

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



**EVALUACIÓN DE MICROBOTS BASADOS EN ERITROCITOS Y  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA EL ENVÍO DIRIGIDO DE GENES A  
TUMORES**

**POR**

**CAROLINA BONILLA MEDINA**

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

**JUNIO, 2017**

EVALUACIÓN DE MICROBOTS BASADOS EN ERITROCITOS Y  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA EL ENVÍO DIRIGIDO DE GENES A  
TUMORES

Comité de Tesis

---

Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

DIRECTOR

---

Dr. Juan Manuel Alcocer González

SECRETARIO

---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

VOCAL 1

---

Dr. Pablo Zapata Benavides

VOCAL 2

---

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

VOCAL 3

EVALUACIÓN DE MICROBOTS BASADOS EN ERITROCITOS Y  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA EL ENVÍO DIRIGIDO DE GENES A  
TUMORES

Dirección de Tesis

---

Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

DIRECTOR

---

Dr. Juan Manuel Alcocer González

CO-DIRECTOR

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. Junio de 2017

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente proyecto de investigación fue realizado en la Unidad de Inmunología Molecular, perteneciente al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

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

## AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización y obtención de este grado (CVU: 664989). Gracias a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por permitirme formar parte de un gran lugar de desarrollo científico.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González, por alentarme a continuar con mi formación como investigadora, y por su disposición para apoyarme en todo momento en la realización de este proyecto.

A mi tutora, la Dra. Itza Eloisa Luna Cruz, por continuar guiándome y apoyándome una vez más para lograr todo lo que buscaba, gracias infinitas por todo el conocimiento y la amistad dada.

A la Dra. Lydia Rivera, por todos los consejos y apoyo, así como tiempo de convivencia y clases. Al Dr. Jorge Luis Menchaca por su valioso apoyo para poder realizar la caracterización del sistema.

A Janeth Rivas, Lily Salazar y David García, por su amistad, y por ser quienes de una u otra manera me ayudaron, guiaron y asesoraron en las diversas áreas que manejan y que se incluyen en este proyecto.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Cynthia, Daniel, Mony, Azael, Becky, Ulises y Leonardo, gracias por la amistad, consejos y comida, por hacer más ameno este tiempo y volver éste lugar de investigación un lugar de convivencia, apoyo y amistad. Gracias infinitas Daniel, Mony y Azael, por el invaluable apoyo en la parte *in vivo*, sin ustedes no podría haber llegado hasta ahora. A mis amigos de maestría y estudio, Brenda y Luis, gracias por todos los momentos de diversión y estudio, por el apoyo en todo momento, codón CGA.

Y finalmente, gracias a todas las personas que me apoyaron antes, durante o después de comenzar esta meta, mi sincero y total agradecimiento por siempre estar cuando lo necesité.

## DEDICATORIA

A Dios, que me permitió seguir en el lugar adecuado y con las personas indicadas para poder cumplir esta meta.

Eternamente a mi madre Carolina Medina y a mi padre Rafael Bonilla sin quienes definitivamente jamás hubiera llegado a finalizar este objetivo.

A mis hermanos, Laura, Rafael y Wilfredo, quienes estuvieron conmigo a lo largo de todo el camino recorrido.

A mi familia, tíos Luz y Pedro, primas Irma y Sarahi, y tía Laura., por siempre estar al pendiente, darme ánimos y ser parte de esta meta.

Y a mis sobrinos, Anderson que durante la última etapa me alegraba y ayudaba a liberar estrés, y Sofía, quien me inspira siempre a seguir adelante, a buscar generar un mundo mejor, y ser mejor persona para ella, sepan que desde pequeños han sido fundamentales en mi vida.

“Yo he encontrado que hay una maravillosa armonía en las verdades complementarias de la ciencia y la fe. El Dios de la Biblia es también el Dios del genoma. A Dios se le puede encontrar en la catedral o en el laboratorio. Investigando la majestuosa y asombrosa creación de Dios, la ciencia puede en efecto ser un medio para adorar a Dios, y esa es una forma de adoración maravillosa. Soy Científico y creyente. No encuentro conflicto entre estas dos visiones del mundo”.

Francis Collins



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	I
<b>DEDICATORIA</b> .....	II
<b>ÍNDICE</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	IX
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	XI
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b> .....	XIV
<b>RESUMEN</b> .....	XV
<b>ABSTRACT</b> .....	XVI
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Terapias dirigidas.....	3
2.1.1 Terapia génica.....	4
2.1.1.1 Vectores de DNA plasmídico.....	6
2.1.1.2 Tipos de promotores.....	7
2.1.1.3 El promotor de HSP70.....	10
2.1.2 Envío dirigido de fármacos.....	12
2.1.2.1 Biopolímeros.....	12
2.1.2.2 Quitosán.....	13
2.1.3 Nanobiotecnología.....	15

2.1.3.1	Nanopartículas magnéticas .....	19
2.1.3.2	Nanopartículas de quitosán .....	20
2.1.3.3	Farmacocinética de nanopartículas .....	21
2.1.4	Magnetoterapia .....	26
2.1.2.1	Intensidad y efectos de la exposición a campos magnéticos.....	27
2.2	Microbots .....	29
2.2.1	Microbots procariotas .....	30
2.2.2	Microbots eucariotas .....	32
2.2.2.1	Microbots basados en eritrocitos.....	33
<b>III.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>IV.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>39</b>
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	39
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>VI.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
6.1	Descripción, purificación y caracterización del plásmido a utilizar .....	41
6.1.1	Extracción rápida de plásmido por el método Rapid Fenol .....	41
6.1.2	Caracterización enzimática del plásmido pCEM-Luc.....	42
6.1.3	Extracción de plásmido por el método maxiprep.....	43
6.2	Formación y caracterización de los nanocomplejos de pDNA-Quitosán-NPMF .....	44

6.2.1 Preparación de reactivos .....	44
6.2.2 Elaboración de los nanocomplejos.....	45
6.2.3 Ensayo de retención de pDNA.....	47
6.2.4 Evaluación de homogeneidad y tamaño.....	47
6.2.5 Ensayo de liberación de pDNA.....	47
6.2.6 Caracterización de tamaño de los nanocomplejos magnéticos .....	48
6.2.7 Caracterización de carga superficial .....	49
6.2.8 Evaluación de la citotoxicidad de los nanocomplejos.....	49
6.2.9 Caracterización de forma y tamaño de las NPMF y los nanocomplejos por microscopía de fuerza atómica.....	50
6.2.10 Evaluación del tamaño y potencial Z de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF adicionando el fluoróforo FITC .....	51
6.2.11 Evaluación de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF a gran escala. ....	51
6.3 Elaboración y cracterización de los microbots basados en Eritrocitos .....	53
6.3.1 Elaboración de los microbots .....	53
6.3.2 Caracterización de los microbots .....	54
6.3.2.1 Caracterización de los microbots por microscopía de fuerza atómica .....	54
6.3.2.2 Caracterización de los microbots por microscopía de fluorescencia .....	55
6.3.3 Estandarización de la capacidad de carga de los microbots.....	55
6.4 Evaluación in vivo de los microbots .....	56

6.4.1	Análisis de la eficiencia de transporte específico .....	58
6.4.2	Análisis de la eficiencia de expresión del gen de luciferasa .....	58
6.5.	Análisis estadístico.....	59
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
7.1	Caracterización del plásmido pCEM-Luc .....	60
7.2	Caracterización del perfil de retención, liberación y homogeneidad de los nanocomplejos de Q/pDNA.....	61
7.2.1	Caracterización del perfil de retención de los nanocomplejos de Q/pDNA.....	61
7.2.2	Caracterización de homogeneidad y tamaño de los nanocomplejos de Q/pDNA	62
7.2.3	Caracterización del perfil de liberación de DNA de los nanocomplejos de Q/pDNA	63
7.3	Caracterización del tamaño y potencial Z de las NPMF y los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF.....	64
7.4	Evaluación de la citotoxicidad de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF .....	67
7.5	Caracterización de forma y tamaño de las NPMF y los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF por MFA.....	68
7.6	Evaluación del tamaño y potencial Z de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF adicionando el fluoróforo FITC. ....	69
7.7	Evaluación de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF a gran escala. ....	71
7.8	Caracterización de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos ...	73
7.8.1	Caracterización de los microbots basados en eritrocitos.....	73

7.8.1.1	Caracterización de los microbots basados en eritrocitos y nanocomplejos magnéticos por FMA. ....	73
7.8.1.2	Caracterización de microbots basados en eritrocitos y nanocomplejos magnéticos por microscopía de fluorescencia.....	75
7.9	Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos. ....	77
7.9.1	Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos mediante medición de potencial zeta. ....	78
7.9.2	Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos mediante fluorescencia. ....	78
7.9.3	Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos mediante perfil de sedimentación. ....	80
7.10	Evaluación in vivo de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos	81
7.10.1	Análisis de la eficiencia de transporte específico de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos .....	81
7.10.2	Evaluación de expresión génica específica de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos .....	82
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>84</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>93</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>94</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Promotores activados por diversos estímulos investigados para diferentes tipos de cáncer.....	10
Tabla 2. Límites de exposición a campos magnéticos estáticos, establecidos por la ICNIRP .....	29
Tabla 3. Componentes empleados para la elaboración de los nanocomplejos magnéticos. ....	46
Tabla 4. Diferentes componentes para la elaboración de los nanocomplejos magnéticos a gran escala. ....	53
Tabla 5. Tamaño de nanocomplejos de Q/pDNA elaborados a diferentes combinaciones de radios proporcionales y TPP.....	62
Tabla 6. Liberación total de pDNA por parte de los nanocomplejos de Q/pDNA durante 144 horas. ....	64
Tabla 7. Tamaño e intensidad de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF elaborados a diferentes combinaciones de radios proporcionales.....	65
Tabla 8. Concentración citotóxica 50 calculada para los nanocomplejos o sus componentes.....	67
Tabla 9. Tamaño de nanocomplejos marcados con diferentes concentraciones de FITC. ....	70

Tabla 10. Potencial zeta de eritrocitos a diferentes concentraciones cargados con nanocomplejos 50X.....78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ensayos clínicos en terapia génica aprobados por año hasta 2016, y principales tipos de enfermedades tratadas.....	5
Figura 2. Tipos de nanopartículas usadas en investigación biomédica y envío dirigido.. .....	17
Figura 3. Rutas de absorción, biodistribución y eliminación de nanopartículas según la vía de administración empleada. ....	22
Figura 4. Fases de biodistribución de las nanopartículas empleadas en terapia tumoral.. .....	23
Figura 5. Mecanismos de toxicidad de diferentes tipos de nanopartículas. ....	25
Figura 6. Ilustración de los diferentes métodos empleados para cargar eritrocitos. ....	34
Figura 7. estrategia experimental del uso de membranas de eritrocitos para la creación de microbots.....	36
Figura 8. Vector pCEM-Luc. ....	41
Figura 9. Caracterización enzimática del plásmido pCEM-Luc. ....	60
Figura 10. Caracterización del perfil de retención de DNA plasmídico por parte de los nanocomplejos de Q/pDNA. ....	61
Figura 11. Homogeneidad y tamaño de los nanocomplejos de Q/pDNA. ....	63



Figura 12. Liberación de DNA por parte de los nanocomplejos de Q/pDNA. ....	64
Figura 13. Homogeneidad y tamaño de las NPMF. ....	65
Figura 14. Homogeneidad y tamaño de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF. ....	66
Figura 15. Potencial Z de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF. ....	67
Figura 16. Viabilidad de células B16F10 transfectadas con los nanocomplejos y sus componentes. ....	68
Figura 17. Microscopía de fuerza atómica de las NPMF y los nanocomplejos de Q- DNA-NPMF. ....	69
Figura 18. Homogeneidad y tamaño de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF marcados con FITC. ....	70
Figura 19. Potencial Z de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF marcados con FITC. ....	71
Figura 20. Fluorescencia de NPMF a diferentes concentraciones. ....	72
Figura 21. Fluorescencia de Nanocomplejos a diferentes concentraciones. ....	72
Figura 22. Microscopía de fuerza atómica de un eritrocito completo y el centro de éste. .....	74
.....	75
Figura 24. Microscopía de fluorescencia de eritrocitos. ....	76

Figura 25. Microscopía de fluorescencia de microbots basados en eritrocitos.....	77
Figura 26. Fluorescencia verde de microbots a diferentes concentraciones. ....	79
Figura 27. Fluorescencia roja de microbots a diferentes concentraciones.....	80
Figura 28. Perfil de sedimentación de microbots a diferentes concentraciones. ....	81
Figura 29. Fluorescencia de órganos y tumor de ratones inoculados con los diferentes tratamientos. ....	82
Figura 30. Luminiscencia de órganos y tumor de ratones inoculados con los diferentes tratamientos. ....	83

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\xi$	potencial zeta
$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{L}$	microlitro
<b>DMEM-F12</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco: Mezcla de nutrientes F12
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>G</b>	Gauss
<b>LB</b>	medio Luria Bertani
<b>mL</b>	mililitro
<b>mV</b>	milivolts
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>NPMF</b>	Nanopartículas magnéticas fluorescentes
<b>pb</b>	pares de bases
<b>pDNA</b>	DNA plasmídico
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>T</b>	Tesla
<b>V</b>	volts

## RESUMEN

Los esfuerzos para el tratamiento del cáncer se han enfocado en tratar éste de una manera personalizada, con grandes avances en terapia dirigida, sin embargo, aún existen aspectos a mejorar. Actualmente, la estrategia se basa en hacer una sinergia combinando diversos enfoques generando agentes terapéuticos más eficientes. Adicional a esto, se ha buscado adaptar dichos agentes con sistemas basados en células vivas que mejoren el sistema: microbots. El objetivo del presente trabajo fue elaborar un microbot basado en eritrocitos y nanocomplejos compuestos por: NPMF nanopartículas magnéticas fluorescentes (agente focalizador y diagnóstico), quitosán (agente protector), y el plásmido pCEM-Luc, codificante para luciferasa y que contiene un promotor que permite controlar la expresión del gen en respuesta a un campo magnético externo. NPMF y el plásmido pCEM-Luc, se utilizaron para formar nanocomplejos con quitosán por gelación iónica, a distintas condiciones de pH-TPP y radio proporcional Q:pDNA. Los nanocomplejos se unieron a la membrana de eritrocitos para formar los microbots, que posteriormente fueron caracterizados por MFA y fluorescencia, para finalmente evaluar su potencial para el envío dirigido y expresión de genes en un modelo tumoral *in vivo*. Los nanocomplejos presentaron mejores perfiles de encapsulación y liberación de pDNA con TPP-pH3.0 y radio 60:1, forma circular ovalada, con tamaño 200-250 nm, carga superficial + 14.7 mV y muy baja citotoxicidad en células B16F10. Éstos se unieron a los eritrocitos para formar los microbots, y fueron caracterizados por FMA y fluorescencia, observando nanocomplejos fluorescentes unidos a la superficie del eritrocito. Ratones C57BL/6, con previa inducción tumoral empleando células B16F10, fueron inoculados con los microbots vía intravenosa y éstos fueron guiados a tumor, a través de un campo magnético. Posteriormente, se cuantificó fluorescencia y expresión de luciferasa en órganos y tumor post sacrificio. Los análisis *in vivo* demostraron el potencial de los microbots basados en eritrocitos, al poder determinar su biodistribución, así como su eficiencia de transporte específico y expresión génica altamente significativas ( $p < 0.01$ ).

