®
- Suero fetal bovino Invitrogen®
- Tripsina Invitrogen®
- Antibiótico antimicótico Invitrogen®
- Kit para extracción de plásmido (Purelink plasmid mega reaction) Invitrogen®
- Buffer RIPA de Uniparts®
- Enzimas de restricción (HIND III, XbaI) Promega®
- Kit para prueba de TUNEL (DeadEnd fluorometric túnel system) Promega®
- Kit red staining para detección de caspasa 3 activa de abcam®
- Cubreobjetos con polyilisina Uniparts®
- pORF5-mTRAIL Invitrogen®
- Anticuerpo monoclonal Anti-TRAIL (ab9959 abcam)
- Kit *in vivo* magnetofection (Oz Biosciences®)
- Plásmido pCEM-LUC obtenido y caracterizado en el laboratorio de Inmunología y Virología
- Plásmido pORF-mTRAIL (InvivoGen) San Diego, CA92121 – USA
- Células B16F10 de melanoma murino obtenidas del laboratorio de Inmunología y Virología
- 30 ratones machos C57BL/6 de 4-5 semanas obtenidos de laboratorios Harlan, México DF.
- Hemocolorante rápido (Hematoxilina y eosina) HYCEL®
- PBS pH 7 Invitrogen®

7. METODOLOGÍA

Se obtuvo el vector pORF5-mTRAIL (Fig.7) a partir del cual se amplificó el fragmento correspondiente a TRAIL de 917 pb mediante una reacción de PCR de gradiente utilizando los siguientes oligonucleótidos: Forward - AAGCTT CATGGCTCCTTCCTCAGGGG y Reverse: TCTAGA TTA GTT AAT TAA AAA GGC TCC. Se preparó la siguiente reacción:

Reactivo	Cantidad
pORF-mTRAIL	1 µl
Master mix	12.5 µl
Oligo forward	1 µl
Oligo reverse	1 µl
H ₂ O	9.5 µl
Total	25 µl

Se colocó en el termociclador en el siguiente programa:

4 min 94°C

20 s 97°C

30 s (54°, 57°, 60°, 63° y 66°C)

7 min 72°C

Por 30 ciclos.

El producto de esta amplificación se corrió en un gel de agarosa al 0.8%, se cortó la banda obtenida y se purificó utilizando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHERY NAGEL) mediante el siguiente protocolo:

- Se mezclaron 100 mg de gel de agarosa con 200 µl de buffer NTI y se incubó durante 2-3 min hasta que el gel estuviera completamente disuelto.
- El gel disuelto se pasó por una columna PCR clean-up y se centrifugó por 30 s a 11,000 g y descartar el sobrenadante.

- Se añadieron 700 μ l del buffer NT3 para lavar la columna, se centrifugó por 30 s a 11,000 y se tiró el sobrenadante.
- Se agregaron 15-20 μ l de buffer NE y se incubó a 25°C por 1 min . Se centrifugó 1 min a 11,000 g.

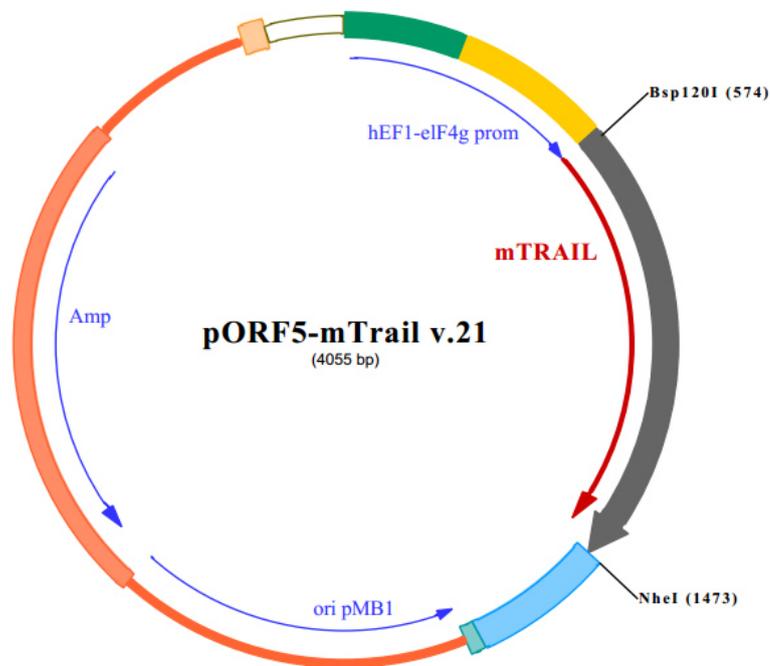


Fig.7. Mapa del vector pORF5-mTRAIL

Una vez que obtuvimos el fragmento de interés se clonó en el vector pGEM-T Easy, para posteriormente, realizar una digestión con las enzimas de restricción, en este caso XbaI y HIND III.

A continuación se procedió a hacer una digestión a pCEM-LUC (Fig.8) para despojar la luciferasa del vector utilizando las enzimas de restricción XbaI y HIND III mediante la siguiente reacción:

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	17.8 µl
Multicore	3 µl
BSA	1 µl
HIND III	3 µl
XbaI	3 µl
DNA	2.2 µl
Total	30 µl

Finalmente se realizó una ligación entre el fragmento TRAIL de 917 pb y pCEM de 3311 pb mediante la siguiente reacción:

Reactivo	Cantidad
Buffer	5 µl
Ligasa	1 µl
Vector	1 µl
Fragmento TRAIL	5 µl
H ₂ O	8 µl
Total	20 µl

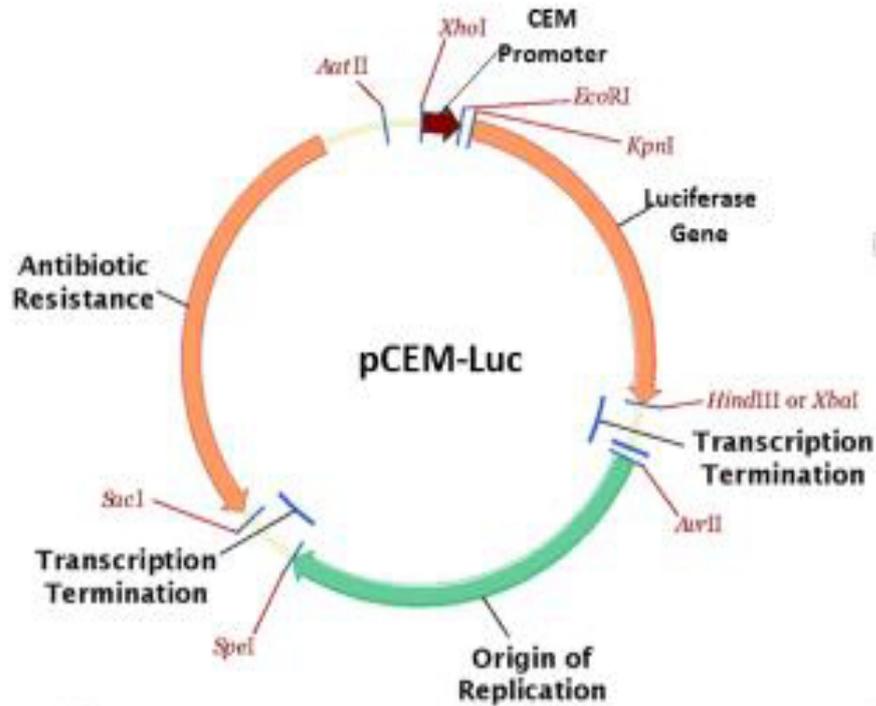


Fig.8. Mapa del vector pCEM-Luc

7. 1 Transformación de bacterias competentes (DH5 α , Invitrogen)

Una vez obtenido el vector de nuestro interés, se procedió a transformar bacterias competentes, para que una vez introducido en ellas, poder obtener un número elevado de copias del mismo. Para la transformación se empleó el siguiente protocolo:

- Descongelar en hielo una alícuota de DH5 α de 50 μ l
- Añadir de 1 a 5 μ l de ADN (1-10 ng) a las células y mezclar con cuidado. No pipetear.
- Incubar las células en hielo durante 30 minutos.
- Colocar las células a 42°C por 1 minuto.
- Poner los tubos en hielo por 2 minutos.
- Adicionar LB estéril sin ampicilina.
- Incubar 1 hora a 37°C.
- Plaquear 100 μ l en Agar-LB con ampicilina.

7.2 Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (Miniprep)

Para obtener una pequeña cantidad de ADN plasmídico que nos sirva para comprobar las características del plásmido, crecimos una colonia de bacterias en 5 ml de LB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche, con agitación constante de 225 rpm y a 37°C. Para la purificación del ADN plasmídico a pequeña escala empleamos el siguiente protocolo:

- En la cámara de bacterias llenamos en un tubo eppendorf con el medio de cultivo en el que han crecido las bacterias toda la noche. Centrifugamos durante 2 minutos a 13000 rpm. Tiramos el sobrenadante
- Añadimos al pellet 100 µl de solución I (solución de re suspensión) y re suspendemos con una pipeta.
- Añadimos 200 µl de solución II (solución de lisis) y mezclamos invirtiendo el tubo varias veces.
- Añadimos 150 µl de solución III (solución de neutralización), mezclamos y centrifugamos durante 2 minutos a 13000 rpm.
- Pasamos el sobrenadante a tubos limpios.
- Añadimos 400 µl de Miniprep Express matrix, asegurándonos de agitarla completamente antes y mezclamos los tubos.
- Centrifugamos 10 segundos y tiramos sobrenadante
- Añadimos 500 µl de etanol al 70% y re suspendemos el precipitado agitando.
- Centrifugamos 10 segundos el sobrenadante.
- Dejamos secar el paquete para que el etanol se evapore.
- Se re suspende el precipitado seco en 50 µl de TE con RNAsa (20 µg/ml) con una pipeta.
- Centrifugamos por 1 minuto y pasamos el sobrenadante con el ADN a un tubo nuevo

7.3 Purificación de pCEM-TRAIL a gran escala

Para obtener grandes cantidades de plásmido que utilizamos para los experimentos de transfección, utilizamos el aislamiento a gran escala. Para ello, se hizo un pre cultivo a partir de una colonia de bacterias (o a partir de bacterias congeladas que contienen el plásmido) en 6 ml de LB más el antibiótico correspondiente, durante unas 6-12 horas, en agitación constante (225 rpm) y a 37°C. Este pre cultivo se pasó a un volumen mayor, normalmente unos 250 ml de LB más el antibiótico correspondiente que se dejó crecer toda la noche a 37°C y en agitación constante (225 rpm) para permitir la aireación correcta del cultivo.

Para la purificación de grandes cantidades de plásmido, utilizamos un kit comercial (Invitrogene® Maxi Prep). El protocolo básico para este tipo de kits comerciales consiste en un paso de centrifugación, que formará un pellet con las bacterias que han crecido en el medio de cultivo. Este paquete celular se re-suspende en un volumen determinado de solución de re-suspensión. Tras esto, se procede con la fase de lisis bacteriana, que usa una solución de lisis alcalina (NaOH/ SDS) que romperá las bacterias liberando su contenido celular. Las proteínas, así como el ADN cromosómico y plasmídico, son desnaturalizadas bajo estas condiciones. El RNA es degradado por la RNasa libre de ADNasa. Posteriormente se añade una solución de neutralización, que contiene acetato potásico, lo que provoca una precipitación del SDS, arrastrando proteínas ADN cromosómico y otros restos celulares. Esta solución también neutraliza el lisado. El ADN plasmídico puede revertir a su forma súper-enrollada nativa y permanece en la solución.

Después de la lisis alcalina, se hizo pasar la muestra por unas columnas cromatográficas, a cuya resina el ADN plasmídico queda unido por afinidad y de donde fue eluido mediante un cambio de pH de 6.5 a 9.0. En estas condiciones alcalinas, la carga positiva de la resina de la columna es neutralizada y el ADN plasmídico es liberado. Es necesario un último paso de precipitación para eliminar restos de sales o alcohol que puedan interferir en reacciones posteriores en las que se puedan emplear los plásmidos.