## ABSTRACT

Efforts for cancer treatment are focalized in targeted therapy, with big advances until today, however, there are still aspects to improve. Actually, strategies are based in making a synergy, combining diverse approaches, generating more efficient therapeutics agents. In addition, it has been adapting such agents to systems based on living cells to improve it: microbots. The objective of the present work was to elaborate a microbot based on erythrocytes and nanocomplex composed by FMN fluorescent magnetic nanoparticles (focusing and diagnostic agent), chitosan (protective agent), and the luciferase-encoding pCEM-Luc plasmid, which containing a promoter that allows control the gene expression in response to an external magnetic field. FMN and pCEM-Luc, were used to form nanocomplex with chitosan by ionic gelation, at different conditions of pH-TPP and proportional ratio Q:pDNA. Nanocomplex were attached to erythrocyte membrane to elaborate the microbots, which were later characterized by AFM and fluorescence, to finally evaluate their potential for targeted delivery and gene expression in a *in vivo* tumor model. Nanocomplex presented better encapsulation and pDNA release profiles with TPP-pH3.0 and 60:1 ratio, circular oval shape with 200-250 nm size, surface charge +14.7 mV. And very low cytotoxicity in B16F10 cells. These were attached to erythrocytes to form the microbots, and were characterized by AFM and fluorescence, observing fluorescent nanocomplexes attached to the erythrocyte surface. C57BL/6 mice, with previous tumor induction using B16F10 cells, were inoculated with the microbots intravenously and were guided to tumor, through a magnetic field. Later, fluorescence and luciferase expression were quantified in organs and tumor post sacrifice. *In vivo* analyzes demonstrated the potential of erythrocytes based microbots, to determine their biodistribution, as well as their efficiency of specific transport and highly significant gene expression ( $p < 0.01$ ).

## I. INTRODUCCIÓN

Las estrategias actuales para combatir el cáncer y otras enfermedades de importancia mundial, suelen presentar ciertas desventajas, ya que no son selectivas para los tejidos blanco y afectan a tejidos sanos. Los tratamientos se encuentran limitados generalmente por una ineficacia terapéutica (como consecuencia de la baja cantidad de fármaco que llega a la región de interés) y por la alta incidencia de efectos secundarios graves asociados. Por ende, es necesario implementar nuevas terapias que apunten a un objetivo primordial: un tratamiento que sea altamente efectivo que pueda ser específicamente dirigido y concentrado en el sitio en cuestión, evitando así el daño a células normales, y disminuyendo, por lo tanto, los efectos secundarios adversos.

Para solventar estas dificultades, los esfuerzos en investigación se han centrado en el descubrimiento de nuevos agentes activos específicos. Sin embargo, como consecuencia de las propiedades físico-químicas de estos fármacos, no se ha conseguido disminuir su toxicidad y mejorar su acumulación en el lugar exacto de acción ya sea a nivel celular o tisular.

Entre los enfoques utilizados en el desarrollo de dichos tratamientos se encuentran: la terapia génica, nanobiotecnología, inmunoterapia e imagenología, donde se emplean diversas herramientas para la detección, análisis, producción e inhibición de genes o proteínas, específicos de células afectadas en estas enfermedades. Las herramientas empleadas son múltiples y variadas, entre ellas el desarrollo de vacunas de DNA, anticuerpos monoclonales, y vectores para la entrega de genes o proteínas; así como el uso de terapia celular, nanopartículas magnéticas y RNA de interferencia, entre otros. La eficacia de los tratamientos varía entre uno y otro, y a pesar de que se han obtenido resultados prometedores, se requiere que éstos sean aún mejores.

Actualmente, la estrategia se basa en hacer una sinergia, combinando los diversos enfoques para lograr un envío más específico y eficiente. A partir del esfuerzo para mejorar las terapias dirigidas ya existentes, se han desarrollado nuevas alternativas que combinan los enfoques ya empleados por separado. La generación de agentes terapéuticos

mediante la combinación de distintos enfoques, se postula como sumamente eficaz para el tratamiento de patologías crónicas de elevada morbi-mortalidad, entre ellos el cáncer.

Adicional a esto, se ha buscado adaptar dichos agentes con sistemas basados en células, pues difieren en gran medida de las estructuras relativamente simples que poseen los nanoacarreadores, ya que cuentan con mecanismos más complejos que les permiten llegar a tejidos específicos, cruzar barreras no permeables fácilmente, y modular su microambiente. Esto introduce un nuevo término para nombrar a células vivas que actúan como microactuadores: microbots.

El principal objetivo del presente trabajo fue diseñar, construir, y determinar la eficacia de un microbot basado en eritrocitos, para el envío y expresión dirigida y sitio específica de genes, mediante aplicación de campos magnéticos, en un modelo tumoral *in vivo*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Terapias dirigidas

En los últimos años los esfuerzos para el tratamiento de enfermedades graves se han enfocado en tratar éstas de una manera personalizada, teniendo avances significativos hasta la fecha, con fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA), agencias en Estados Unidos y la Unión Europea, respectivamente, encargadas de la regulación de alimentos, medicamentos y productos biológicos entre otros. Esta nueva generación de fármacos se clasifica en el grupo de terapias dirigidas.

Una terapia dirigida consiste en el diseño de un fármaco capaz de modular específicamente la función de una proteína u otro componente celular, vinculado a una enfermedad en particular. Tales terapias pueden ser complementadas con un diagnóstico adecuado para obtener mayores probabilidades de que un paciente progrese favorablemente (Nature 2017). En este tipo de terapias se utilizan pequeñas moléculas que pueden introducirse en la célula o unirse a la membrana de éstas, y desencadenar o inhibir una cascada de señales, modificando así su funcionamiento. Entre el tipo de moléculas utilizadas se encuentran los inhibidores de las señales de transducción, anticuerpos monoclonales, aptámeros, vectores para la transferencia de genes, inmunomoduladores, oligos anti sentido y RNAs de interferencia, entre otras pequeñas moléculas inhibitoras.

Desde la década de los 90's comenzó la aprobación y uso de dichas terapias dirigidas, entre las más conocidas, y ampliamente usadas en la actualidad, están: Rituximab para tratar enfermedades autoinmunes y linfomas no Hodgkin, Herceptin como tratamiento para cáncer de mama, y Gleevec para el tratamiento de leucemia mieloide crónica.

Las terapias dirigidas que ya se utilizan, son generalmente mejor toleradas que los tratamientos convencionales (quimioterapia y radioterapia en cáncer, por ejemplo), sin embargo, también han estado asociadas a efectos adversos tales como cicatrización lenta, erupciones acneiformes, disfunción cardíaca, reacciones autoinmunes, trombosis, hipertensión y proteinuria, así como daño en ciertos órganos como hígado, tiroides y



riñones (American Cancer Society 2017), que, si bien son efectos menos agresivos que los de las terapias no dirigidas, siguen siendo un desafío a superar.

La combinación de las terapias dirigidas con los tratamientos convencionales ha sido una alternativa para la aplicación del tratamiento. Actualmente, se busca la combinación con otras moléculas o componentes y enfoques, que actúen en sinergia con las terapias dirigidas, pero que, a su vez, les confieran mejores cualidades de especificidad, focalización y acción. En los siguientes puntos, se abordarán los principales enfoques utilizados en terapia dirigida y la combinación de éstos.

### **2.1.1 Terapia génica**

Durante las últimas décadas, el mapeo del genoma humano, junto con un mejor entendimiento de la transducción de señales y las vías responsables de la supervivencia de células malignas, así como la gran cantidad de factores genéticos y epigenéticos que caracterizan a las células sanas de las no sanas, han contribuido a transformar los tratamientos enfocados en un objetivo promiscuo, a una terapia dirigida altamente selectiva, como lo es la terapia génica (Rao *et al.*, 2009).

La idea de usar genes con un propósito terapéutico fue inicialmente concebida a finales de los años 60s y principios de los 70s, y éste concepto de administrar ácidos en pacientes, con algún fin terapéutico, se denominó terapia génica (Abraham *et al.*, 2010). La terapia génica ya aplicada es un enfoque relativamente nuevo, con un enorme potencial terapéutico para tratar desordenes genéticos causantes de ciertas enfermedades. Se emplean secuencias específicas de genes o mediadores transcripcionales, que son introducidos en las células de un paciente, con el objetivo de reemplazar genes defectuosos o regular su expresión anormal (Navarro *et al.*, 2015).

Uno de los primeros ensayos clínicos exitosos empleando terapia génica, fue realizado en 1990 en un paciente con déficit de adenosina desaminasa (ADA) (Anderson *et al.*, 1990). Desde ese entonces y hasta la actualidad, se ha expandido el número de terapias génicas, desarrolladas para combatir tanto enfermedades monogénicas raras,

como aquellas multifactoriales y complejas más comunes (Ginn *et al.*, 2013). En la Figura 1, se muestra el número de ensayos clínicos en terapia génica aprobados por año hasta el 2016, así como una gráfica con los principales tipos de enfermedades tratadas, siendo el cáncer la principal de éstas.

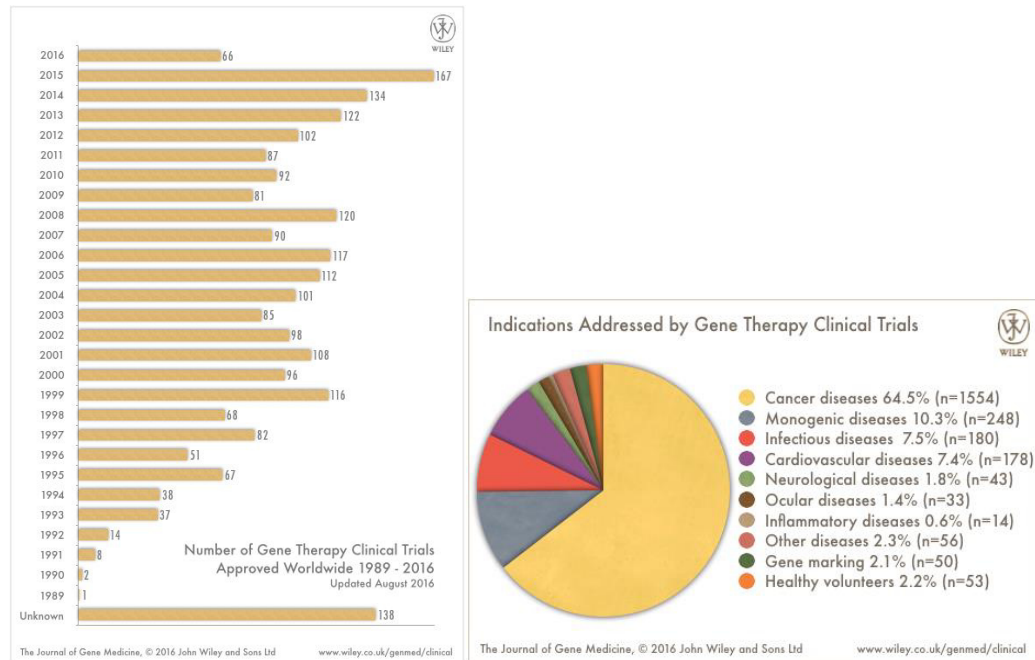


Figura 1. Ensayos clínicos en terapia génica aprobados por año hasta 2016, y principales tipos de enfermedades tratadas. (Tomado de Wiley 2017).

Según el efecto que se busque tener sobre cierto gen, la terapia génica puede ser dividida de manera general en dos categorías: potenciadora/restauradora de la función génica o inhibidora de la función génica. Dependiendo del tipo de terapia génica que se busque, es la clase de molécula nucleotídica utilizada, en el primer caso se utilizan vectores génicos como plásmidos de DNA y ciertos tipos de virus tanto de RNA como DNA, que permiten generar una proteína terapéutica; mientras que en el segundo caso se emplean pequeñas moléculas de RNA (RNA de interferencia) cuya función es inhibir el proceso post transcripcional y evitar así la expresión de cierta proteína (Navarro *et al.*, 2015).

La terapia génica que se ha desarrollado más ampliamente es la de potenciar/restaurar la función de un gen, siendo los vectores virales los mayormente empleados para dicho fin. A lo largo de la breve historia de la terapia génica se ha observado que, si bien los primeros ensayos clínicos realizados con vectores virales arrojaban resultados muy prometedores, lo cierto es que pasado el tiempo se presentaban efectos adversos severos en los pacientes sometidos al tratamiento. Tales efectos como leucemias de células T, eran resultado directo del uso de vectores virales. (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Siguiendo con lo anterior, ensayos clínicos adicionales han permitido determinar que, a pesar de que los vectores virales son altamente eficientes para introducir genes, su uso conlleva riesgos importantes, tales como recombinación endógena del virus, efectos oncogénicos en el paciente y una respuesta inmune inesperada (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003; Herzog *et al.*, 2010; Blaese *et al.*, 1995).

En base a lo anterior, muchos estudios proponen como alternativa enfocarse en emplear vectores no virales, como los plásmidos de DNA, los cuales presentan ciertas ventajas en términos de simplicidad de uso y fácil producción a gran escala, además de una mayor seguridad para el paciente. (Niidome *et al.*, 2002).

#### **2.1.1.1 Vectores de DNA plasmídico**

Un plásmido de DNA (pDNA) es una molécula de doble cadena, por lo general de origen bacteriano, extracromosómica y que confieren ventajas al hospedero en condiciones de crecimiento determinadas. Son utilizados ampliamente como vectores de clonación por su capacidad de reproducirse de manera independiente del DNA cromosomal, así como por su fácil manipulación para insertar nuevas secuencias genéticas.

Los plásmidos de DNA pueden ser adaptados con ciertas secuencias que permiten utilizarlos con fines terapéuticos. Un gen terapéutico puede ser insertado directamente en el plásmido, para que posteriormente este plásmido recombinante pueda ser introducido a las células en una variedad de formas. Adicional al gen terapéutico, los plásmidos de DNA

contienen importantes secuencias génicas, tales como elementos promotores y potenciadores, los cuales, son responsables de controlar los niveles de expresión y transcripción de la proteína codificada una vez que el plásmido es introducido en las células diana. Una de las principales ventajas de los vectores plasmídicos es que las células transfectadas pueden producir dentro de sí mismas las proteínas homogéneas, correctamente plegadas, y con modificaciones postraduccionales (Abraham *et al.*, 2010).