La concentración del plásmido se calculó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm. La calidad del plásmido se comprobó corriendo las muestras en un gel de agarosa al 1%, lo que nos dio la información de la integridad estructural y

conformacional del ADN plasmídico aislado, por ejemplo, mostrando si en la muestra predomina la forma súper-enrollada, circular o lineal.

7.4 Producción de Nanopartículas Magnéticas de Quitosán con el plásmido pCEM-TRAIL

Las nanopartículas de quitosán fueron preparadas de acuerdo al procedimiento descrito por Calvo y cols., 1997, basado en la técnica de gelación iónica, en el cuál los grupos amino cargados positivamente del quitosán interactúan con los cargados negativamente del TPP. La formación espontánea de las nanopartículas ocurre debido a las uniones intra e intermoleculares entre las cargas positivas y negativas. El biopolímero disuelto en agua a una concentración de 2 mg/ml y el TPP a 0.86 mg/ml fueron puestos en contacto, la formación espontánea de las nanopartículas ocurrió después de incorporar 12 ml de la solución de TPP en 30 ml de solución de quitosán, bajo agitación a temperatura ambiente.

7.5 Caracterización de las nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán y plásmido pCEM-TRAIL atrapado

Para analizar si las nanopartículas están en óptimas condiciones para las transfecciones, las caracterizamos para saber su forma, tamaño, carga, capacidad de retención. Para ello se realizó lo siguiente:

7.5.1 Forma y tamaño por microscopia electrónica de transmisión

La distribución del tamaño de las partículas se determinó por medio de un analizador de difracción de rayos láser. La morfología superficial fue evaluada por microscopía electrónica de transmisión (MET). En breve una gota de las nanopartículas en suspensión se colocó sobre un portaobjetos, se fijaron y se observó su morfología. (Hritcu *et al.*, 2008).

7.5.2 Forma y tamaño por microscopía de fuerza atómica.

Antes de llevar las nanopartículas al microscopio, se diluyeron con agua bidestilada y se secaron sobre una mica, para ser analizada.

7.5.3 Medición del potencial zeta de las nanopartículas.

El potencial de las partículas se midió en un buffer de fosfatos (pH=6) en un sistema llamado Malvern Zetasizer ZS90 (Hritcu *et al.*, 2008).

7.5.4 Prueba de liberación de plásmido de las nanopartículas

El perfil de liberación de plásmido de las nanopartículas del complejo con quitosán se determinó de la siguiente manera: la carga de plásmido de las nanopartículas de quitosán separadas de una suspensión acuosa se pondrán en ADNasa y RNAsa en un tubo eppendorf con PBS a pH 7.4 y las muestras se almacenaran a 37°C con agitación. A tiempos determinados las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se reemplazó por medio fresco. La cantidad de plásmido liberada de las nanopartículas se midió en el espectrofotómetro a 260 nm (Curotto *et al.*, 1993).

7.6 Determinación del efecto de los complejos formados por nanopartículas magnéticas de quitosán para inducir la expresión del gene terapéutico TRAIL en la línea celular B16F10 de melanoma murino bajo la influencia de un campo magnético

Para observar el nivel de apoptosis *in vitro* inducido con los nanocomplejos que preparamos, realizamos una transfección en la línea celular B16F10 de melanoma murino.

7.6.1 Transfección (Magnetofección).

Antes de la magnetofección, se agregaron 6×10^4 células en placas de 6 pozos de 35 mm, y se incubaron las células a 37 °C en una atmósfera de CO₂ hasta obtener una confluencia celular de un 70-80%. Una vez preparados los complejos descritos conteniendo 1 µg de plásmido se agregaron, se incubaron de 10-15 min con una placa magnética a 37°C en la incubadora (Fig.9). Después de retirar la placa se dejaron incubando bajo condiciones estándar por un tiempo de 24 y 48 horas para los análisis posteriores. Los experimentos se realizaron por triplicado.



Fig.9.Placa magnetofectora

7.7 Detección de células apoptóticas

Para observar el nivel de apoptosis que causaron los nanocomplejos se utilizaron las siguientes técnicas:

ALTERACIONES
CITOMORFOLÓGICAS



- Hematoxilina/eosina



DETECCIÓN DE
CASPASAS



- Cuantificación actividad de caspasas
- Obtención proteína TRAIL por Western blot

Fig.10. Esquema sobre las pruebas que se harán al cultivo celular para detectar apoptosis

Observación de cambios morfológicos presentes en la muerte celular por apoptosis

7.7.1 Microscopía óptica

Para apreciar alteraciones o cambios cito morfológicos teñimos las células 24 y 48 horas después de haberlas transfectado con las nanopartículas utilizando los colorantes hematoxilina y eosina. Después observamos al microscopio óptico.

7.7.2 Detección de la activación de caspasas.

Se procedió a medir la expresión de caspasa- 3 que es un indicador temprano de apoptosis utilizando el kit Caspasa 3 (activa) kit de tinción rojo.

Este kit contiene un sustrato que contiene rodamina que al unirse a la parte activa de la caspasa 3 emite luz roja (Fig 11).

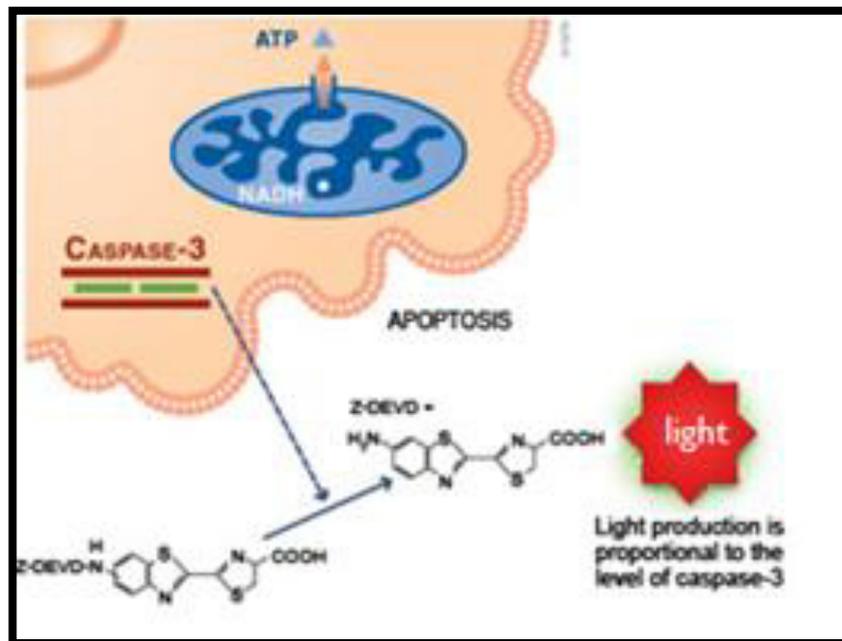


Fig.11.Mecanismo de detección de caspasa 3 activa por medio del kit de tinción rojo

Siguiendo el siguiente protocolo:

- Alicuotamos 300 μ l de células en tubos eppendorf
- Añadimos 1 μ l de rojo DEVD en cada tubo e incubamos de 30 a 16 min
- Centrifugamos las células a 3000 rpm por 5 min y eliminamos el sobrenadante
- Re suspendimos las células en 0.5 ml de buffer de lavado y centrifugamos
- Re suspendimos las células en 100 μ l de buffer de lavado y colocamos una gota de la suspensión celular en el portaobjetos y colocamos el cubreobjetos. Finalmente observamos al microscopio electrónico utilizando el filtro de rodamina.

7.8 Identificación la proteína TRAIL en las células B16F10 mediante extracción de proteínas y Western blot

7.8. 1 Extracción de proteínas

Una vez que las células se incubaron con las nanopartículas se retiró el medio de la placa y se agregaron 300 μ l de PBS por 30s para lavar las células. Después se agregaron 100 μ l de buffer de lisis a cada pozo y se incubó por 30 min a 4°C. Pasado este tiempo se colectaron las células en un tubo eppendorf para centrifugarlas a 10,000 rpm por 5min. El sobrenadante se pasó a otro tubo para almacenar a -70 °C hasta su cuantificación.

7.8. 2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford como se muestra en la Fig.12.

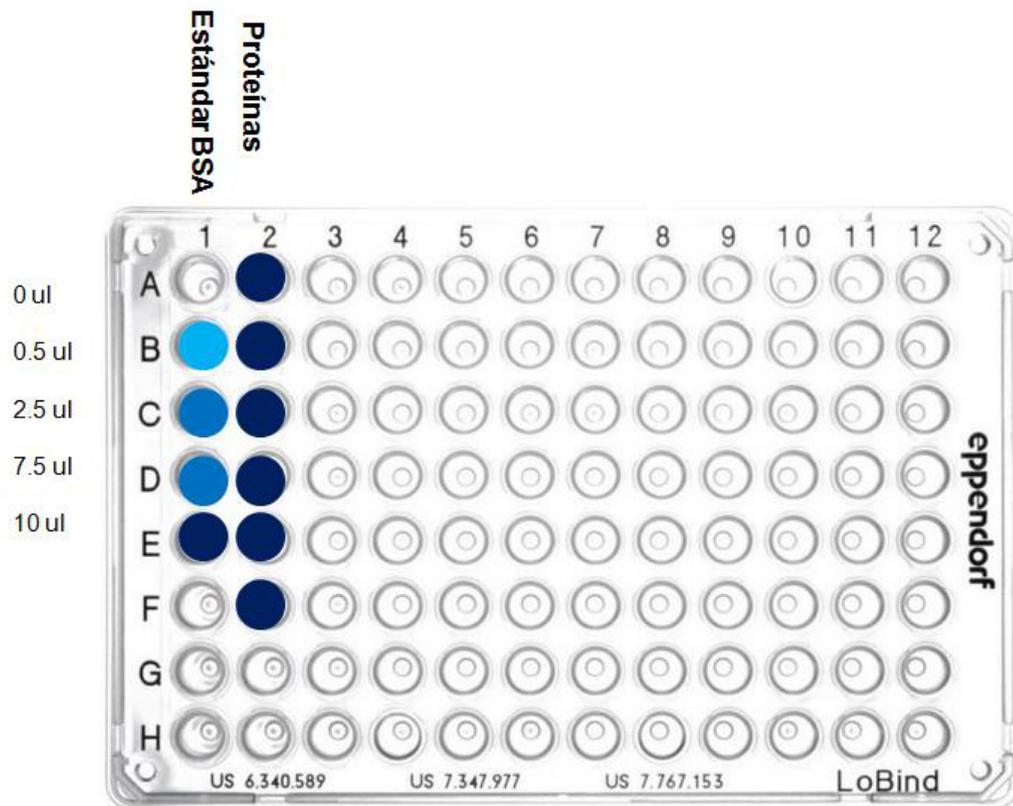


Fig.12. Cuantificación de proteínas en placa ependorf de 96 pozos

Una vez agregado el reactivo de Bradford la placa se incubó por 10 min a temperatura ambiente sin luz y se llevó al lector de placas a una absorbancia de 590 nm. Se calculó la concentración de las proteínas utilizando el programa Excel.

Ya obtenida la concentración de las proteínas tomamos 80 μ g de cada muestra, para realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% ya que el tamaño de la proteína TRAIL y como control β -actina es de 24 y 42 kDa.

Preparación de gel de poliacrilamida

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	3,3 ml
Acrilamida mix 30%	4 ml
SDS 10%	0.1 ml
PSA 10%	0.08 ml
TEMED	0.005 ml

El gel se corrió por a 300V 20 mA por 45 min y se utilizó un marcador pre-stained SDS page low range (Biorad). Pasado este tiempo se procedió a realizar una transferencia de proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa por 2.30 hr a 300 V 100 mA.