A pesar de las ventajas que poseen, por sí solos los vectores no virales tienen ciertos aspectos a mejorar cuando se administran solos o “desnudos”, pues aún necesitan ser mejorados en aspectos como duración de la expresión génica, pero sobre todo en eficiencia de transfección. Algunas de las técnicas con las que se ha combinado el uso de pDNA son técnicas físicas: como electroporación, pistolas de genes, ultrasonido y presión hidrodinámica, y técnicas químicas: como el uso de polímeros y lípidos que funcionan como acarreadores que protegen el pDNA, y en algunos casos permiten controlar la liberación de éste. (Niidome *et al.*, 2002).

Mejorar los métodos de entrega con un diseño inteligente del vector para lograr potenciar la eficiencia, especificidad y control temporal de los vectores es el desafío actual en la terapia génica con vectores plasmídicos (Niidome *et al.*, 2002).

### **2.1.1.2 Tipos de promotores**

Los promotores son secuencias de DNA que definen donde comienza la transcripción de un gen. Son situadas típicamente río arriba o en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción. La RNA polimerasa y los factores de transcripción necesarios se unen a la secuencia promotora e inician la transcripción. Los promotores definen la dirección de la transcripción e indican cuál hebra de DNA será transcrita. Interacciones de proteínas con el promotor regulan la actividad génica mediante la activación o represión de la transcripción (Nature 2014).

Los promotores son componentes vitales en los vectores de expresión plasmídicos, pues impulsan la transcripción del gen en cuestión, pueden determinar en qué tipo celular

se expresa dicha proteína, así como la cantidad de proteína recombinante obtenida. Existen diversos tipos de promotores, y según la finalidad de uso del plásmido que lo contenga, se emplea uno u otro tipo de promotor, los cuales de manera general se pueden clasificar en diferentes grupos:

a) Promotores virales

Los promotores virales se han incluido como componentes de los vectores plasmídicos, debido a que son considerados como promotores “fuertes”, y son ampliamente usados en áreas como biotecnología industrial y bioprocesos. Entre los promotores virales empleados, el más comúnmente usado es el derivado de citomegalovirus (CMV). La principal característica que poseen los vectores virales son los altos niveles de transcripción comparados con los promotores eucariotas, sin embargo, presentan también ciertas desventajas, pues pueden llegar a inducir hepatotoxicidad y una respuesta inmune humoral y celular, lo cual limita su aplicación *in vivo*. (Loisel *et al.*, 2001).

b) Promotores tejido específicos

Los promotores tejido específicos son promotores eucariotas endógenos, que como su nombre lo dice, activan la expresión de genes solo en ciertos tejidos. A pesar de que en términos de intensidad son inferiores a los promotores virales, tienen la ventaja de ser altamente regulados, lo cual permite que la terapia en la que se utilizan sea más específica y selectiva. Se han identificado ya promotores selectivos de tejido que pueden ser específicos para cierta enfermedad, los cuales se utilizan para dirigir la expresión de algún gen específico, mejorando la expresión *in vivo* de éste (Papadakis *et al.*, 2004).

c) Promotores inducibles por microambientes

Los promotores inducibles por microambientes pueden aprovechar los ambientes propios de cierta enfermedad, como es el caso de la isquemia e hipoxia que se generan durante el desarrollo de tumores sólidos. En estos casos se emplean elementos de respuesta a hipoxia (HRE), los cuales, al estar presentes en el promotor, permiten que éste sea reconocido y activado por el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), factor de transcripción presente en las células eucariotas que regula la expresión de genes en ambientes hipóxicos.

Múltiples grupos han utilizado HREs para generar promotores sintéticos inducibles por hipoxia. (Houston *et al.*, 1999), y se ha observado que, incluso, promotores con HREs pueden llegar a ser mucho más fuertes comparados con promotores virales fuertes como el de CMV (Shibata *et al.*, 2000).

Otro ejemplo de promotores inducibles por microambientes, son los promotores de respuesta a glucosa, en estos casos se han empleado varios promotores, como el promotor de la hexoquinasa II, enzima que cataliza uno de los primeros pasos cruciales de la glicólisis, y que se ha observado se encuentra sobre expresada en tumores sólidos, lo que ha permitido generar selectiva toxicidad sobre células tumorales comparado con células normales (Katabi *et al.*, 1999).

Un ejemplo más son los promotores derivados de la proteína GRP78, que funciona como una chaperona molecular que se une a proteínas mal plegadas y complejos no ensamblados, y la cual se induce en respuesta a bajas en las concentraciones de glucosa, hipoxia, pH ácido y estrés oxidativo (características distintivas de tumores sólidos), en estudios *in vivo* empleando éste promotor, se obtuvieron resultados prometedores, con una total erradicación del tumor en modelos murinos (Little *et al.*, 1994).

#### d) Promotores inducibles por estímulos

Por otro lado, los promotores inducibles por estímulos son aquellos que pueden ser regulados exógenamente, como su nombre lo dice, por ciertos estímulos. Entre dichos promotores se encuentran los inducibles por calor (Lee *et al.*, 2001), radiación (Marples *et al.*, 2000), por drogas, o incluso promotores con elementos de respuesta a metales (Steinwaerder *et al.*, 2000). En la Tabla 1 se incluyen ejemplos de promotores, según estímulos, cuyo potencial se ha investigado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Robson *et al.*, 2003).

Tabla 1. Promotores activados por diversos estímulos investigados para diferentes tipos de cáncer (Tomado de Robson *et al.*, 2003).

Promotor	Objetivo tumoral
<b>Promotores inducibles por radiación</b>	
Egr-1 y elementos CArG	Glioma, carcinoma hepatocelular, sarcomas de tejidos blandos,
Waf-1	Fibrosarcoma murino
RecA	Clostridia
C-IAP2	Colon
<b>Promotores inducibles por calor</b>	
HSP70B	Cáncer de mama, melanoma y próstata
Gadd 153	
<b>Promotores inducibles por drogas</b>	
MDR-1	Colon, cáncer de mama
Inducibles por tetraciclina	Cáncer de mama, melanoma, cerebral, glioma, próstata
Inducibles por rapamicina	Fibrosarcomas
Elementos de respuesta a estrógeno inducibles por Tamoxifen	Cáncer de mama

### 2.1.1.3 El promotor de HSP70

Un campo menos explorado, pero que ha recibido atención desde las últimas décadas, es el uso de promotores inducibles por campos electromagnéticos. Específicamente se han realizado investigaciones sobre el promotor del gen que codifica para la proteína de shock térmico *HSP70*, también conocido como gen de respuesta a estrés. La proteína HSP70 forma parte de una familia de polipéptidos altamente conservados, localizados en casi cualquier compartimento subcelular, desde bacterias hasta humanos. Son proteínas que funcionan como chaperonas moleculares, crucialmente involucradas en el mantenimiento de la homeostasis de proteínas y la viabilidad celular, y cuya inducción se da bajo

condiciones de temperaturas anormalmente altas u otros ambientes de estrés metabólico (Lindquist *et al.*, 1988). Entre los estímulos que inducen la expresión de estas proteínas se incluyen: radiación, metales pesados, isquemia, radicales de óxido nítrico, y similares. De manera particular, se ha reportado que el promotor del gen *HSP70* es uno de los promotores más altamente inducidos por calor (Vilaboa *et al.*, 2011), sin embargo, a pesar de que dicho promotor ha sido más ampliamente investigado en el campo de promotores inducibles por calor, se ha reportado que también puede activado por campos electromagnéticos (Lin *et al.*, 2001).

Ambas rutas de inducción (calor o campos magnéticos) involucran la unión del factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-1), a los elementos de shock térmico (HSE) presentes en el promotor. Sin embargo, la activación del promotor por campos magnéticos requiere además de tres sitios de unión adicionales: los elementos de respuesta a campos electromagnéticos (EMREs), secuencias nCTCTn localizadas en el promotor, entre las posiciones -230 a -160 río arriba del sitio de inicio de la transcripción. (Lin *et al.*, 1999). Si bien, aún no es completamente entendido cómo campos electromagnéticos débiles interactúan con el DNA para estimular la síntesis de proteínas, un importante avance es la identificación de dichas secuencias en el promotor.

Diversas investigaciones por el grupo de Lin (líderes en el campo), así como por otros investigadores, han llevado a proponer un mecanismo de interacción partiendo de las siguientes premisas: Se ha demostrado ya que los electrones se mueven en el DNA, y, datos de reacciones bioquímicas indican que los campos electromagnéticos pueden acelerar la transferencia de electrones en el DNA. Fundamentados en dichas afirmaciones tal grupo propone el siguiente mecanismo:

Los campos electromagnéticos aceleran el desplazamiento de electrones en el DNA, lo que provoca la carga transitoria de pequeños grupos de pares de bases ya identificados (elementos EMREs). En dichos sitios cargados, ocurre un desplazamiento de electrones en los puentes de hidrogeno (que, si bien recordamos, son los que mantienen unidas las cadenas de DNA para formar la doble hélice), causando así la separación de las dos cadenas y por ende el inicio de la transcripción y traducción (Goodman *et al.*, 2002).



Nuestro grupo de trabajo desarrolló un vector cuyo promotor deriva del promotor del gen *HSP70*, esto con la finalidad de controlar la expresión génica mediante campos magnéticos. El plásmido se ha probado tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*, demostrando ser una opción prometedora en terapia dirigida para el tratamiento de cáncer pulmonar (Rodríguez *et al.*, 2009; Alvizo *et al.*, 2014, 2016).

### **2.1.2 Envío dirigido de fármacos**

El envío dirigido de fármacos es un campo multidisciplinario que abarca áreas en el campo de la química, ciencias farmacéuticas, medicina e ingeniería. Depende principalmente de la formulación química de la droga, forma de dosificación y vía de administración. Éste enfoque aminora los problemas de administración convencional, al potenciar la solubilidad de la droga, prolongar el tiempo de duración, reducir los efectos secundarios y retener la bioactividad del fármaco.

Hoy en día, se ha mejorado la biodisponibilidad, potenciado la captación, preservado la concentración del fármaco, controlado la tasa de liberación, y reducido los efectos secundarios al liberar el fármaco en las células diana. Lo anterior se ha logrado mediante el uso de biopolímeros de distintas composiciones (Gopi *et al.*, 2016).

#### **2.1.2.1 Biopolímeros**

Generalmente, el término “biopolímero” se refiere a todos los polímeros sintetizados por organismos vivos, que consisten en largas cadenas compuestas de unidades repetidas y covalentemente unidas, unidades tales como nucleótidos, aminoácidos o monosacáridos.

Los biopolímeros abarcan desde polinucleótidos (ácidos nucleicos de DNA y RNA), hasta polipéptidos (proteínas) o polisacáridos (carbohidratos poliméricos) (Nature 2017). Si bien se consideran estos tres tipos de polímeros dentro de la definición teórica,

en el campo del envío dirigido de fármacos el término es más comúnmente empleado para referirse a biopolímeros de tipo polisacáridos.

Los polisacáridos son biopolímeros compuestos de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos, que, debido a su disponibilidad, multiplicidad de estructuras y connotación ecológica, son ampliamente usados en aplicaciones que van desde áreas tecnológicas a biomédicas. Entre los polisacáridos más empleados se encuentran el quitosán, alginato, ácido hialurónico, dextrán y celulosa (Vilela *et al.*, 2016).

En los últimos años se ha incrementado la atención en los biopolímeros catiónicos debido a sus destacadas propiedades físicas y biológicas (Liu *et al.*, 2008), entre sus ventajas se encuentran: alta estabilidad, tamaño bien definido y bajo índice de polidispersidad, y gran variedad de pesos moleculares, arquitecturas (linear, ramificada, dendrímica), y grupos funcionales (Navarro *et al.*, 2015). A la fecha, los polímeros catiónicos más empleados y que han mostrado mejores resultados en el envío dirigido son la polietilenimina (PEI), poli-L-lisina (PLL) quitosán y dendrímeros poliamidoamina (PAMAM). Dichas moléculas pueden ser elaboradas por distintos métodos, entre los que se incluyen electrospinning, coacervación, nanoprecipitación, inyección, deposición capa por capa, y gelación iónica.

La mayor aplicación de los biopolímeros es encapsular, proteger y liberar moléculas activas (Neffe *et al.*, 2013).

### **2.1.2.2 Quitosán**

El quitosán es un polisacárido catiónico natural derivado de la quitina, presente en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y algunos hongos, y es considerado como el segundo polisacárido más ubicuo en la tierra después de la celulosa (Duttagupta *et al.*, 2015). Este biopolímero lineal está compuesto por unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa (D-glucosamina) (GlcN) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranososa(N-acetyl-D-glucosamina) (GlcNAc) disponibles a diferentes grados, dependiendo del grado de residuos acetilados (Hoppe *et al.*, 1994.), y es obtenido por la

N-desacetilación termoquímica de la quitina en condiciones alcalinas (Tømmeraas *et al.*, 2002). Las condiciones usadas en el proceso de desacetilación determinan el peso molecular y el grado de desacetilación del quitosán obtenido.

Dicho proceso es realizado debido a que la quitina es pobremente soluble en medios acuosos y solventes orgánicos, por lo que no se le puede dar una aplicación práctica, a diferencia del quitosán, su variante artificial que es más adecuada para bioaplicaciones útiles (Mima *et al.*, 1983). Una ventaja a destacar es que en el mundo se cosechan anualmente varios millones de toneladas de quitina, lo que representa una fuente barata y fácilmente disponible para la obtención de quitosán.

Hablando específicamente del quitosán, los grupos amino primarios activos en la molécula, que son reactivos, proporcionan sitios para la unión de una gran variedad de grupos laterales empleando condiciones de reacción suaves. De manera adicional, características como ser catiónico, hemostático e insoluble a pH alto, pueden ser revertidos por sulfatación del grupo amino, lo que hace que la molécula sea aniónica y soluble en agua, con la inserción de propiedades anticoagulantes (Dash *et al.*, 2011).

Se ha observado que la degradación del quitosán incrementa a medida que disminuye el grado de desacetilación, y que la cinética de degradación está inversamente relacionada con el grado de cristalinidad, controlado principalmente por el grado de desacetilación (Kurita *et al.*, 2000).

Se sabe además que el quitosán es degradado en vertebrados predominantemente por lisozimas y ciertas enzimas bacterianas presentes en el colon (Kean *et al.*, 2009). Ocho quitinasas humanas han sido identificadas, tres de las cuales han mostrado actividad enzimática. Tanto la tasa como el grado de biodegradabilidad del quitosán en organismos vivos, son dependientes del grado de desacetilación, con una disminución en la tasa de degradación cuando hay un aumento del grado de desacetilación (Yang *et al.*, 2007).

Básicamente, con el tiempo adecuado y las condiciones apropiadas, el quitosán en la mayoría de los casos se degrada lo suficiente como para ser excretado (Kean *et al.*, 2009). Y a pesar de que el mecanismo de degradación no es del todo claro, estudios indican que la distribución, degradación y eliminación del mismo, son dependientes en

gran medida del peso molecular que presente. Se ha encontrado que el hígado y bazo son los posibles sitios encargados de la degradación debido a la localización de quitosán en ellos (Dash *et al.*, 2011).