Se extrajo la membrana, se lavó 3 veces con TBS-tween .05% y se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS por toda la noche.

Al día siguiente se realizaron 4 lavados con TBS-tween .05% por 15 min cada uno y se incubó con el primer anticuerpo monoclonal Anti-TRAIL (ab9959 abcam) y B-actina en TBS por 2 hr y se volvieron a realizar los lavados para incubar con el segundo anticuerpo por 2 hr y finalmente revelar por quimioluminiscencia o colorimetría.

7.9 Determinación del efecto de los complejos formados por nanopartículas magnéticas de quitosán para inducir la expresión del gene terapéutico TRAIL en pulmón de ratón C57BL6 bajo la influencia de un campo magnético

7.9.1 Inducción de tumor en pulmón en ratones C57BL6

Un grupo de ratones de 7 a 8 semanas de edad (20-25g) fueron inyectados con 5×10^5 células de melanoma murino B16F10 la cuál ha sido reportada previamente por presentar metástasis a pulmón cuando es administrada vía intravenosa (Fig.13).

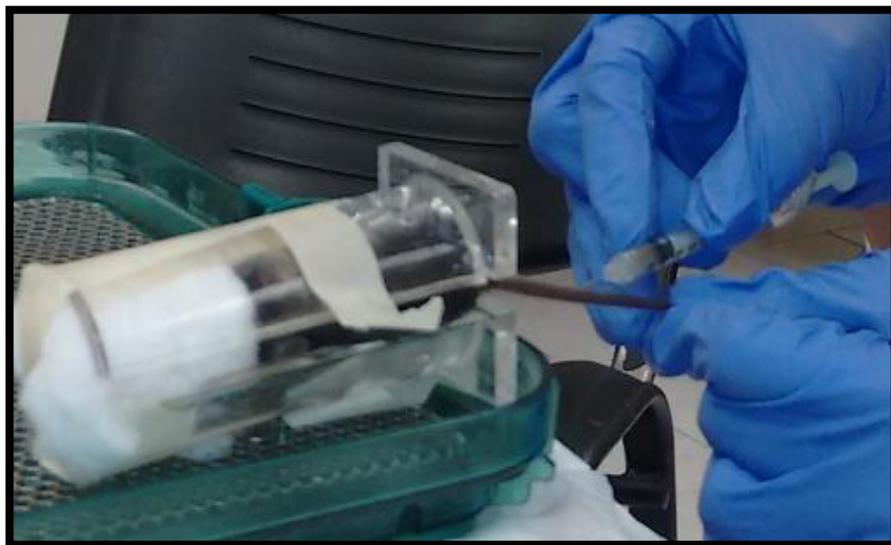
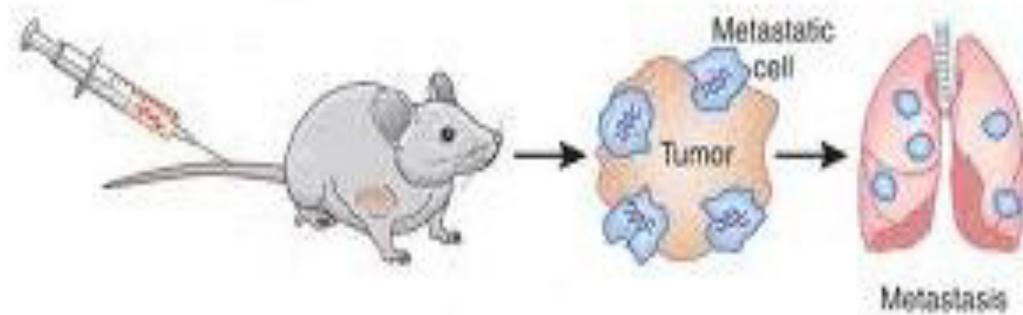


Fig.13. Administración de las células B16F10 en ratón vía vena caudal mientras se encuentra dentro de una caja especial inmovilizadora.

7.9.2 Administración de Nanopartículas a ratones C57B16 y Magnetofección

Tres días después de haber inyectado las células tumorales, se administraron los tratamientos a los diferentes de grupos de ratones incluyendo los controles (Fig.14) (Tabla I), vía vena caudal. Al momento de estar inyectando las nanopartículas se les colocó un magneto cuadrado formado por neodimio, hierro y boro (Tabla II), a la altura de la caja torácica por 10 minutos que es el tiempo establecido para el pulmón (Tabla III). Después se retiró el magneto y los ratones fueron colocados en sus cajas para monitorearlos y posteriores análisis.

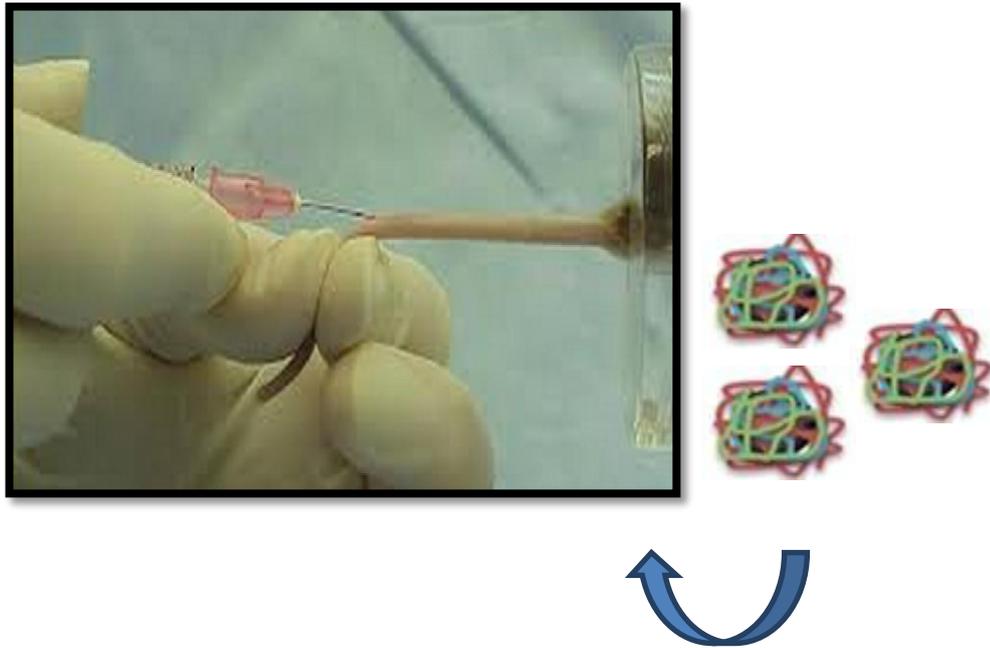


Fig.14. Administración de nanopartículas en vena caudal de ratones

Tabla I. Grupos experimentales de ratones

Modelo experimental	No. de animales por grupo
Control sano (PBS)	6
Control (Células B16F10)	6
Plásmido solo	6
Nanopartículas magnéticas + DogtorMag + magneto	6
Nanopartículas magnéticas + quitosán + plásmido + magneto	6

Se les administraron 50 μ g de plásmido por ratón.

Kind of magnet	Tissue
Extra Small Cylinder 2 mm (diameter) x 5 mm (height)	<ul style="list-style-type: none"> • Brain area • Endothelial cells • Small tumors • Lymph node • Ovary • Adrenal gland
Small Cylinder 5 mm (diameter) x 5 mm (height)	<ul style="list-style-type: none"> • Subcutaneous tumors • Salivary gland • Brain
Cylinder 10 mm x 5 mm (height)	<ul style="list-style-type: none"> • Subcutaneous tumors • Pancreas • Spleen
Square 17 mm (length) x 17 mm (length) x 5mm (height)	<ul style="list-style-type: none"> • Large organs • Large tumor • Muscle • Lung • Skin flap

Tabla II. Uso adecuado de magnetos *in vivo* obtenida del manual OZ Bioscience

Target tissue	Route of injection	Kind of magnet	Magnetic incubation
Tumor	Intravenous, Intra-arterial, Intratumoral	All kind	20 min to 1 h
Endothelial cells	Intravenous, Intra-arterial	Extra small Cylinder	5 min to 1 h
Heart	Intra-arterial	Cylinder	20 min
Liver	Intravenous	Cylinder, Square	10 min
Lung	Intravenous	Square	10 min
Pancreas	Intrapancreatic	Cylinder	20 min
Kidney	Intraperitoneal	Cylinder, Square	20 min
Gut	Ilea lumen	All kind	20 min
Stomach	Stomach lumen	Cylinder, Square	20 min
Brain	Intraventricular	Small Cylinder	5 min

IG

Tabla III. Tiempo de incubación magnético sugerido para varios tejidos

Se evaluó el tiempo de sobrevivencia de los ratones. Después se extrajeron los pulmones tratados y no tratados y se preservaron en formol para evaluar el nivel de apoptosis mediante diferentes técnicas (Fig.15).

8.10 Evaluación de apoptosis en tejido pulmonar después de la administración de nanopartículas mediante diferentes técnicas

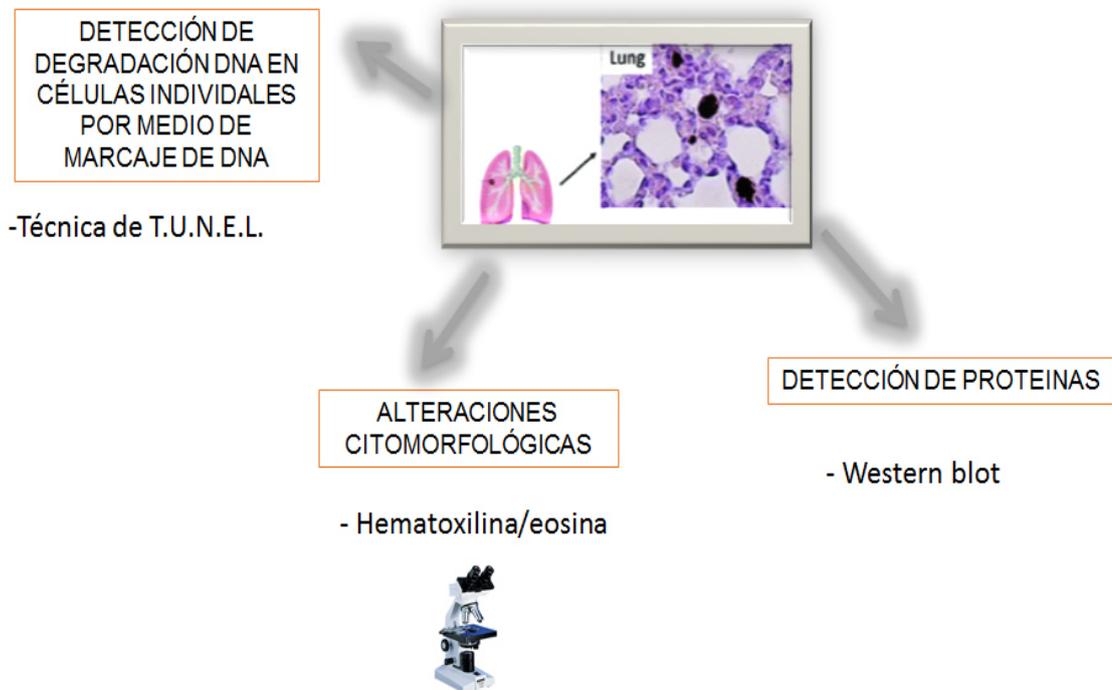


Fig.15. Técnicas utilizadas para observar apoptosis en tejido pulmonar

7.10.1.- Detección de alteraciones citomorfológicas en cortes de tejido pulmonar mediante tinción con hematoxilina y eosina

Se extrajeron los pulmones de ratones tratados y éstos se conservaron en formol para después realizar los cortes finos de tejido embebidos en parafina para la tinción con hematoxilina y eosina. Esto se realizó en colaboración con personal especializado en el departamento de patología del Hospital Universitario UANL. Una vez realizados los cortes se observaron al microscopio electrónico para análisis de morfología de las células del tejido.

7.10.2 *Detección de degradación de DNA en células individuales por medio de marcaje del DNA.*

Prueba de TUNEL_(transferase-mediated dUTP nick endlabelling). Para la realización de esta técnica se siguió el siguiente protocolo:

- 1.- Crecer las células B16F10 en portaobjetos
- 2.- Sumergir en 4% de metanol libre de formaldehído en PBS (pH 7.4) por 25 min a 4°C
- 3.- Realizar lavados por inmersión en PBS fresco por 5 min a temperatura ambiente
- 4.- Se removió el exceso de PBS y se cubrieron con 100µl de buffer de equilibrio por 10 min.
- 5.- Mientras las células se están equilibrando, se descongela el mix de nucleótidos en hielo y se prepara suficiente rTdT buffer de incubación de acuerdo a la tabla IV.

Tabla IV. Preparación de Buffer de incubación rTdT para reacciones y de control positivo

Componente del Buffer	Volumen Standard para 50 µl de reacción	Número de reacciones (experimentales+ controles positivos opcionales)	Volumen
Buffer de equilibrio	45 µl	x _____	= _____
Mix de nucleótidos	5µl	x _____	= _____
Enzima rTdT	1 µl	x _____	= _____
Volumen total de Buffer de incubación rTdT			= _____

- 6.- Agregar 50µl de buffer rTdT
- 7.- Cubrir las células con cubreobjetos para asegurar la distribución del reactivo e incubar por 60 min a 37°C
- 8.- Lavar las muestras sumergiéndolas en PBS fresco por 5 min a temperatura ambiente. Repetir 2 veces.

- 9.- Teñir las células por inmersión en 40 ml de solución de yoduro de propidio diluido a 1µg/ml en PBS por 15 min a temperatura ambiente.
- 10.- Lavar las células por inmersión en agua desionizada por 5 min a temperatura ambiente
- 11.- Analizar inmediatamente las muestras en el microscopio de fluorescencia.

El porcentaje de células apoptóticas se calculó mediante la siguiente metodología:

En un área de tejido de 2 mm² se cuantificaron las células fluorescentes vs las no fluorescentes. Solo tomando en cuenta las células neoplásicas. Este cálculo lo realizó personal especializado en patología del departamento de Anatomía Patológica y Citopatología de la Facultad de Medicina UANL.

7.11 Detección de la proteína TRAIL en tejido pulmonar

Para detectar la presencia de TRAIL en tejido pulmonar de ratones se siguió el siguiente protocolo:

- Homogenizar el tejido pulmonar en frío 10 mg de tejido por 1ml de buffer RIPA
- Centrifugar a 12'000 rpm, 4°C por 20 min y transferir el sobrenadante en un tubo nuevo.
- Almacenar a -20° C hasta su uso.

Una vez extraídas las proteínas se realizó un Western blot mediante la metodología antes descrita.

7.12 Evaluación de la sobrevivencia.

Los ratones se monitorearon para evaluar la sobrevivencia después de la administración de células tumorales y tratamientos con nanopartículas.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención y caracterización del vector.

Se amplificó el fragmento de la secuencia TRAIL a partir del vector pORF5-mTRAIL a diferentes temperaturas, éste consta de 917 pb (Fig.16) y se clonó en el vector pGEM-T Easy (Fig. 17).

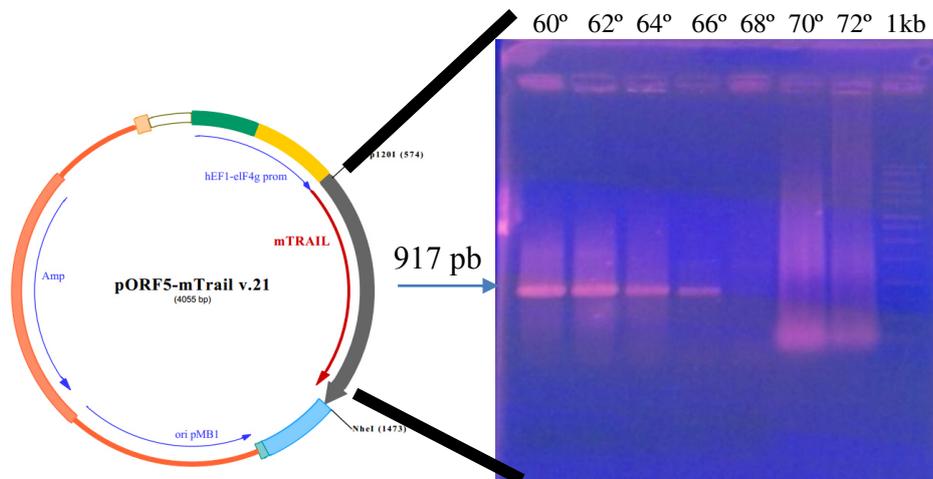


Fig.16. Amplificación de la secuencia TRAIL a diferentes temperaturas. Gel de agarosa carril 1 a 7 banda de TRAIL amplificada y carril 8 marcador de 1000 pb

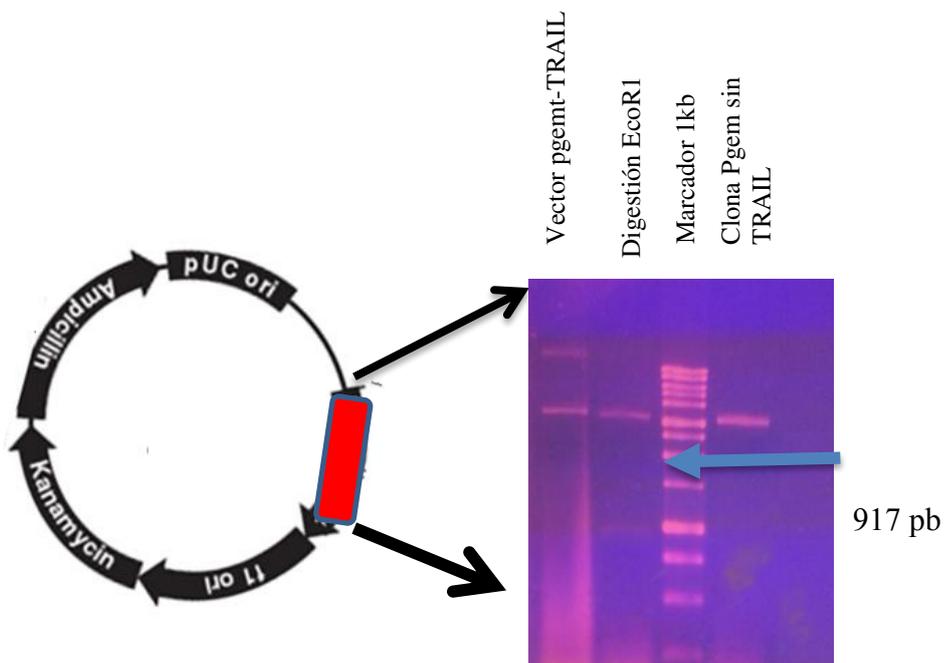


Fig.17. Fragmento TRAIL insertado en el vector de clonación pGEM-T Easy.

Después se obtuvo la secuencia del gen luciferasa a partir del plásmido pCEM-LUC (Fig. 18).

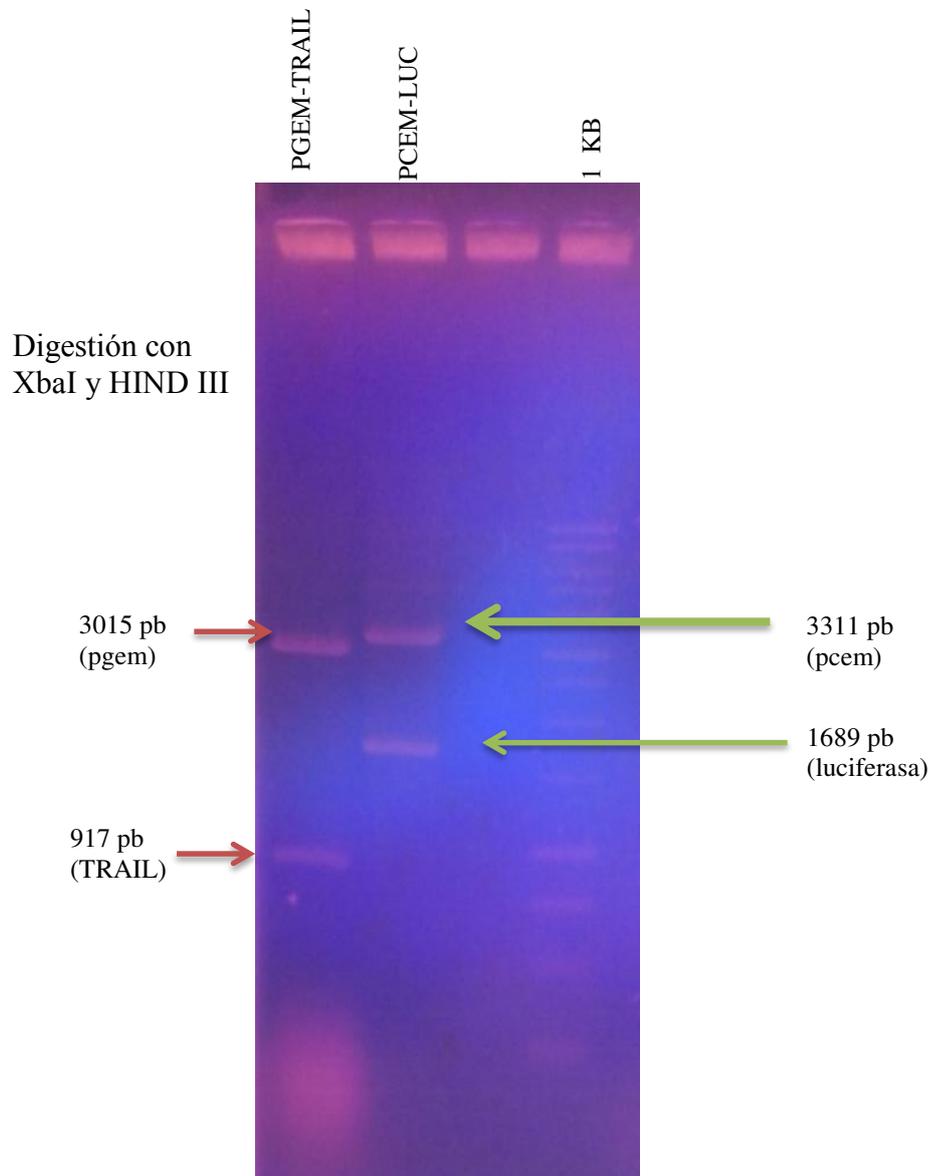


Fig.18. Gel de agarosa al 1% .En el primer carril se observa Pgem-TRAIL digerido y en el segundo las bandas correspondientes a pCEM y la de luciferasa.

Finalmente se ligó la secuencia de TRAIL en el vector pCEM y se obtuvo el vector pCEM-TRAIL con 4228 pb que fue el que utilizamos en nuestros experimentos.