El uso del quitosán está aprobado para aplicaciones dietéticas en Japón, Italia y Finlandia y ha sido aprobado por la FDA para su uso como procoagulante tópico en vendajes y otros agentes antihemorrágicos (Dash *et al.*, 2011). En los últimos años se ha explorado su uso como potencial agente para el envío dirigido de fármacos.

A diferencia de otros polímeros naturales, la carga catiónica que posee el quitosán es la responsable de sus interesantes propiedades físicas y químicas. Ha sido ampliamente explotado por su carácter mucoadhesivo, y propiedades de potenciar la permeabilidad y liberación controlada de fármacos. Además, sus propiedades no tóxicas, biocompatibles y biodegradables revisadas anteriormente lo vuelven un excelente candidato para sistemas de envío de fármacos (Lee *et al.*, 1995). Otro aspecto importante en su uso para terapia dirigida, es que se ha reportado también que puede ser inmunoestimulante (Nishimura *et al.*, 1986).

Algunas de las aplicaciones actuales del quitosán son en áreas como oftalmología, nasal, bucal, sublingual, gastro-retentivo, pulmonar, transdérmica, colon específico y vaginal (Duttagupta *et al.*, 2015). Y en enfoques de investigación, en algunos estudios se ha buscado usarlo como un excipiente en diferentes formulaciones, tales como tabletas y micro y nano partículas con buenos resultados (Dash *et al.*, 2011).

### **2.1.3 Nanobiotecnología**

Otro enfoque con prometedoras aplicaciones en el ámbito de las terapias dirigidas es la Nanobiotecnología, campo que ha tenido una rápida expansión en los últimos años. Esta ciencia abarca el desarrollo de materiales hechos por el hombre con un rango de tamaño de 5-200 nanómetros, dimensiones que exceden ampliamente a las que presentan las moléculas orgánicas estándar (agua ~0.16 nm, benceno ~0.43 nm por citar algunas), aun

así, su rango es más bajo que el de muchas proteínas y macromoléculas biológicas (Faraji y Wipf 2009).

La nanobiotecnología aplicada para terapias dirigidas consiste en el desarrollo de nanoestructuras que encapsulan fármacos y/o funcionan como acarreadores, las estructuras están principalmente basadas en polímeros o lípidos, pero también se han investigado algunas nanopartículas inorgánicas como potenciales nanoacarreadores (Wang *et al.*, 2014).

El potencial de los sistemas de envío de drogas basados en el uso de nano y macropartículas, parte de ventajas significativas tales como: la habilidad de llegar a localizaciones específicas en el cuerpo; la reducción de la cantidad de droga necesaria para alcanzar una dosificación terapéutica óptima, y lograr una concentración particular en el área del sitio blanco; reducción de la concentración de la droga en los sitios no blanco, minimizando así efectos secundarios adversos y proveer una protección contra la degradación del mismo (Chomoucka *et al.*, 2010; Faraji y Wipf 2009).

Debido a alentadores esfuerzos para controlar la liberación, el uso de nanopartículas involucra mayores desafíos, incluyendo su rápida desaparición de circulación en sangre y la mejora en su focalización (Alexis *et al.*, 2008).

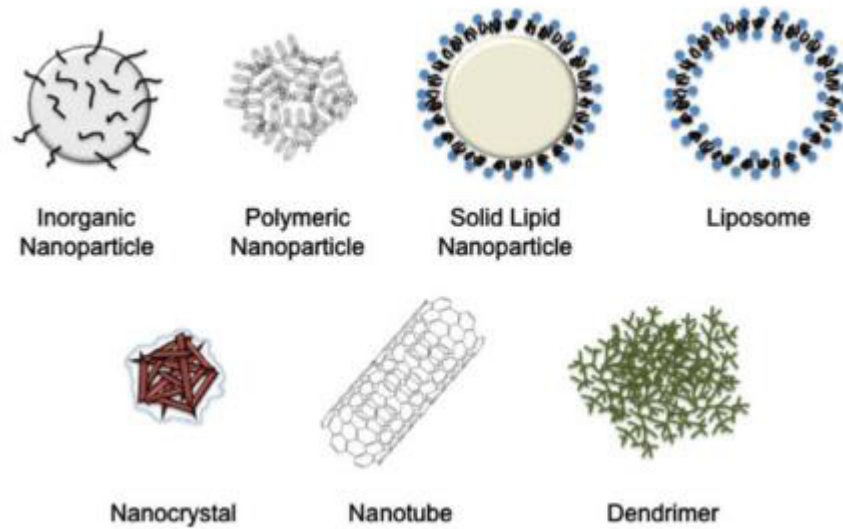


Figura 2. Tipos de nanopartículas usadas en investigación biomédica y envío dirigido. (Tomado de Faraji y Wipf 2009).

Existen diferentes tipos de nanopartículas según el material del que estén fabricadas (mostradas en la figura 2), entre ellas se encuentran:

**Nanopartículas inorgánicas:** cuya composición es generalmente de sílice, aluminio, óxidos y sulfuros metálicos, entre otros. Son relativamente estables en amplios rangos de temperatura y pHs, sin embargo, su falta de biodegradación y lentas tasas de disolución elevan las cuestiones de bioseguridad especialmente para administraciones a largo plazo. Para resolver estos inconvenientes se busca emplear materiales biocompatibles (Faraji y Wipf 2009).

**Nanopartículas poliméricas:** la mayoría son biodegradables y biocompatibles, y se han posicionado como las ideales para el envío dirigido de fármacos. Poseen un buen potencial para la modificación de su superficie a través de transformaciones químicas, proporcionan un excelente control farmacocinético, y son adecuadas para la protección y envío de una amplia gama de agentes terapéuticos. Entre los materiales con que se fabrican se encuentran: gelatinas, quitosán, copolímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA), polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico, entre otros. Además, las cubiertas basadas en biopolímeros pueden ser combinadas con otro tipo de

nanopartículas para modificar y mejorar sus propiedades de biodistribución (Faraji y Wipf 2009).

Nanopartículas de lípidos sólidos: son acarreadores coloidales basados en lípidos, diseñados a principios de los 90s como una alternativa a los liposomas y emulsiones. La principal ventaja es su mayor estabilidad, comparado con liposomas, en sistemas biológicos, esto debido a su núcleo relativamente rígido, el cual consiste de lípidos hidrofóbicos que son sólidos a la temperatura ambiente y corporal, rodeados por una monocapa de fosfolípidos. Poseen parámetros farmacocinéticos controlables y pueden ser diseñados con tres tipos de núcleos hidrofóbicos: una matriz homogénea, una envoltura acomplejada con fármaco, o un núcleo acomplejado con fármaco (Faraji y Wipf 2009).

Nanocristales: son agregados de moléculas que pueden ser combinados en una forma cristalina del fármaco rodeadas por una delgada cubierta de surfactante. Su aplicación en área biológica es más en términos de imagenología (Quantum dots). Pueden ser preparados a partir de un compuesto hidrófobo y revestirse con una capa hidrofílica delgada, la cual contribuye a la biodistribución y biodisponibilidad del fármaco, lo que representa una gran ventaja cuando se trabaja con fármacos poco solubles. Sin embargo, el principal inconveniente es la limitada estabilidad de los nanocristales, además del obvio proceso de cristalización requerido, lo que representa un inconveniente cuando se trabaja con fármacos que no pueden ser fácilmente cristalizados (Faraji y Wipf 2009).

Nanotubos: son hojas autoensambladas de átomos organizados en tubos. Pueden ser de composición orgánica o inorgánica, y ser producidos como estructuras de una o múltiples paredes. Una de las versiones más conocidas de los nanotubos involucra el uso de derivados de fullerenos solubles, tales como C<sub>60</sub>. Los nanotubos tienen grandes volúmenes internos y su superficie externa puede ser fácilmente funcionalizada. Aunque son potencialmente prometedores para aplicaciones farmacéuticas, la tolerancia humana a estas nanopartículas permanece desconocida, y los informes de toxicidad son contradictorios (Faraji y Wipf 2009).

### 2.1.3.1 Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas pertenecen a la clase de nanopartículas inorgánicas, cuyo tamaño es  $<100$  nm. Estas nanopartículas están compuestas comúnmente de elementos magnéticos tales como: Hierro, Níquel y Cobalto, así como sus óxidos, Magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), Maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), Ferrita de Cobalto ( $\text{Fe}_2\text{CoO}_4$ ), y Dióxido de Cromo ( $\text{CrO}_2$ ). Debido a su composición, éstas pueden ser manipuladas bajo la influencia de un campo magnético externo (Indira y Lakshmi 2010). Cuando son empleadas para enfoques biomédicos, por lo general dichas nanopartículas son elaboradas con materiales biocompatibles como la magnetita.

Las aplicaciones de las nanopartículas magnéticas han sido ampliamente estudiadas con diversos objetivos: se utilizan ya como agentes de contraste magnéticos en imagen de resonancia magnética (MRI), han sido utilizadas para tratamientos de hipertermia inducida magnéticamente (Hilger *et al.*, 2002), se ha explorado su uso para potenciar magnéticamente la transfección de células, y se ha propuesto emplearlas como vectores en terapia génica magnéticamente asistida, e ingeniería de tejidos basada en fuerzas magnéticas, para que puedan ser dirigidas hacia una determinada posición (Corchero y Villaverde 2009).

Para mejorar su uso en algunas aplicaciones biomédicas, se emplean en combinación con otros materiales para crear nanopartículas con un núcleo metálico o de óxido metálico, encapsulado con una cubierta polimérica o inorgánica que hace que las nanopartículas sean biocompatibles, estables, y puedan servir como soporte para biomoléculas (Arruebo *et al.*, 2007). En estudios *in vitro* se ha empleado el uso de nanopartículas magnéticas para mejorar las terapias génicas, Hofmann y colaboradores en 2009 combinaron vectores lentivirales y nanopartículas magnéticas para mejorar la transferencia de genes.

Se han llevado a cabo estudios *in vivo* donde se combinan diferentes aspectos, Kubo y colaboradores en 2000 emplearon liposomas magnéticos de 146 nm para el envío dirigido de doxorubicina en un modelo de osteosarcoma en hámsters, la terapia



administrada vía intravenosa y dirigida con ayuda de un campo magnético de 0.4 Teslas mostró una entrega efectiva y dirigida del tratamiento.

Se han empleado también en experimentos de trasplante de células madre, en 2012 Cheng y cols. en 2012 emplearon nanopartículas magnéticas para dirigir y mejorar la retención de células madre en un modelo de isquemia en ratas, observando que al emplear las nanopartículas se dirigían y retenían las células en el sitio de la lesión, lo que mejoraba los resultados de la terapia.

### **2.1.3.2 Nanopartículas de quitosán**

Las nanopartículas de quitosán son catalogadas dentro del grupo de nanopartículas poliméricas. Para la elaboración de dichas partículas se emplean diferentes métodos, entre ellos: emulsión por entrecruzamiento, coacervación/precipitación, secado por aspersión, gelación iónica y coalescencia de gotas en emulsión (Dash *et al.*, 2011), siendo el método de gelación iónica uno de los métodos más empleados, debido a la simplicidad con que se realiza.

Un entrecruzamiento físico reversible por interacción electrostática (como lo es el método de gelación iónica), a diferencia del entrecruzamiento químico, disminuye el potencial impacto tóxico de los reactivos, así como otros efectos indeseables, pues no involucra el uso de solventes orgánicos o altas temperaturas. Las ventajas anteriores, hacen de dicho método eficiente y seguro para la producción de nanopartículas acomplejadas con agentes terapéuticos sensibles, como proteínas, péptidos, hormonas, vacunas y ácidos nucleicos (Ahmed y Aljaeid 2016).

Para la elaboración de nanopartículas de quitosán por el método de gelación iónica, se emplea tripolifosfato de sodio (TPP), el cual es un agente entrecruzante polianiónico con grupos cargados negativamente, que interactúa electrostáticamente con los grupos amino cargados positivamente del quitosán, por ser éste de naturaleza catiónica. El quitosán es disuelto en una solución acuosa ácida, la cual cuaterniza los grupos amino de éste haciéndolo soluble, y es entonces añadido gota a gota a la solución de TPP

manteniendo constante agitación durante el proceso. La interacción entre especies de carga opuesta provoca que el quitosán experimente una gelación iónica y precipite entonces como micro o nano partículas esféricas (Dash *et al.*, 2011).

Después de que Bodmeier y cols. en 1989 reportaran la preparación de complejos de TPP-Quitosán, mediante la adición de quitosán por goteo en una solución de TPP, muchos investigadores han empleado y mejorado ésta técnica para la preparación de micro y nanopartículas de quitosán con potencial farmacéutico, modificando y agregando metodologías para volver el método más sencillo (Calvo *et al.*, 1997).

En el 2004 Dastan y Turan elaboraron micropartículas de quitosán y DNA, obteniendo perfiles de liberación de DNA prolongada, con potencial de transfectar el DNA en diferentes tipos de líneas celulares.

Una clase especial de nanopartículas “combinadas”, son las nanopartículas magnéticas de quitosán, las cuales han sido desarrolladas para diversas aplicaciones, como el envío dirigido de fármacos anticancerígenos y radioterapia a tejidos específicos. En dicho enfoque, nanopartículas magnéticas son acomplejadas con quitosán para poder inyectarse por vía sanguínea, y focalizarse y retenerse en el sitio diana aplicando un campo magnético externo (Ahmed y Aljaeid 2016).

En un estudio publicado en 2014, Alvizo y colaboradores emplearon nanopartículas magnéticas de quitosán como sistemas de envío dirigido de plásmidos a pulmón en un modelo murino, concluyendo que estos complejos eran eficientes sistemas de entrega tanto para la transfección *in vitro* de células, así como la entrega *in vivo* en tejido pulmonar.

### **2.1.3.3 Farmacocinética de nanopartículas**

Un aspecto importante a considerar durante el uso de nanopartículas de cualquier tipo de material, es su farmacocinética, la cual abarca procesos de distribución, remoción o excreción, y toxicidad.

Para la cuestión de biodistribución y remoción o excreción, se deben tomar en cuenta los mecanismos naturales de eliminación y excreción del cuerpo humano, los cuales proporcionan el marco base para el diseño racional de nanopartículas eficientes. Una vez que algún agente farmacéutico se introduce al cuerpo, por vía intravenosa por ejemplo, se distribuye sistemáticamente a través de los sistemas vascular y linfático. La distribución de un fármaco en un tejido está correlacionada con la cantidad relativa de flujo sanguíneo que pasa por dicho tejido, por lo que tejidos y órganos con un alto flujo sanguíneo (cerebro, hígado, corazón, intestinos, pulmones, riñones y bazo) pueden ser expuestos a mayores concentraciones de una droga (Faraji y Wipf 2009). En la figura 3 se muestran las rutas que pueden seguir las nanopartículas según la vía de administración empleada.