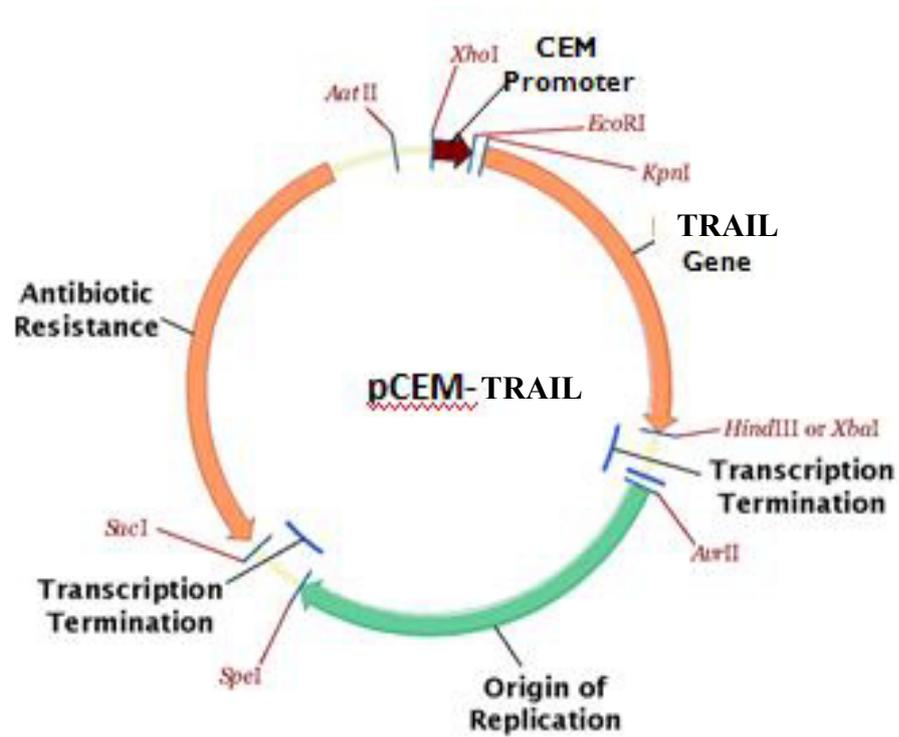


Fig. 19. Vector final pCEM-TRAIL.

8.2 Producción de nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán y caracterización

8.2.1 Forma y tamaño de nanopartículas

Una vez formados los complejos, se procedió a observarlos por microscopía electrónica de transmisión y fuerza atómica (Fig. 20 y 21).

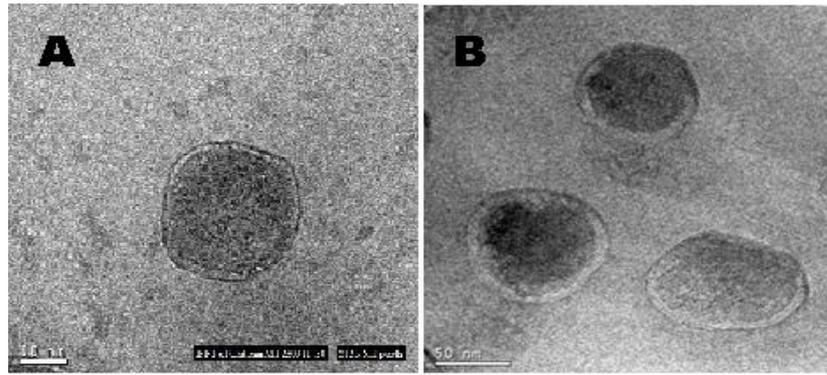


Fig.20. Imágenes de MET de las nanopartículas de quitosán producidas por el método de gelación iónica

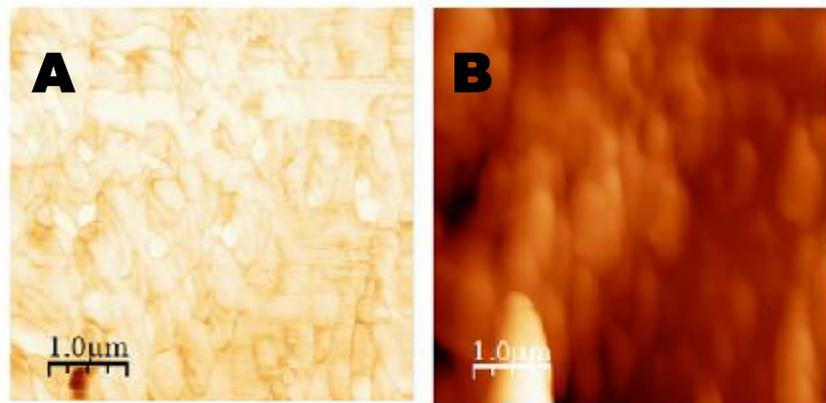
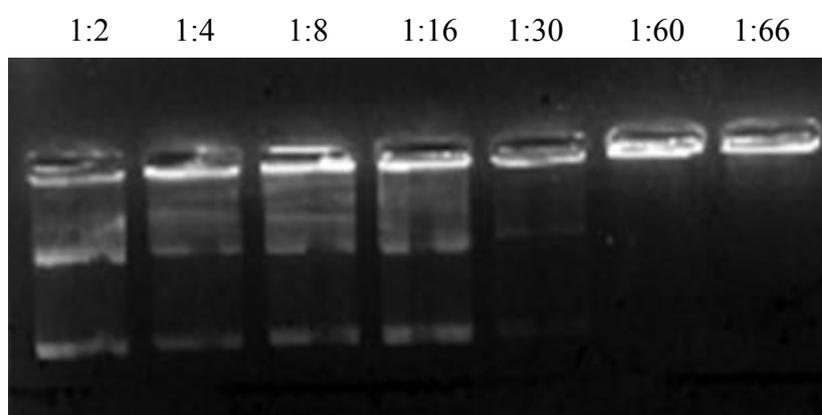


Fig. 21. Imágenes de MFA de los complejos con la nanopartícula magnética.

El tamaño de las nanopartículas es un parámetro clave que puede afectar sus propiedades. El tamaño puede influir tanto en la ruta de la captación celular como en la velocidad de absorción. (He *et al.*, 2010). Las nanopartículas más pequeñas pueden ser internalizadas mediante el mecanismo de pinocitosis como endocitosis mediada por clatrina o caveolas, mientras que las partículas más grandes son generalmente internalizadas vía macropinocitosis y/o fagocitosis en células especializadas. Se piensa que esto es debido a que el tamaño de las vesículas producidas por la endocitosis mediada por clatrina y caveolas tienen un tamaño límite, generalmente menor a 200 nm (Wang *et al.*, 2009). En contraste con el mecanismo por el cual las células internalizan fluido extracelular y otras sustancias por macropinocitosis se sugiere que partículas más grandes pueden ser internalizadas hacia las células por esta ruta (Canton *et al.*, 2012).

8.3 Prueba de retención *in vitro* del plásmido

El desarrollo de las nanopartículas que son estables en ambiente extracelulares para la protección del material genético, las nucleasas del suero son la mayor preocupación que podría afectar la estabilidad del ADN y consecuentemente su eficacia de transfección. Para analizar si existe una adecuada protección del ADN plasmídico promovida por su encapsulación en las nanopartículas de éste trabajo, se realizó una prueba utilizando un gel de agarosa y se probaron diferentes radios quitosán-plásmido para elegir el mejor (Fig 22). Al escoger el radio más óptimo 1:60 se volvió a correr en otro gel donde en dos carriles se incorporó el plásmido solo (pCEM-Luc) 1 μ l y en otros dos carriles el plásmido con quitosán para observar la diferencia.



8.4 Evaluación del nivel de apoptosis y transfección de las nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán y el plásmido pCEM-TRAIL en células B16F10

8.4.1 Alteraciones citomorfológicas mediante tinción hematoxilina y eosina.

Se realizaron transfecciones con plásmido solo, nanopartículas y quitosán en la línea celular B16F10 y pasados las 48 horas se tiñeron con colorantes hematoxilina y eosina para observar cambios o alteraciones en la morfología celular (Fig.23) donde se muestra el control y el plásmido desnudo no hay cambios en la estructura celular ya que las células tienen características normales que es su forma alargada y bien definida. Con el plásmido TRAIL desnudo las células siguen mostrando características propias

normales. En cambio cuando se transfectaron con la nanopartícula magnética y quitosán y/o doctormag, las células muestran cambios muy notorios e irregulares como son: encogimiento, con núcleos pequeños y fragmentados, asimismo no hay contacto entre ellas.

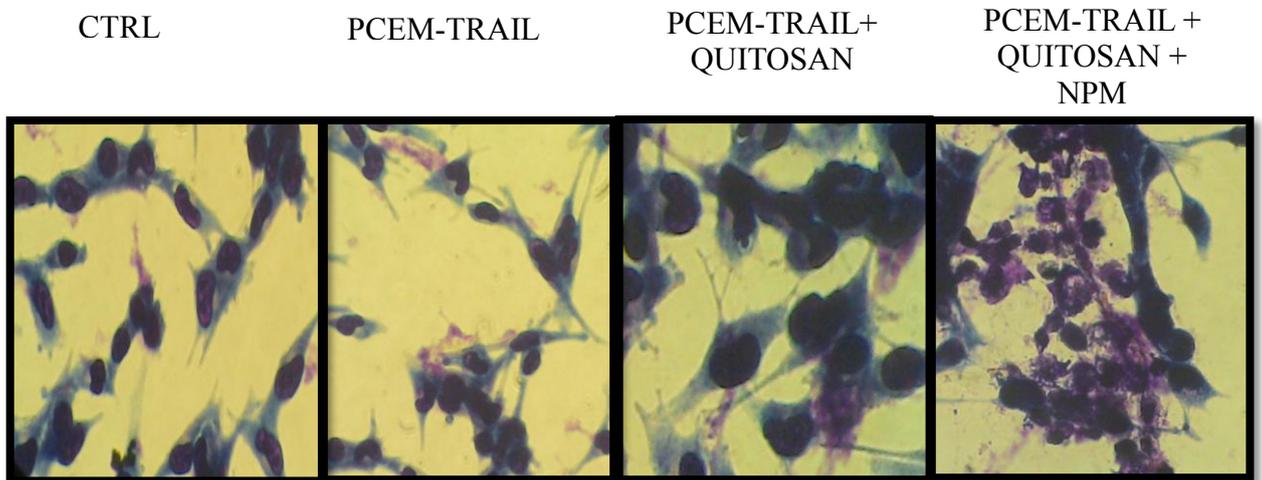


Fig.23. Tinción de células B16F10 con hematoxilina y eosina después de diferentes tratamientos.

8.4.2 Activación de caspasa 3

Se procedió a analizar el nivel de expresión de caspasa 3 activa en las células transfectadas, a las 24 h podemos ver que hay señal aunque muy baja, en cambio a las 48 h observa más intensa. En el control negativo que fueron las células sin transfectar no se observa expresión alguna (Fig.24).