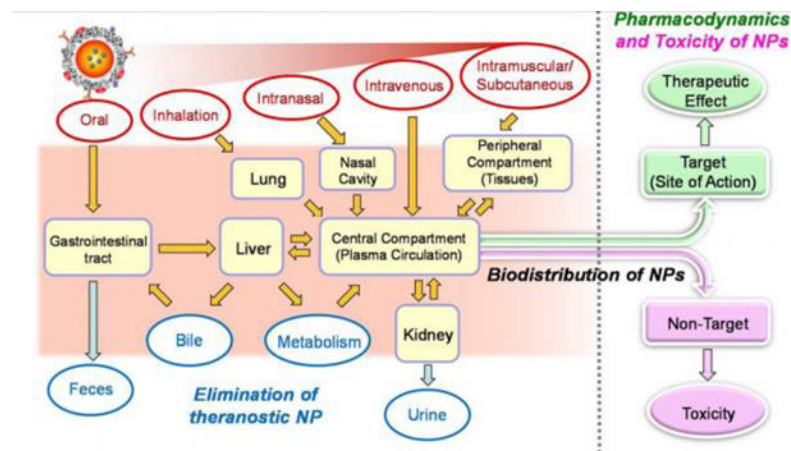


Figura 3. Rutas de absorción, biodistribución y eliminación de nanopartículas según la vía de administración empleada. (Tomado de Kang *et al.*, 2015).

Cuando se emplean para terapia tumoral, se pueden distinguir tres fases principales en la ruta de biodistribución de las nanopartículas, las cuales se muestran en la Figura 3. Las nanopartículas inyectadas vía intravenosa deben evadir su eliminación renal y por el sistema reticuloendotelial, sistema global de macrófagos en hígado, bazo y medula ósea, y con respecto a eliminación de nanopartículas, los activos son el hígado y bazo. Posteriormente, las nanopartículas deben permanecer estables en plasma durante la circulación sistémica para poder interactuar con el tumor. Finalmente, una vez que las

nanopartículas se extravasan al compartimiento tumoral, deben viajar a través del estroma, contra gradientes de alta presión intersticial, y finalmente interactuar con las células diana. (Ernsting *et al.*, 2013).

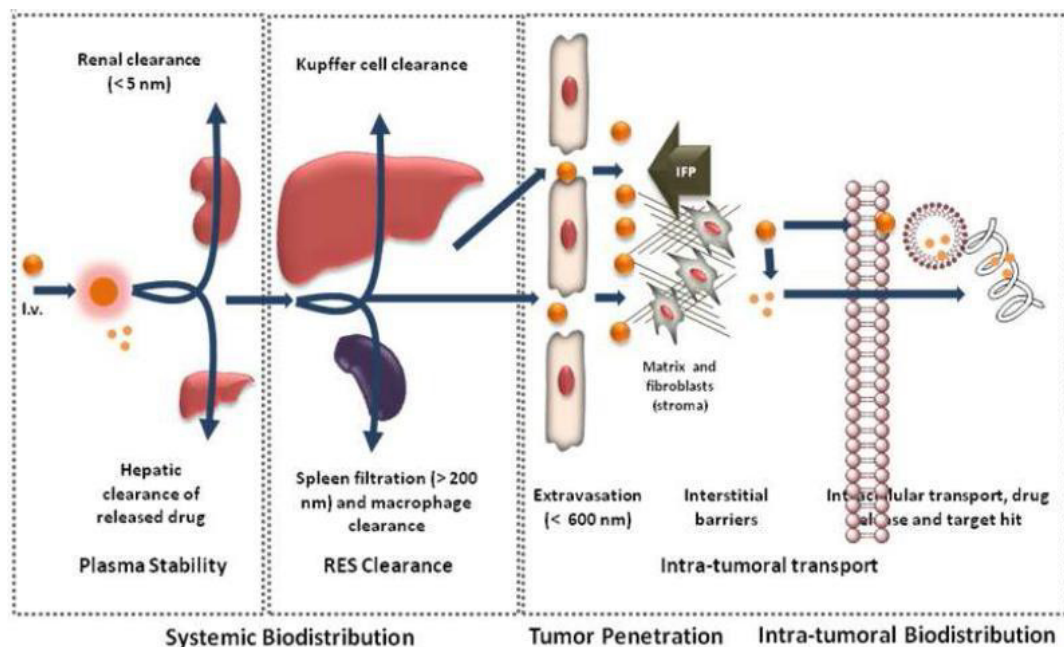


Figura 4. Fases de biodistribución de las nanopartículas empleadas en terapia tumoral. (Tomado de Ernsting *et al.*, 2013).

Un aspecto importante a tomar en cuenta es el tamaño de las nanopartículas, el cual influye en perfil de biodistribución de éstas una vez que ingresan al cuerpo. Se ha reportado ya, que nanomateriales en el orden de 1-20 nm poseen largos tiempos de permanencia en circulación, así como una extravasación más lenta de los espacios vasculares a los espacios intersticiales (Winter *et al.*, 2003). Cuando el medicamento es administrado por inyección local, se requieren diseños de nanopartículas de tamaños ligeramente mayores, en el orden de 30-100 nm, rango de tamaño suficiente para evitar la fuga en capilares, pero también lo suficientemente pequeño para evitar la remoción reticuloendotelial y fagocítica (Moghimi *et al.*, 2003). Es ya conocido que micro y nanopartículas de tamaños mayores ( $\sim 6 \mu\text{M}$ ) tienden a permanecer localizadas en el sitio de administración cuando no son inyectadas vía sistémica, y que las de menor tamaño pueden ser eliminadas completamente (Faraji y Wipf 2009). Por otro lado, cuando son

administradas sistémicamente por vía intravenosa, pueden ser eliminadas por el sistema reticuloendotelial, en un proceso que es facilitado por la deposición superficial de factores opsonicos y proteínas del complemento sobre las mismas nanopartículas (Cherukuri *et al.*, 2004). Tanto la eliminación como la opsonización, son influenciadas por el tamaño y las características de superficie de las nanopartículas, cuando el diámetro de éstas es mayor de 200 nm, el sistema del complemento se activa más eficientemente y son eliminadas más rápido que nanopartículas más pequeñas (Emerich y Thanos 2007).

Respecto a la toxicidad de las nanopartículas, se han observado varios aspectos: cuando son administradas sistémicamente por vía sanguínea, considerar el diámetro de la vasculatura es importante, pues partículas  $>5 \mu\text{m}$  de diámetro pueden embolizar vasos sanguíneos. También, nanopartículas  $<100\text{nm}$  tienen una alta probabilidad de agregación, lo que ocasiona la formación de clusters que pueden embolizar y ocluir los vasos sanguíneos (Faraji y Wipf 2009).

Un punto importante es la toxicidad cardiovascular y pulmonar de nanopartículas menores a 100 nm cuando éstas son inhaladas, pudiendo promover la inflamación y daño por radicales libres cuando hay exposición a altas dosis de manera crónica. Lo anterior, ha sido asociado y correlacionado por resultados de estudios epidemiológicos sobre nanomateriales y partículas ultra finas, presentes en atmosferas de ciudades muy contaminadas, así como en estudios *in vivo* empleando nanopartículas marcadas, en donde se observa la translocación de nanopartículas de  $\sim 50\text{nm}$  de la mucosa nasal al bulbo olfatorio en cerbero, además de una distribución no libre en citoplasma, sino de manera preferencial en mitocondria (Hoye *et al.*, 2004; Oberdörster *et al.*, 2004).

En estudios adicionales se ha observado que al ingresar a la célula y acumularse en las mitocondrias, nanopartículas metálicas pueden afectar la función de éstas, alterando la cadena de transporte de electrones, provocando así estrés oxidativo (Nguyen *et al.*, 2015). Los diversos efectos tóxicos de diferentes tipos de nanopartículas se muestran en la figura 5.

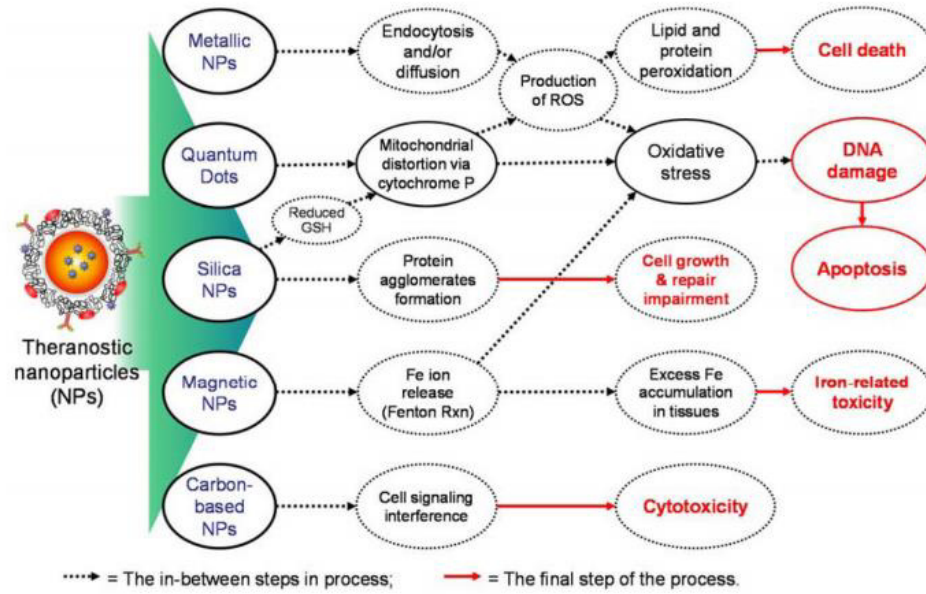


Figura 5. Mecanismos de toxicidad de diferentes tipos de nanopartículas. (Tomado de Kang *et al.*, 2015).

Finalmente, el punto restante a considerar es la internalización de las nanopartículas. Todos los tipos de células del cuerpo utilizan el proceso de endocitosis para comunicarse con su microambiente, dicho proceso es dependiente de energía, y a través de éste las células internalizan nutrientes, iones y biomoléculas. Las diferentes vías de endocitosis se clasifican típicamente en endocitosis mediada por receptores (clatrina y caveolina), fagocitosis, macropinocitosis y pinocitosis.

Muchos tipos de células usan las vías de endocitosis mediadas por clatrina y caveolina para internalizar materiales a nanoescala, incluyendo virus y nanopartículas. Dichas vías de endocitosis son las más importantes para la internalización de nanopartículas en las células, esto porque las nanopartículas pueden estar recubiertas directamente con proteínas plasmáticas, lo que les permitiría ser internalizadas más fácilmente (Oh *et al.*, 2014). La eficiencia de endocitosis de nanopartículas es entonces dependiente de las propiedades fisicoquímicas de éstas, tales como tamaño, forma y superficie química, así como carga superficial.

### 2.1.4 Magnetoterapia

Un enfoque con gran potencial e investigado en los últimos años en el área de las terapias dirigidas, es el uso de campos magnéticos para dar dirección y focalización a una terapia.

Un campo magnético es una línea invisible de fuerza, una región en el espacio en la cual una carga eléctrica puntual, que se desplaza a cierta velocidad, sufre los efectos de una fuerza que es perpendicular y proporcional, tanto a la velocidad como al campo. Puede decirse que es un campo vectorial (que posee intensidad y dirección) el cual puede ejercer una fuerza magnética sobre cargas eléctricas en movimiento y sobre dipolos magnéticos (como magnetos permanentes) (ICNIRP, 2009).

El magnetismo se encuentra estrechamente relacionado con la electricidad. Una carga eléctrica está rodeada de un campo eléctrico, y también de un campo magnético si se está en movimiento, esto se debe a las distorsiones que sufre el campo eléctrico al moverse la partícula (Rodríguez *et al.*, 2008). Dicho de otra manera, mientras que los campos eléctricos están asociados con la presencia de carga eléctrica, los campos magnéticos resultan del movimiento físico de la carga eléctrica (corriente eléctrica). Del mismo modo, los campos magnéticos pueden ejercer fuerzas físicas sobre cargas eléctricas, pero sólo cuando tales cargas están en movimiento (ICNIRP, 2009).

Un campo magnético puede ser representado como un vector y especificarse de dos maneras: como la densidad de flujo magnético (B) o la intensidad del campo magnético (H), dichas magnitudes son expresadas en Teslas (T) y Amperes por metro ( $A\ m^{-1}$ ), respectivamente. Para describir un campo magnético en el aire o materiales no magnéticos (incluyendo materiales biológicos) con una aproximación adecuada, solo es necesario especificar una de las dos magnitudes medias, B o H (ICNIRP, 2009).

La densidad de flujo magnético (H) es aceptada como la medida más relevante para medir efectos de campos magnéticos. Es representada en Teslas (T) en el Sistema Internacional de Unidades, y en Gauss (G) en el Sistema Cegesimal de Unidades, siendo la equivalencia entre ambas unidades de la siguiente forma:  $1\ T = 10\ 000\ G$  (ICNIRP, 2010).

### 2.1.2.1 Intensidad y efectos de la exposición a campos magnéticos

Los seres humanos estamos diariamente expuestos a campos magnéticos, comenzando por el campo estático natural de la Tierra, el cual oscila entre  $\sim 50 \mu\text{T}$ , y varía de  $30 \mu\text{T}$  a  $70 \mu\text{T}$  dependiendo de la localización geográfica. Densidades de flujo magnético de  $\sim 20 \mu\text{T}$  son producidas por líneas de transmisión de alto voltaje en corriente continua. Entre otras fuentes de exposición a campos magnéticos estáticos en ambientes residenciales y ocupacionales, se incluyen: pequeños imanes permanentes en clips y accesorios magnéticos (como bolsos, botones, collares, pulseras y cinturones) así como algunos juguetes o artículos de decoración, los cuales generan campos estáticos locales de más de  $0.5 \text{ mT}$  (ICNIRP, 2009).

Podría considerarse que la mayor exposición no ocupacional que puede experimentar una persona, ocurre en aquellos pacientes sometidos a exámenes diagnósticos por resonancia magnética (MR), una técnica que es ampliamente utilizada para obtener imágenes internas del cuerpo y tener así información diagnóstica sobre ciertas enfermedades o estados patológicos. En los procedimientos de MR las densidades de flujo magnético utilizadas varían de  $0.15 \text{ T}$  a  $3 \text{ T}$  y la exposición suele limitarse de menos de una hora a unas pocas horas (Gowland *et al.*, 2005)

Existen organismos en todo el mundo que se encargan de regular y emitir guías de límites de exposición a campos magnéticos. En Estados Unidos no hay límites federales, sin embargo, algunos estados regulan sus propios límites (ej. Florida y Minnesota) (Kheifets, 2001), y otros más se guían por límites recomendados por la OMS. En Reino Unido, la regulación para exposiciones ocupacionales se basa en la Comisión Internacional de Protección contra Radiaciones no Ionizantes (ICNIRP) (organización científica independiente, cuyo objetivo es proporcionar orientación y asesoría sobre los riesgos para la salud de la exposición a radiaciones no ionizantes), mientras que para exposiciones no ocupacionales se basa en los límites recomendados por la Unión Europea. Europa en general, se regula tanto por los límites recomendados por la Unión Europea, como por una directriz publicada en 2013, la cual se basa estrechamente en las directrices



publicadas por la ICNIRP en 2010. La mayoría de los países del resto del mundo se rigen por las directrices de la ICNIRP.