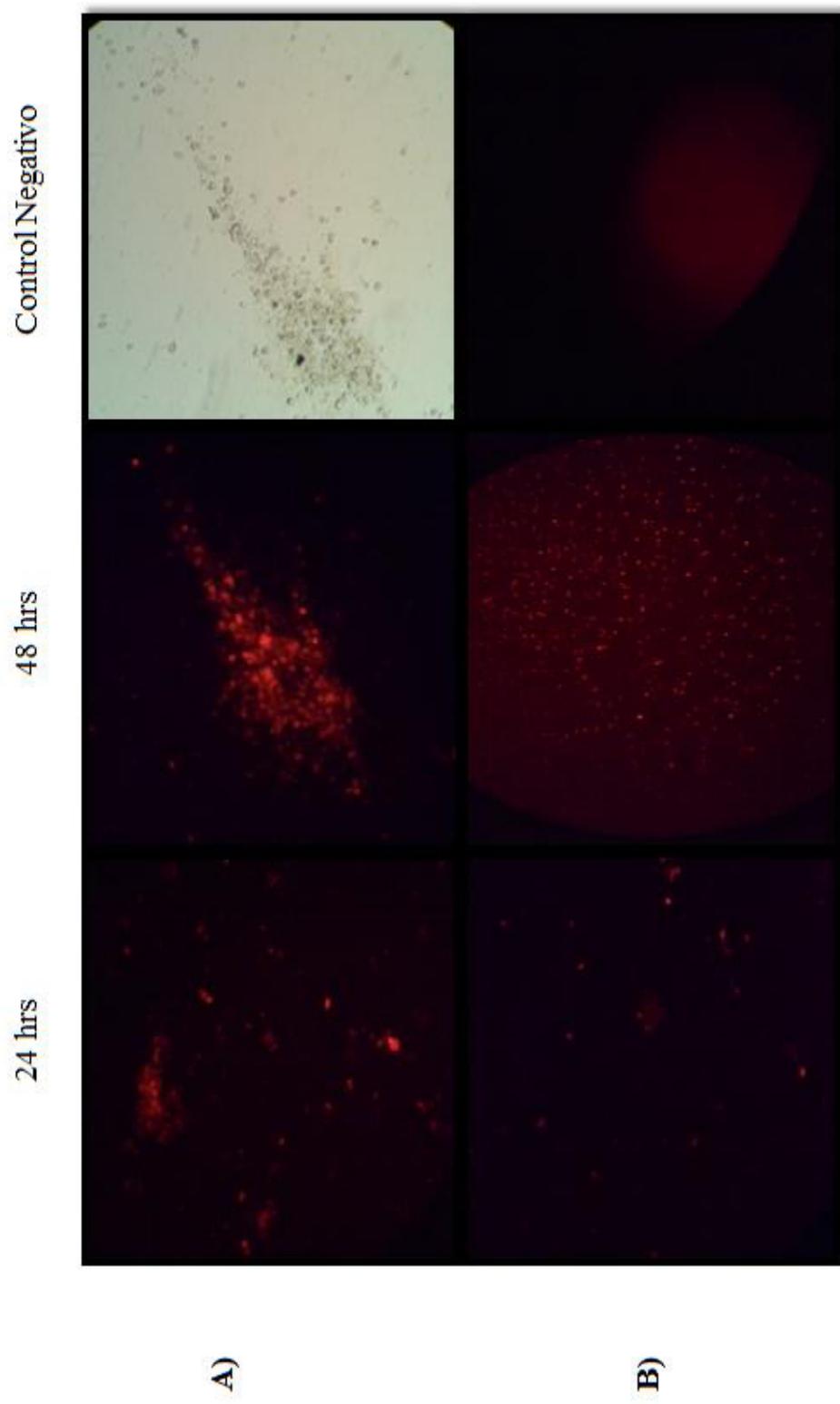


Fig.24. Expresión de caspasa 3 en línea celular B16F10 a las 24 y 48 horas.

8.4.3 Detección de proteína TRAIL

Se detectó la expresión de la proteína TRAIL mediante western blot en células B16F10 y β -actina usada como control (Fig.25).



Fig.25. Proteína TRAIL detectada por western blot en células B16F10

8.5 Inducción tumores pulmonar en ratones y administración de nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán.

8.5.1 Tinción de tejido pulmonar con hematoxilina y eosina

Una vez observados al microscopio los cortes de tejido pulmonar y teñidos con los colorantes H&E, se analizaron las diferencias morfo-fisiológicas entre las muestras con diferentes tratamientos (Fig. 26).

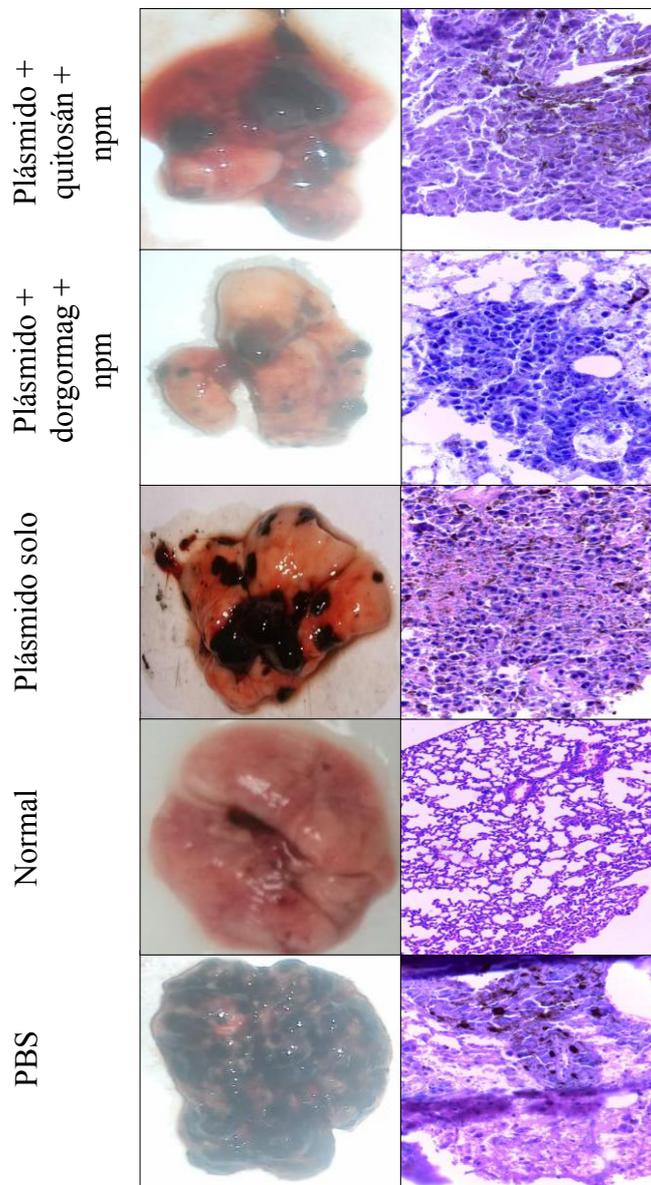


Fig.26. Tejido de pulmón de ratón con diferentes tratamientos analizados con H&E

H&E

Observamos que en el tejido control (solo tratado con PBS) todo corresponde a necrosis ya que no hay tejido viable, solo se observan los fantasmas donde era tejido normal y neoplásico con un daño pulmonar masivo. En tejido normal no hay tumor ya que se observa el tejido bien preservado; Con el plásmido solo observamos células tumorales con núcleos condensados. Con el plásmido, dogtormag y nanopartícula magnética se observó un porcentaje menor de tumor y mayor de tejido no neoplásico con mayor número de células con núcleos condensados así como algunas muestras con daño pulmonar moderado y finalmente en el tratamiento de plásmido, quitosán y nanopartícula magnética con tejido tumoral y no neoplásico así como también la mayoría con células tumorales con núcleos condensados y algunas de éstas muestras con daño pulmonar.

8.5.2 Prueba de TUNEL

Tejido pulmonar analizado por medio de la técnica de TUNEL con diferentes tratamientos (Fig.27).

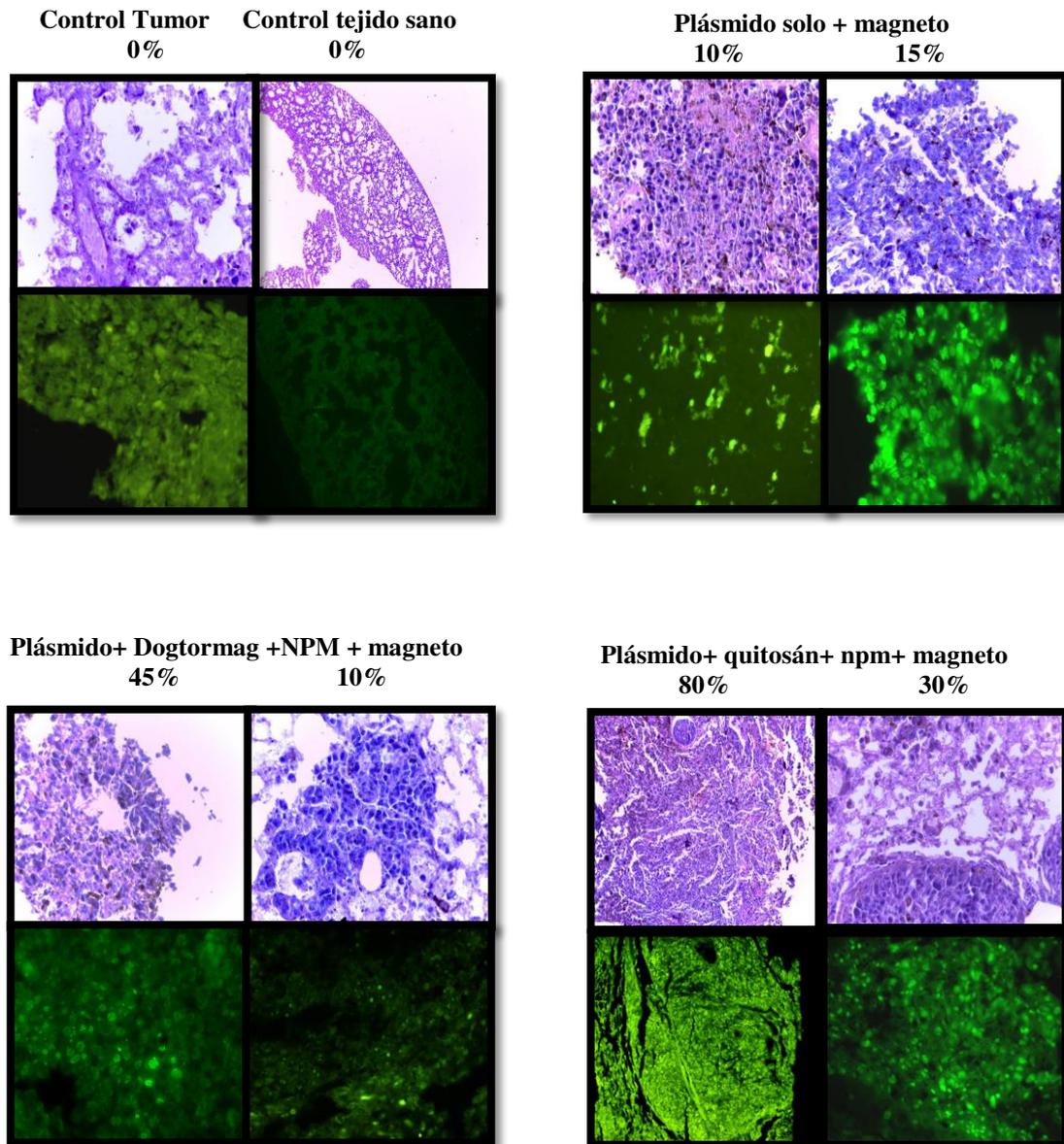


Fig.27. Tejido pulmonar de ratón con H&E y TUNEL con el porcentaje de células apoptóticas

Obtuvimos en promedio un 10% de células fluorescentes con plásmido desnudo, con plásmido, dogtormag y nanopartícula magnética un 30% y con quitosán hasta un 55%. Esto nos indica que aunque en menor porcentaje el plásmido solo logró llegar hasta los pulmones y expresar nuestro gen de interés y con los otros dos tratamientos se aumentó significativamente este porcentaje de células apoptóticas (Fig 28). La degradación del DNA detectada por TUNEL en melanoma pulmonar ya ha sido descrita por otros autores con diferentes tratamientos (Pereyra *et al.*, 2013).