La ICNIRP, a través de la recopilación de información de una gran cantidad de estudios, *in vitro* e *in vivo*, así como epidemiológicos en seres humanos, ha precisado que los efectos agudos por exposición a campos magnéticos estáticos pueden ocurrir cuando hay movimiento en el campo, como el movimiento de una persona o el movimiento de un cuerpo interno (flujo sanguíneo o el latido del corazón). Una persona que se mueve dentro de un campo por encima de 2 T en un ambiente laboral, puede experimentar sensaciones de vértigo y náuseas, y a veces un sabor metálico en la boca. Aunque tales efectos sólo son temporales, pueden tener un impacto en cuestión de seguridad para los trabajadores que ejecutan procedimientos delicados. Lo anterior fue determinado por un estudio realizado en trabajadores dedicados a la fabricación de equipos de Imagenología de Resonancia Magnética (IRM), de intensidad de 1.0 T y 1.5 T (de Vocht *et al.*, 2006).

Los campos magnéticos estáticos ejercen fuerzas sobre las cargas móviles en la sangre, como los iones, generando campos eléctricos y corrientes alrededor del corazón y los vasos sanguíneos principales, que pueden impedir ligeramente el flujo de sangre. Los posibles efectos van desde cambios menores en los latidos, hasta un aumento en el riesgo de ritmos cardíacos anormales (arritmia) que pueden poner en peligro la vida (tal como la fibrilación ventricular). Sin embargo, estos tipos de efectos agudos son sólo probables dentro de campos de más de 8 T (ICNIRP, 2009).

Aún no es posible determinar si hay consecuencias para la salud a largo plazo, incluso de la exposición en el rango de milliteslas porque, hasta la fecha, no hay estudios epidemiológicos o de animales a largo plazo realizados de la manera correcta. Por lo tanto, no se ha clasificado a los campos magnéticos estáticos como agentes causales de carcinogenicidad en seres humanos.

Los límites de exposición establecidos por la ICNIRP en 2009, tanto para exposición ocupacional como no ocupacional, se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Límites de exposición a campos magnéticos estáticos, establecidos por la ICNIRP (ICNIRP, 2009).

<b>Características de exposición</b>	<b>Densidad del flujo magnético</b>
Ocupacional	
Exposición de cabeza y tronco	2 T
Exposición de extremidades	8 T
Publico general	
Exposición de cualquier parte del cuerpo	400 mT

## 2.2 Microbots

Con todos los antecedentes anteriores podemos destacar que, si bien los sistemas de envío dirigido cada vez se perfeccionan más, aún existen aspectos que se deben cubrir totalmente, como la biocompatibilidad y especificidad de éstos. Respecto a lo anterior, desde las últimas décadas se han explorado diversos escenarios en la mejora de los sistemas de envío terapia y diagnóstico, entre ellos, como ya se mencionó, se encuentra la combinación de los diferentes enfoques ya empleados, que prometen un gran avance en el campo de la medicina personalizada y terapia dirigida.

Dentro del desarrollo de agentes terapéuticos, se ha generado gran expectativa en los sistemas basados en células, que han sido ya investigados gracias a sus ventajas sobre los sistemas sintéticos (Tanaka *et al.*, 2007). Para superar los obstáculos de los nanoacarreadores se ha buscado utilizar células como vectores, pues difieren en gran medida de las estructuras relativamente simples que poseen los nanoacarreadores, ya que cuentan con mecanismos más complejos que les permiten llegar a tejidos específicos, cruzar barreras no permeables fácilmente, y modular su microambiente.

Debido a esas características únicas, las células vivas se han considerado como una nueva clase de vectores con alta especificidad y persistencia prolongada (Wang *et al.*, 2014). Células bacterianas y humanas, con y sin modificaciones genéticas, han sido investigadas para dicho fin, aunque por lo general dichas células terapéuticas son

modificadas genéticamente para expresar proteínas que sirvan como agentes terapéuticos (Wurm 2004). Entre las células candidatas que se están empleando se encuentran tanto células eucariotas, como células procariotas.

El término empleado para referirse a estas células que son utilizadas como acarreadores o vectores es “microbots” o “microrobots”, que si bien, el término puede remitirnos a pensar en una máquina con un sistema de circuitos y sensores, éste se refiere más al origen etimológico de la palabra robot: derivada del checo *robota*, que significa “labor forzada”. Y se describe como algo que puede ser controlado y manipulado para realizar un trabajo. Entre las principales características que poseen los microbots están la biocompatibilidad y la capacidad de auto-actuación. (Tanaka *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2014).

Los microbots, deben ser sistemas compuestos por diversos elementos que les permitan cumplir con las características de terapia más diagnóstico, poder ser dirigidos y focalizados a un sitio blanco, ser detectados por imagenología, cargar con algún agente terapéutico, y que la liberación de éste pueda ser controlada, lo anterior más las características propias de la célula empleada.

### **2.2.1 Microbots procariotas**

Respecto a los microbots procariotas, las células más utilizadas son bacterias flageladas, sobre todo las probióticas y anaeróbicas. Las células bacterianas se han empleado también como partículas adyuvantes para estimular la respuesta del sistema inmune.

El uso bacterias como acarreadores es algo que se emplea desde hace varias décadas, entre los primeros trabajos realizados está el desarrollado por Paglia y cols. en 1998 en el que utilizaron una cepa de *Salmonella typhimurium* para la administración oral de una vacuna de DNA y transferencia de genes en células dendríticas, esto en un modelo *in vivo* de fibrosarcoma murino, obteniendo como resultados inducción de una inmunidad protectora.

En un trabajo más, realizado por Souders y cols., en 2006, se utilizó una cepa de *Listeria monocytogenes* como sistema de entrega de plásmidos para vacuna en un modelo *in vivo* de cáncer cervicouterino, observando una inducción de inmunidad antitumoral y el contrarresto del crecimiento tumoral.

Bacterias vivas han sido también usadas como acarreadores de nanopartículas, las cuales son unidas en la superficie bacteriana, y se aprovecha la capacidad que presentan algunas bacterias para penetrar al tumor, específicamente en las áreas hipóxicas de éste (Hu *et al.*, 2009).

La diferencia de los trabajos anteriores, con los desarrollados actualmente, radica en la complejidad y mejora que han tenido los sistemas para poder emplearse como agentes específicos y focalizados. Como ya se mencionó anteriormente, el principal problema en la terapia dirigida es la falta de especificidad en los sistemas de envío actuales.

En cáncer se ha explorado el uso de microbots basados en bacterias anaeróbicas como transportadores específicos dirigidos a tejidos cancerígenos, pues se parte del hecho de que se ha observado que la mayoría de los tumores sólidos exhiben regiones hipóxicas, tanto en modelos *in vivo* como en humanos, por lo que la masa tumoral presenta ambientes anaeróbicos únicos. Se ha reportado ampliamente que la presión de oxígeno en tejidos normales (3–5% y 20–100 mm Hg), difiere de la observada en tejidos cancerígenos, donde existen regiones hipóxicas (<1% oxígeno y 0–20 mm Hg) (Brown 1999).

Bacterias anaeróbicas no patógenas del genero *Bifidobacterium* (considerada segura, pues ha sido ampliamente usada en pacientes infantiles en Japón), son propuestas como vectores favorables para el envío de genes que inhiben específicamente el crecimiento del tumor (Yazawa *et al.*, 2000). Si la bacteria es sistémicamente introducida a través de vía sanguínea, ésta podría penetrar en el tejido a través de las regiones frágiles de vasos sanguíneos, y/o podría permanecer en vasos sanguíneos tumorales que están aislados de vasos sanguíneos normales próximos, teniendo la capacidad de permanecer, sobrevivir y crecer en las condiciones anaeróbicas del tumor (Taniguchi *et al.*, 2010).

Se ha observado que cuando es inyectada en torrente sanguíneo o vía oral, la bacteria desaparece de tejidos normales y órganos, tales como hígado, bazo, riñón, pulmón, sangre y medula ósea, y crece solo en tejidos tumorales. La medula ósea genera un particular interés, debido a la relativamente baja presión de oxígeno que presenta, sin embargo, no se ha observado presencia de la bacteria en los ensayos realizados. (Taniguchi *et al.*, 2010; Cronin *et al.*, 2010).

### **2.2.2 Microbots eucariotas**

En cuanto a los microbots eucariotas, los tres principales tipos celulares utilizados son los eritrocitos, leucocitos y células madre, donde los agentes terapéuticos y de focalización son cargados dentro de las células o unidos a la membrana celular de éstas, para que sean entregados al sitio de interés aprovechando las características de localización de cada tipo celular. Una ventaja importante de utilizar células mamíferas, es que éstas pueden ser tomadas directamente del paciente, tratadas *ex vivo*, y reinyectadas de nuevo en el donador. Potenciar la supervivencia, proliferación y diferenciación de células del donador es deseable para muchas de las terapias celulares. (Wang *et al.*, 2014).

De igual manera que en el caso de los microbots procariotas, el uso de células eucariotas como vectores es un campo ya explorado desde hace algunos años. Jabbarzadeh y cols en 2008, emplearon células estromales derivadas de tejido adiposo, para enviar un adenovirus codificante para el inductor angiogénico VEGF en un modelo murino, esto con la finalidad de lograr una reparación de tejido por inducción de angiogénesis, observando gran potencial para la terapia desarrollada. Otro ejemplo más es la investigación realizada por Li y cols. en 2011, en la cual se utilizaron células madre mesenquimales con nanocomplejos de doxorubicina y silica anclados a ellas, como sistema de envío dirigido en un modelo de glioblastoma *in vitro*. En los resultados obtenidos se logró una prolongada e incrementada distribución intratumoral del fármaco, además de que el tratamiento contribuyó significativamente a la potenciación de apoptosis celular.

Las investigaciones han avanzado y los sistemas mejorado, por lo que se han desarrollado ya microbots eucariotas con un potencial terapéutico prometedor.

Se ha explorado en el uso de microbots basados en monocitos, que en cáncer pueden migrar solamente al tejido tumoral, mientras que en los tejidos sanos no se detecta presencia de dichas células (Strik *et al.*, 2006). En un estudio reciente se propuso su uso como microactuadores y microsensores para un sistema de entrega de drogas, en el que se desarrolló un microbot prototipo basado en monocitos cargados con microperlas fluorescentes de poliestireno (Park *et al.*, 2014).

El enfoque para el uso de monocitos se basa en el principio de que éstos pueden reconocer cuerpos extraños e inflamación en un cuerpo viviente, y poseen características de auto-actuador, que les permite desplazarse del torrente sanguíneo al sitio blanco en el tejido donde detectan señales de respuestas inflamatorias o infecciones (Li *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004).

En un estudio más, relacionado también con el uso de monocitos como acarreadores, se emplearon macrófagos cargados con nanopartículas de quitosán y un RNA de interferencia dirigido contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en un modelo de fibrosis *in vivo*, exponiendo las ventajas del empleo de microbots, al aprovechar las características propias de la célula, macrófagos en este caso, para dirigirse a zonas específicas de inflamación (Nawroth *et al.*, 2013). Un enfoque más, es el que emplea eritrocitos como célula acarreadora, aprovechando su amplia capacidad para viajar por torrente sanguíneo y poder localizarse en cualquier área del cuerpo.

### **2.2.2.1 Microbots basados en eritrocitos**

Los eritrocitos son de las células más investigadas como acarreadores de fármacos para una gran variedad de agentes bioactivos. Han generado notable interés durante las últimas décadas y ciertos estudios e investigaciones en donde se emplean, han pasado a fases en pruebas clínicas (Tan *et al.*, 2015).

Un eritrocito es una célula sanguínea especializada en el transporte de oxígeno, puede viajar a través de vasos sanguíneos y posee un tamaño de  $\sim 8 \mu\text{m}$ . Son muchas las ventajas que hacen de este tipo de células un candidato ideal para su uso como microbots, algunas de ellas son: su amplia disponibilidad y biocompatibilidad intrínseca, biodegradabilidad y no inmunogenicidad, y deformabilidad (pueden atravesar capilares de 2-3  $\mu\text{m}$ ), además de su prolongado tiempo de vida y largos tiempos de circulación *in vivo* (vida media de hasta 120 días) (Tan *et al.*, 2015; Chambers y Mitragotri 2007).

Existen diferentes métodos por los que un eritrocito puede ser cargado con algún agente terapéutico, en la Figura 6 se ilustran las diversas técnicas empleadas para dicho fin.

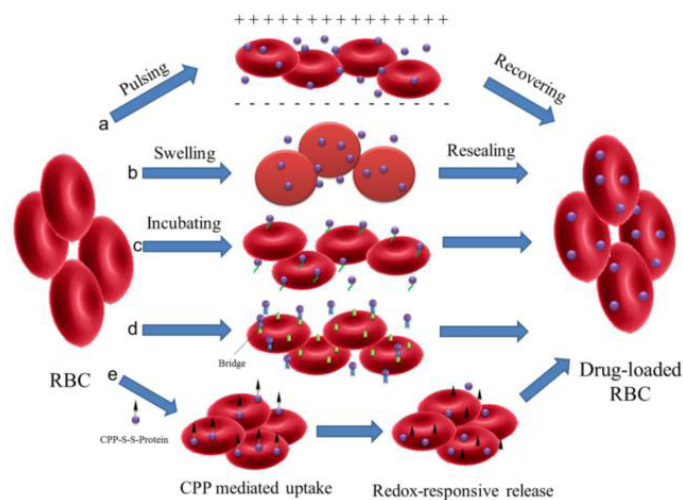


Figura 6. Ilustración de los diferentes métodos empleados para cargar eritrocitos. (Tomado de Tan *et al.*, 2015).

Desde hace algunos años ya, se ha estudiado su uso como potencial acarreador, en 2007 Chambers y Mitragotri evaluaron los tiempos de circulación *in vivo* de nanopartículas poliméricas cargadas en la superficie de eritrocitos. El emplear dichas nanopartículas para envío dirigido de fármacos, presenta la limitante de que éstas tienen cortos tiempo de vida, pues al estar en circulación son opsonizadas, y por lo tanto, reconocidas y capturadas por el sistema retículo endotelial. El adherir las nanopartículas

a los eritrocitos permitió mejorar drásticamente los tiempos de circulación *in vivo*, evaluando su biodistribución y mecanismos de depuración.

En 2015 Wu y colaboradores evaluaron el potencial de eritrocitos como posibles micromotores, cargando las células con nanopartículas magnéticas y caracterizando su estabilidad y funcionalidad, así como su eficiencia de transporte para poder ser guiadas a un sitio en particular. El mismo principio fue entonces escalado y mejorado para ser propuesto ya como un micromotor o microbot, los investigadores convirtieron el sistema prototipo en un microbot, al cargar el eritrocito con nanopartículas magnéticas que contribuyen a focalizar el tratamiento, Quantum dots que permiten detectar por fluorescencia el sistema, y doxorubicina, que cumple con el papel de agente terapéutico.

Otro enfoque de diseño de un microbot basado en eritrocitos, es el empleo de solo la membrana de éstas células, para ser usada como recubrimiento de sistemas nanopartículados, aprovechando las ventajas de los eritrocitos ya mencionadas. Los principios de dicha estrategia han sido evaluados por trabajos como el de Rao y colaboradores en 2017, así como el de Su y colaboradores en el mismo año, cuyo esquema se presenta en la Figura 7, en donde se combina terapia fotodinámica con quimioterapéutica, empleando para tales fines el fotosensibilizador clorina E6 y doxorubicina, respectivamente.



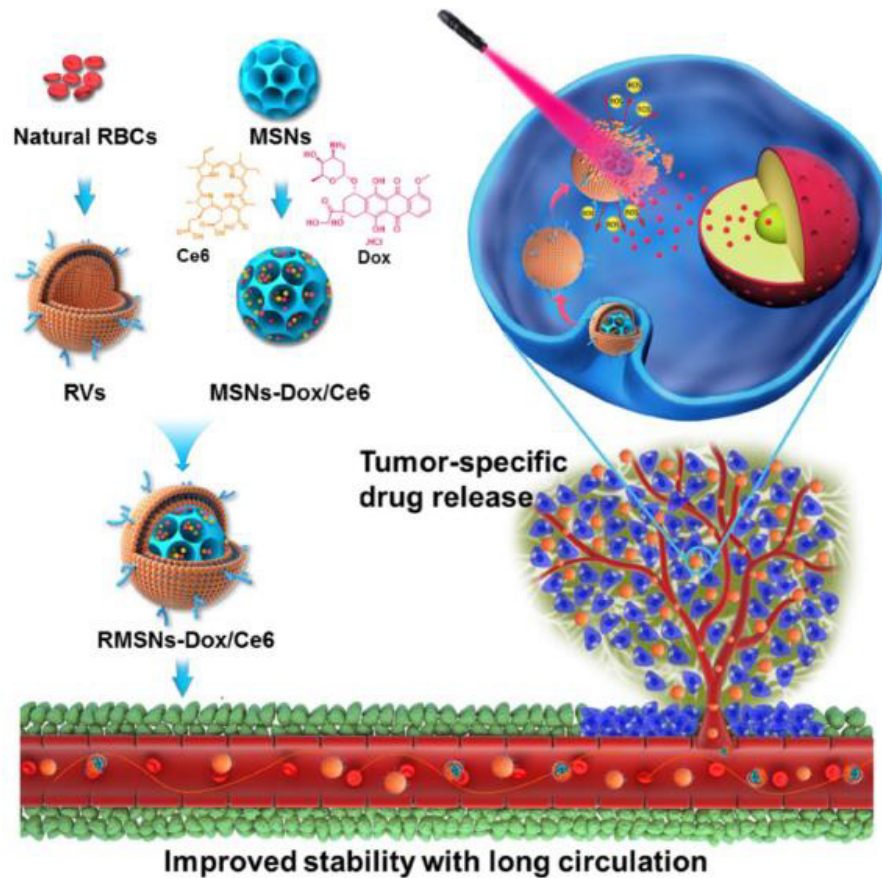


Figura 7. estrategia experimental del uso de membranas de eritrocitos para la creación de microbots. (Tomado de Su *et al.*, 2017).

Como se presentó ya hasta este momento, se tienen hoy en día grandes avances en múltiples enfoques empleados en terapia dirigida en diversas enfermedades, sobre todo en cáncer, por lo que actualmente se busca hacer una sinergia de estos enfoques, mejorando y combinándolos para lograr un sistema más específico, eficiente, e integral, que permita lograr la combinación terapia-diagnóstico ideal. En este aspecto se han realizado ya estudios que emplean sistemas complejos con resultados prometedores.

Debido a lo anterior y en base a los antecedentes mostrados, en el presente proyecto se propuso el desarrollo de un microbot basado en eritrocitos y nanopartículas magnéticas, para su uso en envío dirigido de genes en cáncer. Para dicha estrategia se elaboraron nanocomplejos de nanopartículas magnéticas fluorescentes (como agente focalizador y

diagnóstico), quitosán (como agente protector), y un plásmido de DNA, que contiene un promotor cuya activación para la posterior expresión génica puede ser controlada por un campo magnético externo. El sistema fue caracterizado y evaluado a nivel *in vitro* e *in vivo* en un modelo tumoral de melanoma sólido implantado en muslo.

### III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los tratamientos ya existentes, enfermedades graves como el cáncer siguen siendo de las principales causas de muerte en el mundo. Los últimos avances para el tratamiento personalizado de éste, como lo es el uso de terapias génicas y nanobiotecnología, han tenido avances significativos hasta la fecha. Sin embargo, aún se deben librar algunos obstáculos esenciales, como la garantía de un sistema con envío sitio dirigido, focalizado y biocompatible, por lo que se debe buscar una alternativa ideal que pueda tanto proteger la terapia o fármaco de las defensas propias del cuerpo, como también focalizar el tratamiento, haciéndolo selectivo para los tejidos a atacar y protegiendo así al resto, evitando efectos secundarios adversos. Actualmente, se busca una combinación de los enfoques ya existentes para lograr generar agentes basados en nanobiotecnología que nos permitan combinar diagnóstico más tratamiento. Éstos agentes pueden ser aún mejorados si se emplean células vivas como acarreadores: microbots. Entre los tipos celulares explorados, el uso de eritrocitos como microbots ha generado gran interés en los últimos años, debido a su facilidad de obtención y manipulación, así como largos tiempos de vida. En base a lo anterior, se propone desarrollar y evaluar un microbot basado en eritrocitos y nanocomplejos magnéticos fluorescentes y un plásmido de DNA codificante para luciferasa, cuya expresión es inducida en respuesta a un campo magnético, lo que permitirá obtener un sistema que pueda ser controlado, focalizado y sitio dirigido, de manera externa y no invasiva.

## **IV. HIPÓTESIS**

Microbots basados en eritrocitos y nanopartículas magnéticas son eficientes para controlar, focalizar y sitio dirigir genes de manera externa en un modelo tumoral *in vivo*.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la eficacia de microbots basados en eritrocitos y nanopartículas magnéticas para el envío controlado, focalizado y sitio dirigido genes en un modelo tumoral *in vivo*.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Construir y caracterizar nanocomplejos de Quitosán-pDNA-NPMF.
- Elaborar y caracterizar un microbot basado en eritrocitos y nanocomplejos magnéticos.
- Evaluar la eficiencia de transporte y de expresión génica del microbot en un modelo tumoral *in vivo*.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

-Cepas bacterianas

*Escherichia coli*, cepa TOP10F

-Lineas celulares

Melanoma murino B16F10

Eritrocitos murinos

-Modelos animales

*Mus musculus*, cepa C57BL/6 machos

### Medios de cultivo

-Agar y caldo Luria Bertani (LB).

-Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-F12) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico.

### Quitosán

Quitosán soluble en agua de 20 kDa con un grado de desacetilación de ~70%, compañía Coyote Foods.

### Nanopartículas magnéticas fluorescentes (NPMF)

-Nanopartículas de un tamaño de 75 nm, compuestas por un núcleo de óxido de hierro superparamagnético (SPIO) de 8 nm, cubierto de una capa silicea biocompatible y un fluoróforo orgánico unido covalentemente cuyo espectro es similar al del fluorocromo Cianina 5.5 (MaxVigen<sup>TM</sup> -710 nm, Nvigen).

## 6.1 Descripción, purificación y caracterización del plásmido a utilizar

Se utilizó el plásmido pCEM-Luc, diseñado y construido en nuestro laboratorio, el cual codifica para el gen de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*, 1689 pb), y contiene la secuencia del promotor (273 pb) de la proteína de shock térmico de 70 kDa humana HSP70 (Heat shock protein por sus siglas en inglés). La expresión del gen controlado por dicho promotor, es inducida cuando se expone a un campo magnético. En la figura 8 se muestra el mapa del vector pCEM-Luc.

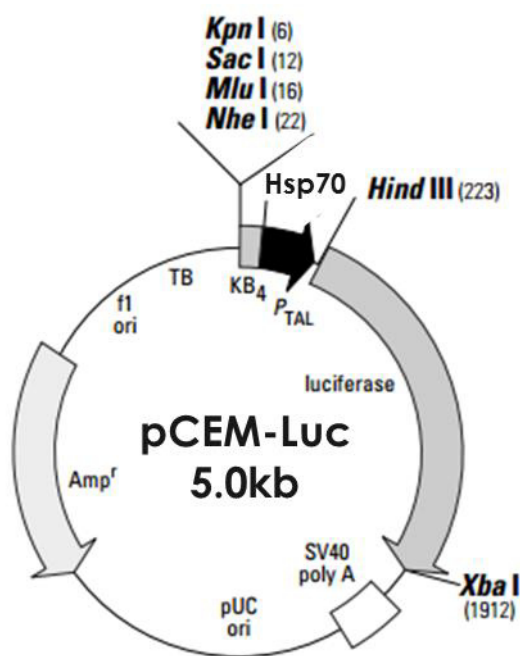


Figura 8. Vector pCEM-Luc.

Bacterias *E. coli* TOP10F transformadas con el plásmido pCEM-Luc, así como el plásmido purificado obtenido de éstas, fueron caracterizados antes de su utilización.

### 6.1.1 Extracción rápida de plásmido por el método Rapid Fenol

Para corroborar que la cepa contuviera aún el plásmido, las bacterias fueron sembradas en placas de agar LB con ampicilina [100 µg/ml] y se incubaron toda la noche a 37°C. Pasado

el tiempo de incubación se observó el crecimiento en cada placa, y se seleccionaron 2 colonias, éstas se crecieron por separado en tubos eppendorf con 1ml de caldo LB con ampicilina [100 µg/ml], a 37°C con agitación a 200 rpm toda la noche.

De las colonias seleccionadas, se separaron 200 µl de cada tubo y se almacenaron a 4°C, los 800 µl restantes se centrifugaron a 10,000 rpm durante dos minutos en micro centrífuga (5415C, Eppendorf) para obtener el pellet bacteriano, se agregaron 20 µl de Fenol y 20 µl de solución Dye (Sucrosa [6%] y Azul de bromofenol [0.1%]), se mezcló todo con ayuda de vórtex (Maxi Mix II, Thermolyne) hasta re suspender el pellet y se centrifugó a 12,000 rpm durante dos minutos.

La solución acuosa se cargó en un gel de agarosa al 0.8% para verificar la presencia de plásmido mediante electroforesis, la cual se corrió a 100V y 80 mA durante 45 min en buffer TAE (Tris acetato [40mM], EDTA [1mM]). Posteriormente se tiñó el gel en bromuro de etidio y se observó en un transiluminador (3UV, UVP).

### 6.1.2 Caracterización enzimática del plásmido pCEM-Luc

El plásmido purificado fue caracterizado enzimáticamente utilizando las enzimas “*HindIII*”, “*NheI*” y “*XbaI*” (Promega, Madison, USA) las cuales reconocen sitios de corte único en el plásmido, y liberan el promotor (*HindIII* y *NheI*) y el gen de luciferasa (*HindIII* y *XbaI*) contenidos en el plásmido.

La reacción general de digestión se realizó agregando 1µg de DNA por reacción y fue la siguiente:

1µl	Buffer 10X	1µl	Buffer 10X
1µl	enzima “ <i>HindIII</i> ”	1µl	enzima “ <i>HindIII</i> ”
1µl	enzima “ <i>NheI</i> ”	1µl	enzima “ <i>XbaI</i> ”
0.5µl	BSA	0.5µl	BSA
1µl	plásmido [1µg/ µl]	1µl	plásmido [1µg/ µl]
<u>5.5µl</u>	<u>Agua PCR</u>	<u>5.5µl</u>	<u>Agua PCR</u>
10µl	volumen final	10µl	volumen final

Las digestiones se incubaron a 37°C por dos horas, y se inactivaron a 65°C por 10 min. Después, se cargaron en un gel de agarosa al 0.8% para realizar una electroforesis durante 45 min, a 100 V y 80 mA en buffer TAE (Tris acetato [40 mM], EDTA [1 mM]).

Junto con las digestiones se cargaron carriles con plásmido sin cortar, que sirvieron como control negativo, y un marcador de peso molecular de 1 kb (Promega, Madison, USA) que permitió identificar el tamaño de las bandas obtenidas. El gel se tiñó en bromuro de etidio, se observó con ayuda de un transiluminador (3UV, UVP) y los resultados fueron fotodocumentados (Universal Hood II Gel Doc, Bio-Rad).

### **6.1.3 Extracción de plásmido por el método maxiprep**

Una vez caracterizada la cepa y el plásmido contenido en ésta, se procedió a producir y purificar el plásmido a gran escala. Se inocularon 50 µl de la cepa caracterizada, para activar 200 ml de caldo LB con ampicilina [100 µg/ml]. Se creció a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó la extracción de plásmido utilizando el Kit comercial “PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit” (Invitrogen California EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El cultivo se centrifugó a 4,000 g por 10 min en ultra centrifuga (Avanti J-25 I, Beckman), se retiró el sobrenadante y se agregaron 10 ml de buffer R3 al pellet, éste fue re suspendido en el buffer con la ayuda de una micropipeta. Después se agregaron 10 ml de buffer L7, mezclando por inversión e incubando 5 min a temperatura ambiente, pasado este tiempo se agregaron 10 ml de buffer N3 y se mezcló todo por inversión. El lisado se centrifugó a 12,000 g por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se separó el sobrenadante y fue cargado en la columna previamente equilibrada, que se dejó vaciar por gravedad y lavó con 60 ml de buffer W8, dejando vaciar por gravedad de igual manera, el plásmido se eluyó con 15 ml de buffer E4. Para precipitar el DNA se agregaron 10.5 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 g por 30 min a 4°C. El



sobrenadante se descartó y el pellet de DNA se lavó con 5 ml de etanol 70%, después se centrifugó por 5 min a 12,000 g y 4°C.

Finalmente, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min y se re-suspendió en 200 µl de agua grado PCR. El plásmido purificado fue cuantificado en nanodrop y se almacenó a -20°C, hasta su uso.

## **6.2 Formación y caracterización de los nanocomplejos de pDNA-Quitosán-NPMF**

Los nanocomplejos fueron elaborados por el método de gelación iónica descrito por Calvo y cols (1997), en el cual los iones del quitosán reaccionan con aniones del entrecruzante TPP para formar los nanocomplejos, compuestos también por DNA plasmídico (pDNA) y nanopartículas magnéticas fluorescentes.