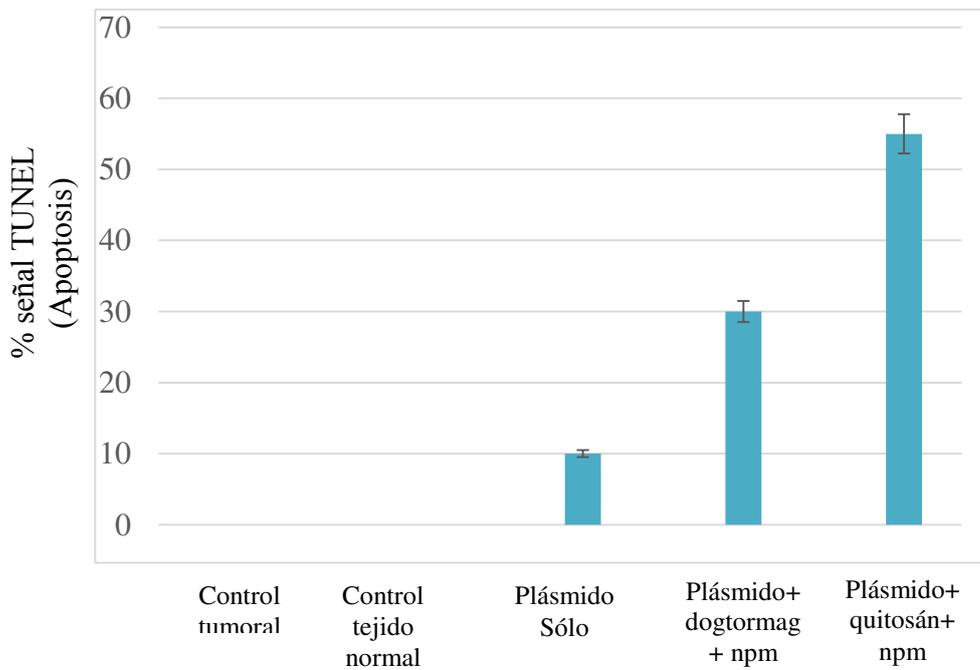


Fig.28. Gráfica del porcentaje de la señal de apoptosis en tejido pulmonar con diferentes tratamientos

Proteína TRAIL en los pulmones tratados mediante western blot (Fig.29).

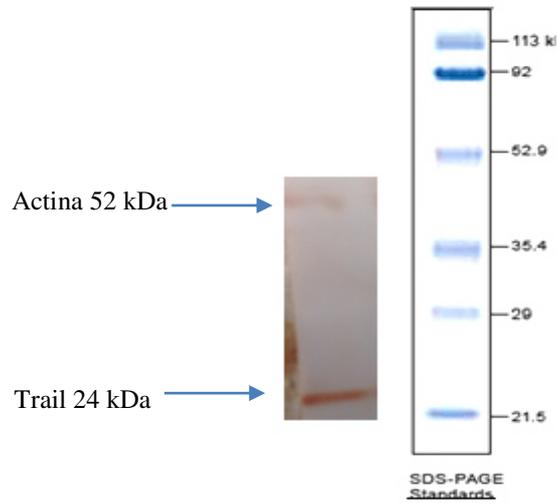


Fig.29. Westernblot revelado por colorimetría con la proteína control β -actina y TRAIL

8.6 Evaluación de sobrevivencia

En el estudio *in vivo* en un modelo metastásico de ratones se realizó un análisis de sobrevivencia para observar el efecto de los diferentes tratamientos como se observa en la Fig. 30 con una gráfica de Kaplan-Meier plot.

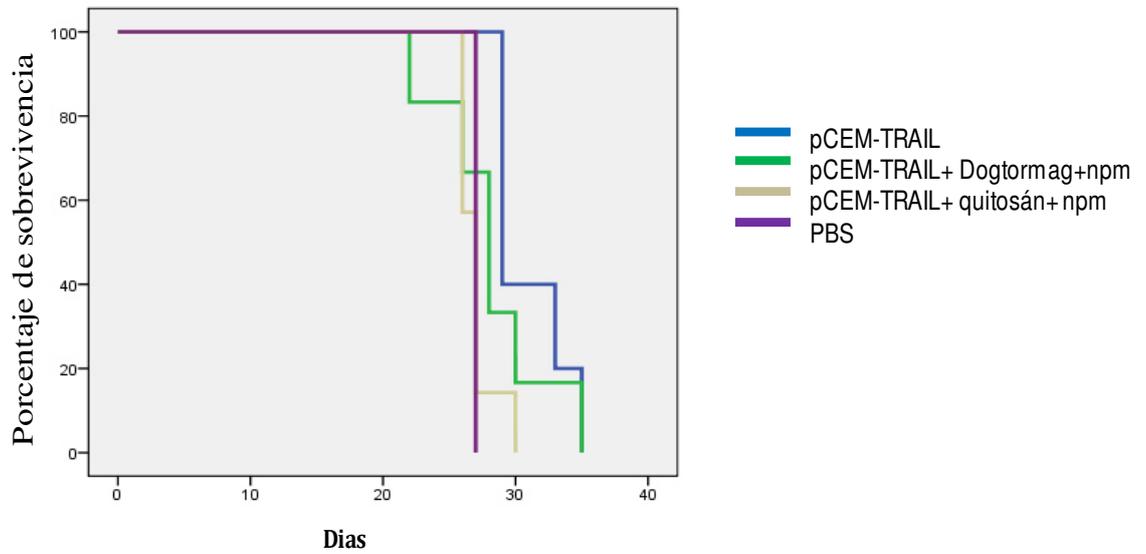


Fig.30. Supervivencia de ratones con melanoma pulmonar después de diferentes tratamientos

La supervivencia media para los controles (tratados con PBS) fueron de 27 días. Para el plásmido solo 31, 28 para nanopartículas magnéticas con dogtormag y plásmido y 28 días para nanopartículas magnéticas con quitosán y plásmido. Estos resultados de supervivencia difieren de los resultados obtenidos con los cortes histológicos de los pulmones de ratón donde se observa que el pulmón con menos focos tumorales es en el tratamiento con el plásmido, quitosán y nanopartícula magnética mostrando una gran diferencia con el control tumoral donde el pulmón se encuentra lleno de tumores. Así como también difieren de los resultados analizados con la prueba de TUNEL donde se encontró un gran número de células tumorales en este mismo tratamiento hasta de un 55% a diferencia del control negativo.

9. DISCUSION

El envío dirigido magnético *in vitro* e *in vivo* de genes fue demostrado nuestro grupo de investigación, utilizando nanopartículas magnéticas de óxido de hierro que fueron capaces de hacer complejos con el ADN y quitosán.

Para el objetivo de este trabajo se utilizó un sistema acarreador de drogas y genes compuesto por nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán e incluimos la secuencia de un gen llamado TRAIL que es un potente inductor de apoptosis. Esto con la finalidad reducir focos tumorales en pulmón de ratones C57BL/6.

En este estudio obtuvimos nanopartículas por el método de gelación iónica el cuál se eligió con el propósito de atrapar plásmido dentro de las nanoestructuras debido a las condiciones extremas de propiedad de encapsulamiento (Moura M *et al.*, 2009). Obtuvimos nanopartículas de 150- 250 nm con una forma esférica, esto es importante ya que fue previamente demostrado que la forma de las nanopartículas influencia ampliamente en la eficiencia de transfección, además de que tienen mejor atrapamiento que las de diferente morfología. El tamaño de las nanopartículas es un parámetro clave que puede afectar sus propiedades que puede influir tanto en la ruta de la captación celular como velocidad de absorción. (He *et al.*, 2010). Las nanopartículas más pequeñas pueden ser internalizadas mediante el mecanismo de pinocytosis como endocitosis mediada por clatrininas o caveolas, mientras que las partículas más grandes son generalmente internalizadas via macropinocitosis y/o fagocitosis en células especializadas. Se piensa que esto es debido a que el tamaño de las vesículas producidas por la endocitosis mediada por clatrininas y caveolas tienen un tamaño limite, generalmente menor a 200 nm (Wang *et al.*, 2009). En contraste con el mecanismo por el cual las células internalizan fluido extracelular y otras sustancias por macropinocitosis se sugiere que partículas más grandes pueden ser internalizadas hacia las células por esta ruta (Canton *et al.*, 2012).

En los análisis *in vitro* pudimos observar los diferentes efectos que ocasionaron las transfecciones en la morfología sobre la línea celular B16F10 teñidas con H&E. En las imágenes (Fig. 23) donde observamos que en el tratamiento con plásmido,

nanopartícula magnética y quitosán o dogtormag tuvieron los mayores cambios en la morfología celular y estos resultados están acorde a las características de apoptosis observadas en células B16F10 de otros autores (Pereyra F *et al.*, 2013 and Strange *et al.*, 1992) así como con las características morfológicas de la apoptosis (Saraste A *et al.*, 2000).

Se detectó una fuerte expresión de caspasa 3 cuando se transfectaron las células con nanopartículas quitosán y TRAIL, Como otros receptores que contienen dominios de muerte, los receptores antagonistas de TRAIL comparten componentes de señalización con drogas antitumorales como las caspasas. La muerte celular desencadenada por TRAIL procede directamente de DISC (complejo de señalización inductor de muerte) formado por TRAIL unido a sus receptores antagonistas (TRAIL R-1 o TRAIL R-2), o indirectamente mediante la mitocondria. Ambas vías, permiten la activación de caspasa 3, la responsable principal para la ejecución de la apoptosis (Thorburn A *et al.*, 2004). Esto nos indica que nuestro nanosistema dirigió, retuvo y entregó exitosamente el gene TRAIL en el núcleo de las células. La citocina TRAIL es un agente prometedor para terapia en cáncer, es por ello que se encuentra bajo investigación (Sheng Wu *et al.*, 1999). Su importancia radica en que aparentemente es una potente droga citotóxica específica del cáncer y no es tóxica para células normales como otras citocinas. TNF- α o Fas-L no han sido exitosos en ensayos clínicos cuando se administraron sistémicamente debido a la toxicidad.

En los análisis *in vivo* al observar los pulmones controles y tratados pudimos observar gran diferencia respecto al control positivo donde casi todo el pulmón está cubierto con tumor y en los tratados se observan menos focos tumorales (Fig 26) Así como también en los cortes histológicos de tejido pulmonar teñidos con H&E.

Respecto a los análisis de sobrevida de los ratones pudimos ver que no coincidían con los niveles de apoptosis detectados mediante tinción del tejido con H&E y el porcentaje de células apoptóticas por TUNEL ya que el grupo en el que mayor apoptosis se detectó tuvo una menor sobrevivencia que los demás grupos parecida a la del grupo control tratado con PBS. Esto quiere decir que se necesita encontrar un balance entre los grados de apoptosis inducida para producir la inhibición de un tumor para poder correlacionarlo con una mejor sobrevivencia. Por qué un incremento

relativamente bajo en el nivel de células epiteliales apoptóticas puede resultar en una considerable pérdida celular en el tiempo. Una regulación por incremento relativamente menor de la apoptosis del epitelio, particularmente de las células de tipo II alveolar, podría ser responsable de la pérdida epitelial excesiva y el fracaso de re-epitelización. Puede ser importante para desarrollar estrategias anti- apoptóticas específicas de células, en lugar de las estrategias dirigidas a bloquear la apoptosis de los tipos de células dentro de los pulmones (Thomas M *et al.*, 2005). Se necesita más información experimental para identificar la inhibición de células apoptóticas en tejido pulmonar y la reparación de éste en adición al daño. Por lo tanto es muy importante enfocarse en desarrollar estrategias anti-apoptóticas de células específicas antes que estrategias encargadas de bloquear la apoptosis de todos los tipos de células en los pulmones.

10. CONCLUSIONES

El interés de este trabajo surgió directamente del interés de generar conocimiento en el desarrollo de nuevos sistemas para envío dirigido de genes, por lo que los resultados obtenidos tienen un potencial carácter de aplicación. Se han obtenido resultados con interesantes aportes e innovaciones en el campo de la nanotecnología aplicada.

Los resultados obtenidos permiten definir las siguientes conclusiones:

1. Se han obtenido nanopartículas cubiertas con quitosán, con capacidad de dirigirse y retenerse en pulmón, lo cual hace posible la utilización de estos vectores.
2. Se ha logrado inducir apoptosis en células B16F10 utilizando las nanopartículas magnéticas con quitosán y el gene apoptótico TRAIL demostrado por diferentes técnicas.
3. Los nanoacarreadores basados en quitosán producidos en este estudio son capaces de transfectar plásmidos en el tejido pulmonar que pueden ser activados para expresar el gene apoptótico TRAIL bajo el control de un campo magnético externo.
4. Las nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosán y el gen TRAIL fueron capaces de inducir apoptosis en tejido pulmonar de ratón detectados mediante diferentes técnicas.
5. Estos resultados ofrecen la aplicabilidad de estos nanosistemas como envío dirigido de genes en enfermedades como metástasis a pulmón.
6. Es necesario realizar más estudios para encontrar el balance ideal entre el nivel de sobrevivencia de ratones y el nivel de apoptosis causado.

BIBLIOGRAFIA

1. Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., Aminabhavi T.M. 2004. Recent advances on chitosan based micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Controlled Release* 100: 5-28.
2. Biswaranjan M., Aswalb J., Kohlbrecher and Bohidara H. 2005. Synthesis of Gelatin Nanoparticles via Simple Coacervation. *Surface Sci. Technol.* 21:149-160.
3. Bodmeier R., Oh K.H and Pramart Y. 1989. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15 1475-1494.
4. Campos H.C., Rosell R and Taron M. 2003. Influence of genetic markers on survival in non-small cell lung cancer. *Drugs of today.* 39(10): 775
5. Canton, I and Battaglia G. 2012. Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews.* 41: (7), 2718-2739.
6. Chan P., Kurisawa M., Chung J.E., Yang Y. 2007. Synthesis and characterization of chitosan-g-poly (ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery. *Biomaterials* 28(3): 540–549.
7. Cohen H., Levy RJ and Fishbein I. 2000. Sustained delivery and expression of ADN encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther.* 7:1895-1905.
8. Colombo M., Carregal-Romero S., Casula M.F., Gutierrez L., Morales M.P., Bohm I.B., Heverhagen, J.T., Prospero D., and Parak, W.J. (2012). Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society reviews* 41, 4306-4334.
9. Curotto E., Aros F. 1993. Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups. *Anal. Biochem.* 211(2) 240–241.
10. Dailey L., Schmehl T., Gessler T., Wittmar M., Grimminger F., Seeger W., Kissel T. 2003. Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features. *J Control Release.* 86(1): 131-144.
11. De las Heras G. B., Jiménez Gordo AM, Casado S. E., Zamora A. P., Cantalejo M. M., González B. M. 2001. Síndrome de vena cava superior: presentación de seis casos. *An Med Interna (Madrid)*; 18:369-72.
12. Dobson J. 2006. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. *J of Gene Ther.* 13(4):283-287.
13. Dyer A.M., Hinchcliffe M., Watts P., Castile J., Jabbal-Gill I., Nankervis R., Smith A., Illum L. 2002. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple

- chitosan formulations and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 19 (7) 998-1008.
14. Gen Sheng Wu. 2009. TRAIL as a target in anti-cancer therapy. *Cancer Letters* 285: 15.
 15. Georgakis G.V., Li Y., Humphreys R., Andreeff M., O'Brien S., Younes M., Carbone A., Albert V and Younes A. 2005. Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL R-1 and TRAIL R-2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib- induced cell death. *Br J Haematol.* 130: 501-510.
 16. Gill D., Davies L., Pringle I and Hyde S. 2004. The development of gene therapy for diseases of the lung. *J of Cell. Mol. Life Sci.* 61: 355–368.
 17. Goycoolea M., Higuera-Ciapara I., Alonso M. 2008. Chitosan-polysaccharide blended nanoparticles for controlled drug delivery. *Pharm Sci Tech.* 12(1):10-20.
 18. Griffith T.S., Wiley S.R., Kubin M.Z., Sedger L.M., Maliszewski C.R., Fanger N.A. 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor- related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.* 189, 1343-1354.
 19. Hai-Quan Maa., Krishnendu Roy., Vu L., Troung-Leb., Kevin A., Janesa., Kevin Y., Yan Wanga., J. Thomas Augustb and Kam W. Leonga. 2001. Chitosan-ADN nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. of Controlled Release.* 399–421.
 20. Hashimoto M., Zhihong Y., Yohei., Toshinori S., Hiyoshi Kohoku-ku. 2005. Non-viral gene therapy. *J gene Ther.* 263-272.
 21. He, C. B.; Hu, Y. P.; Yin, L. C.; Tang, C.; Yin, C. H. 2010. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31, (13), 3657-3666.
 22. Heinemann L., Klappoth W., Rave K., Hompesch B., Linkeschowa R and Heise T. 2000. Time-action profile of the long-acting insulin analog insulin glargine (HOE901) in comparison with those of NPH insulin and placebo. *J Diabetes Care.* 23(5):1343.
 23. Heredia-Rojas J A., Rodríguez- De la Fuente., Alcocer-González J., Flores R., Rodríguez-Padilla C. Santoyo-Stephano M., Castañeda-Garza E., Taméz-Guerra R. 2010. Effect of 60 Hz magnetic fields on the activation of hsp70 promoter in cultured INER-37 and RMA E7 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Animal.* 46(9):758–763
 24. Hersey P., Zhang XD. 2001. How melanoma cells evade TRAIL-induced apoptosis. *Nat. Rev. Cancer.* 1(2):142–150.

25. Jong-Ryul J., Seung-Jun L., Jong-duk K. and Sung-Chul S. 2004. Magnetic properties of Fe₃O₄ Nanoparticles Encapsulated with poly (D, L Lactide-Co-Glycolide).IEEE transactions on magnetics. 3015-3017.
26. Kavaz TD., Ozturk E., Bayrman C and Denkbaz EB. 2008. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles for diverse biomedical applications. J Spri Sci. 313-320.
27. Ko J.A, H.J. Park, S.J. Hwang, J.B. Park, J.S. Lee. 2002. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery, Int. J. Pharm. 249165-174.
28. Krishna A. Sailaja., Amareshwar P., Chakravarty P. 2010. Chitosan nanoparticles as a drug delivery system. J of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 1:174.
29. Kumar R and Hudson S. 2008. Chitosan in: Wnek, G.E., Bowling, G.L., editors. Enciclopedia of biomaterials and biomedical engineering. 2nd ed., Informa Healthcare. 604-617.
30. Langer R. 2000. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratry's experience. Acc Chem Res.94-101.
31. Lin H., Blank M., Goodman R. 1999. A magnetic field- responsive domain in the human HSP70 promoter. J Cell Biochem. 1(75):170-176.
32. Lyse A. N., Britnie R., and Thomas S. Griffith. 2011. Advances in Viral vector-Based TRAIL Gene Therapy for cancer. J cancer. 3(1):603-620.
33. McBain C., Yiu HP., Dobson J. 2008. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivey. Int J Nanomed. 3:169-180.
34. Mi F.L, S.S. Shyu, S.T. Lee, T.B. Wong. 1999. Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method, J. Polym. Sci, Part B:Polym Phys 37. 1551-1564.
35. Muzzarelli R. 2009. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids, Carbohydr. Polym. 77: 1-9.
36. Onishi H, Araki T, Shirato H, Nagata Y, Hiraoka M, Gomi K, et al. 2004. Stereotactic hypofractionated high-dose irradiation for stage I nonsmall cell lung carcinoma: clinical outcomes in 245 subjects in a Japanese multiinstitutional study. Cancer. 101(7):1623-31.
37. Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K., and Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. Journal of Physics D: Applied Physics 36, R167–R181.

38. Paños I., R. Harris., N. Acosta., B. Miralles., A. Heras. 2006. Study of the amount of chitosan bound to alginate in polyelectrolyte complexes. *Adv in Quitin Sci.* 637-644.
39. Pereyra F., Arruda D., Figueiredo C., Massaoka M., Matsuo A.; Bueno V., and Rodrigues E. 2013. FTY720 induces apoptosis in B16F10-NEX2 murine melanoma cells, limits metastatic development *in vivo*, and modulates the immune system. *Clinics (Sao Paulo)* 68, 7, 1018–1027.
40. Plank C., Scherer F., Schillinger U., Bergemann C., and Anton M. 2003. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *J. Liposome Res.* 29–32.
41. Roa WH., Azarmi S., Al-Hallak MH., Finlay WH., Magliocco AM., Löbenberg R. 2011. Inhalable nanoparticles, a non-invasive approach to treat lung cancer in a mouse model. *J Control Release.* 150(1):49-55.
42. Rodriguez-de-la-Fuente A.O.; Alcocer-Gonzalez J.M.; Heredia-Rojas J.A.; Balderas-Candanosa I.; Rodríguez-Flores L.E.; Rodríguez-Padilla C.; Tamez-Guerra R. 2009. Effect of 60 Hz electromagnetic fields on the activity of hsp70 promoter: An *in vitro* study. *Cell Biol Int.*, 33, 3, 419-433.
43. Saraste A.; Pulkki K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research.* 45, 528-537
44. Scherer F., Anton M., Schillinger U., Henke J., Bergemann C., Kruger A., Gansbacher B and Plank, C. 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 102–109.
45. Schurch S., Gehr P., Im Hof V., Geiser, M., Green F.H.Y. 1990. Surfactant displaces particles toward the epithelium in airways and alveoli. *Respir. Physiol.* 80: 17-32.
46. Somia N.V. and Verma I.M. 2000. Gene therapy: Trials and tribulations. *Nature Reviews Genetics* 1 (2) 91-99
47. Thorburn A. 2004. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal.* ; 16: 139 – 144
48. Strange R., Li F., Saurer, S., Burkhardt A and Friis, R. 1992. Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development.* 115, 49.–58.
49. Takeda., Hayakawa., Smyth M.J., Kayagaki N., Yamaguchi N., Kakuta S., Iwakura Y., Yagita H., Okamura K. 2001 . Involvement of tumor necrosis

factor-related apoptosis inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.* 7. 94-100.

50. Wang Z. J.; Tirupathi, C.; Minshall, R. D.; and Malik A. B., 2009. Size and Dynamics of Caveolae Studied Using Nanoparticles in Living Endothelial Cells. *ACS Nano* 3, (12), 4110-4116.
51. Yamamoto A., Okumura S., Fukuda Y., Fukui M., Takahashi K and Muranishi S. 1997. Improvement of the pulmonary absorption of (Asul, 7)-eel calcitonin by various absorption enhancers and their pulmonary toxicity in rats. *J. Pharm. Sci.* 86:1144-1147.
52. Zhang L., Gu FX., Chan JM., Wang Az., Langer Rs and Farokhzad OC. 2008. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *ACS Nano* 2, (5), 761-769.

RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. Cynthia Aracely Alvizo Báez

**Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con orientación en Inmunobiología**

Tesis:

**EXPRESIÓN DE TRAIL PARA INDUCIR APOPTOSIS EN CÁNCER
PULMONAR USANDO UN SISTEMA BASADO EN NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS Y QUITOSÁN**

Campo de Estudio: Ciencias Naturales

Datos Personales:

Nacida en Culiacán, Sinaloa el 12 de febrero de 1986

Educación:

- Licenciatura: Licenciado en Biología en la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS)
- Maestría en Ciencias con orientación en Inmunobiología en la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)

Logros alcanzados:

Curso presencial de inglés mediante el programa proyecta 100,000 en la Universidad de Lamar en Beaumont Texas.

Aprobación del curso de inglés avanzado en el CAADI de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Participación en el Taller de educación continua “gestión de la innovación” en la Facultad de Ciencias Biológicas.

Participación como vocal en el examen de la LBG Brenda Juanita Peña Carrillo con la tesis titulada “Estudio de polimorfismos genéticos asociados a resistencia, potencia y respuesta a la deshidratación en relación con el rendimiento deportivo en atletas de competencia”.

Obtención del tercer lugar con el trabajo “Nanopartículas magnéticas de quitosán como sistemas de envío dirigido de plásmidos al pulmón” en el 7º Simposio Internacional de Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas

Artículo publicado “Magnetic nanoparticles of chitosan for targeted delivery system of plasmids to the lungs” Cynthia Aracely Alvizo Báez, I. E. Luna-Cruz, M. C. Rodríguez-Padilla, and J.M. Alcocer-González. Hindawi Publishing Corporation

Journal of Nanotechnology Volume 2014, Article ID 313415, 5 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/313415>.