### **6.2.1 Preparación de reactivos**

El Quitosán (Coyote Foods) y el tripolifosfato de pentasodio (TPP) (Sigma-Aldrich) fueron pesados y resuspendidos en agua MiliQ, a concentraciones de 2 mg/ml y 0.86 mg/ml respectivamente. Se prepararon 10ml de cada solución, el pH del quitosán se midió y ajustó a 5.5 con potenciómetro (511212 Φ360, Beckman), mientras que para el TPP se prepararon tres diferentes soluciones, la primera sin ajuste de pH (con valor de 9.2) y las dos restantes con pH a 5.5 y 3.0. Todas las soluciones fueron filtradas utilizando una membrada de celulosa regenerada (RC) con tamaño de poro de 0.2 µm (RC Syringe Filters, Corning), alicuotadas en tubos eppendorf de 1.7 ml y almacenadas a -20C.

El stock de las nanopartículas magnéticas fluorescentes (NPMF) (MaxVigen™ - 710nm, Nvigen) estaba en una concentración de 1 µg/ml, y se diluyó con un factor 1:10 en PBS estéril, para trabajar con una concentración de 100 µg/ml.

## 6.2.2 Elaboración de los nanocomplejos

Para estandarizar la elaboración de los nanocomplejos se realizaron diferentes evaluaciones: perfil de retención y perfil de liberación de pDNA, homogeneidad, tamaño, potencial zeta y citotoxicidad de los nanocomplejos. Se analizaron diferentes variables (pH de TPP, radio proporcional Q:pDNA, concentración NPMF y volumen final de los nanocomplejos), para obtener la mejor combinación que diera como resultado los mejores complejos. En las primeras evaluaciones se elaboraron nanocomplejos sólo con TPP, quitosán y pDNA, sin agregar NPMF (nanocomplejos de Q/pDNA), y una vez descartadas ciertas combinaciones se procedió a elaborar y evaluar los nanocomplejos adicionando NPMF (nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF).

Para calcular la cantidad de quitosán requerida en cada nanocomplejo, según el radio proporcional Q:pDNA, se utilizó la siguiente formula:

$$\mu\text{l Quitosan} = \frac{(\mu\text{g DNA} \times 3)(\text{radio } Q:pDNA)}{12 \text{ mM}}$$

La cantidad de TPP se agregó en una relación 1:4 respecto al quitosán, y la cantidad de pDNA fue de 1  $\mu\text{g}$  final.

De manera general, la elaboración de los nanocomplejos se realizó de la siguiente forma: se colocaron los reactivos en dos tubos: tubo (+) y tubo (-) y con las cantidades según el radio proporcional mostradas en la Tabla 3. En el tubo positivo (+) se colocó el quitosán y se aforó con PBS (Gibco) a 15  $\mu\text{L}$ , mientras que en el tubo negativo (-) se colocaron, según el parámetro a evaluar, NPMF, pCEM-Luc y TPP, y se aforó también con PBS a 15  $\mu\text{L}$ , los componentes en cada tubo fueron mezclados con vórtex (Maxi Mix II, Thermolyne) durante 90 segundos. Para formar los nanocomplejos, el contenido del tubo (-) fue agregado poco a poco con micropipeta (en gotas de 2  $\mu\text{L}$ ) al tubo (+) mientras éste estaba en agitación a 950 rpm, y una vez mezclados, se incubaron en esas condiciones de agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tabla 3. Componentes empleados para la elaboración de los nanocomplejos magnéticos.

	Tubo (+)			Tubo (-)			
	Qitosán	PBS		NPMF [100µg/ml]	pDNA	TPP	PBS
Radio 10	2.5 µL	12.5 µL	+	-	1 µL	0.625 µL	13.375 µL
Radio 20	5 µL	10 µL	+	-	1 µL	1.25 µL	12.75 µL
Radio 30	7.5 µL	7.5 µL	+	1 µL	1 µL	1.875 µL	12.125 µL 11.125 µL
Radio 40	10 µL	5 µL	+	1 µL	1 µL	2.5 µL	11.5 µL 10.5 µL
Radio 50	12.5 µL	2.5 µL	+	1 µL	1 µL	3.125 µL	10.875 µL 9.875 µL
Radio 60	15 µL	-	+	1 µL	1 µL	3.75 µL	10.25 µL 9.25 µL

Para las evaluaciones del perfil de liberación y retención de pDNA, así como las primeras evaluaciones de homogeneidad y tamaño, se elaboraron los nanocomplejos Q/pDNA, variando sólo entre TPP a diferentes pHs (sin TPP, pH 9.2, 5.5 o 3.0) y los radios proporcionales Q:pDNA ya mostrados en la tabla anterior.

Una vez determinadas las combinaciones ideales de los parámetros anteriores, se elaboraron los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF para evaluar homogeneidad y tamaño, variando sólo en radios proporcionales Q:pDNA. Ya que se determinó el mejor radio proporcional, se varió en concentración de NPMF (1 µg/ml o 100 µg/ml) y volumen final (30 µl o 60 µl), evaluando homogeneidad y tamaño. Y finalmente, establecidas todas las condiciones de preparación se determinó el potencial zeta y la citotoxicidad de los nanocomplejos. En las siguientes secciones se explica de una manera más detallada cómo se realizaron las distintas evaluaciones.

### **6.2.3 Ensayo de retención de pDNA**

De los nanocomplejos elaborados, y posterior al tiempo de incubación, se tomaron 15  $\mu\text{L}$ , que fueron cargados en un gel de agarosa al 0.8% para realizar un corrimiento electroforético por 45 min, a 100 V y 80 mA en buffer TAE. Se corrió un gel para cada combinación diferente de TPP, y junto con los diferentes nanocomplejos se cargó también un carril con pDNA desnudo como control. Posterior al corrimiento, cada gel se tiñó en bromuro de etidio, se observó en un transiluminador (3UV, UVP) y los resultados fueron fotodocumentados.

### **6.2.4 Evaluación de homogeneidad y tamaño**

Los 15  $\mu\text{L}$  restantes de los nanocomplejos elaborados, fueron utilizados para evaluar las características de tamaño y homogeneidad, se evaluaron sólo los nanocomplejos a partir del R30 de todas las variantes de TPP. Lo anterior se realizó mediante dispersión de luz dinámica empleando el aparato Zetasizer (ZS90, Malvern), los nanocomplejos fueron aforados a 1000  $\mu\text{L}$  con agua destilada filtrada, y cargados en cubetas de poliestireno de 1mL (DTS0012, Malvern).

Los valores de RI (índice de refracción) y absorción, utilizados en las mediciones fueron de 1.330 y 0.001 respectivamente (valores del quitosán), mientras que para el dispersante los valores fueron de 0.8872 cP de viscosidad y 1.330 de RI (valores del agua). El método de medición fue automático, realizando tres mediciones para cada muestra, los resultados obtenidos de las tres mediciones se reportan en una gráfica de tamaño/intensidad que muestra una curva de frecuencia. El Software utilizado para la medición de la muestra y análisis de los datos fue “Zetasizer Software” versión 7.11.

### **6.2.5 Ensayo de liberación de pDNA**

Para evaluar el perfil de liberación de pDNA de los nanocomplejos, se seleccionaron las combinaciones con TPP a pH 5.5 y 3.0, pues mostraron mejor perfil de retención y

homogeneidad. Los nanocomplejos se elaboraron como ya se mencionó anteriormente, y posterior al tiempo de incubación fueron centrifugados a 14,800rpm durante 30 min en micro centrifuga (Sorvall Legend Micro 21R, ThermoScientific), el sobrenadante fue colectado, los nanocomplejos fueron resuspendidos por pipeteo en 30  $\mu$ L de PBS y se incubaron nuevamente en agitación, este procedimiento fue repetido cada hora hasta las 6 hrs, se realizó a las 12 hrs, y cada 24 ha hasta las 144 hrs posterior a la elaboración.

Los sobrenadantes colectados y la cantidad de pDNA presente en cada muestra fue cuantificada por espectrofotometría (NanoDrop2000, ThermoScientific), se realizaron tres mediciones de cada muestra y se calculó la cantidad de pDNA presente en el volumen obtenido, las concentraciones obtenidas fueron graficadas en función del tiempo, y reportadas utilizando el programa Excel, en dichas gráficas se indica también la cantidad de pDNA total liberado durante el tiempo de incubación.

#### **6.2.6 Caracterización de tamaño de los nanocomplejos magnéticos**

Una vez realizadas las evaluaciones anteriores, se descartó la combinación con TPP pH 5.5, y se evaluaron solo los nanocomplejos elaborados con TPP pH3.0 a partir del radio 30, en éstas evaluaciones se adicionaron ya las NPMF. Para la elaboración de éstos nanocomplejos se realizó todo de la misma manera, solo se adicionaron las NPMF en la cantidad mostrada en la Tabla 3. En primer lugar, se midió el tamaño de las NPMF solas, y una vez obtenidos los nanocomplejos magnéticos, se determinó su tamaño.

Las mediciones se realizaron por dispersión de luz dinámica en Zetasizer, con las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Las mediciones de los diferentes radios se reportan junto con el valor de intensidad en una tabla, mientras que las mediciones de las NPMF y de los nanocomplejos del radio seleccionado como ideal, se reportan en gráficas de tamaño/intensidad que muestran una curva de frecuencia. La elaboración final de los nanocomplejos, a partir de éstas evaluaciones, fue en un volumen final de 60  $\mu$ L.

### **6.2.7 Caracterización de carga superficial**

Posterior a la determinación de las mejores combinaciones para la elaboración de nanocomplejos, se evaluó la carga superficial de estos mediante medición del potencial Z. El potencial zeta de los nanocomplejos elaborados con TPP pH 3.0 y a un radio proporcional 60:1, fue determinado mediante dispersión de la luz electroforética, empleando el aparato Zetasizer (ZS90, Malvern). Para la medición, los nanocomplejos fueron aforados a 1 ml con agua destilada filtrada y estéril, posteriormente fueron cargados con ayuda de una jeringa de insulina en una celda capilar plegada (DTS1070, Malvern).

Los valores de RI y absorción utilizados en las mediciones fueron los ya mencionados anteriormente, mientras que para el dispersante fueron de 0.8872 cP de viscosidad, 1.330 de RI y 78.5 de constante dieléctrica. La medición se realizó con el modelo de Smoluchowski, y el método de medición fue automático, realizando tres mediciones para cada muestra, los resultados obtenidos de las tres mediciones se reportan en una gráfica de potencial zeta/conteos que muestra una curva de frecuencia. El Software utilizado para la medición de la muestra y análisis de los datos fue “Zetasizer Software” versión 7.11.

### **6.2.8 Evaluación de la citotoxicidad de los nanocomplejos**

Una caracterización más fue la evaluación de la citotoxicidad de los nanocomplejos, así como sus componentes por separado, esto se realizó mediante un ensayo de viabilidad celular, utilizando un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del [bromuro de 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] MTT (Sigma-Aldrich). El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, utilizando células B16F10, y sembrando 3000 células por pozo con 100  $\mu$ L de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-F12) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico antimicótico (los tres de la compañía Gibco), e incubando a 37°C en una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células se incubaron durante 24 horas para alcanzar una confluencia aproximada del 80%, pasado este tiempo se retiró el medio de los pozos y se agregó nuevo, para después proceder a agregar los diferentes tratamientos. Se utilizaron diferentes concentraciones de los nanocomplejos y sus componentes (concentración de NPMF acomplejadas, quitosán, NPMF o pDNA): 0.25  $\mu\text{g}$ , 0.5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , y 1.5  $\mu\text{g}$ , las cantidades de cada elemento fueron aforadas a 60 $\mu\text{L}$  con PBS y adicionadas a cada pozo.

Se incubaron las células con los tratamientos durante 24 horas y posteriormente se procedió a realizar la determinación de viabilidad celular, esto agregando 20  $\mu\text{L}$  de MTT [5 mg/ml] a cada pozo. Las células se incubaron durante 45 min en las condiciones normales ya mencionadas, después de la incubación se retiró el contenido de cada pozo volteando la placa, y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de DMSO por pozo para detener la reacción. La absorbancia a 540 nm fue medida utilizando un lector de microplacas (Synergy 2, BioTek), los resultados de viabilidad fueron graficados en función de la concentración, y en base a la ecuación lineal obtenida se calculó la  $\text{CC}_{50}$  de cada tratamiento.

### **6.2.9 Caracterización de forma y tamaño de las NPMF y los nanocomplejos por microscopía de fuerza atómica**

Tanto las NPMF como los nanocomplejos, fueron observados por microscopía de fuerza atómica. Para esto, 1  $\mu\text{L}$  de NPMF [1:10] fue mezclado con 59  $\mu\text{L}$  de agua MiliQ filtrada y estéril, los nanocomplejos se elaboraron como ya se ha mencionado anteriormente, y posterior al tiempo de incubación, fueron centrifugados a 14,800 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y resuspendieron en 60  $\mu\text{L}$  de agua MiliQ filtrada y estéril, y se mezclaron por vórtex durante 1 min.

Para la preparación de las muestras se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de éstas, se colocaron en un portaobjetos y se dejaron secar por unos minutos, para ser analizadas por microscopía de fuerza atómica (MFA). El método de lectura fue topografía por semicontacto, empleando una sonda RTESPA (Bruker, Massachusetts) con cantilever rectangular de silicio dopado con antimonio de longitud de 125  $\mu\text{m}$ . Las lecturas se realizaron utilizando un microscopio

de fuerza atómica modelo NTEGRA de la compañía NT-MDT, y las imágenes registradas con el software Nova versión 1.1.0.1921 perteneciente a la misma compañía.

#### **6.2.10 Evaluación del tamaño y potencial Z de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF adicionando el fluoróforo FITC**

Un punto adicional a considerar en la evaluación de la unión de los nanocomplejos a la membrana de los eritrocitos, dado que la microscopía de fluorescencia es una técnica ideal para determinar dicho, se procedió a realizar un marcaje del quitosán con un fluoróforo más convencional (que el presente en las NPMF), el isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Se preparó FITC (Sigma-Aldrich) a una concentración de 2mg/ml disuelto en metanol grado biología molecular (J.T. Baker, Center Valley, PA), para el marcaje del quitosán se mezcló éste con FITC para obtener diferentes concentraciones finales de quitosán: 1.5 mg/ml, 1 mg/ml, 1.8 mg/ml y 1.98 mg/ml en tubos eppendorf, los tubos se incubaron en termomixer (ThermoMixer®, Eppendorf) a 40 °C por una hora (cubriendo con papel aluminio para evitar la exposición a la luz). Las diferentes alícuotas preparadas de quitosán marcado, se utilizaron para elaborar nanocomplejos magnéticos (con la misma cantidad de quitosán utilizada cuando este no está marcado), y evaluar tamaño y homogeneidad por dispersión de luz dinámica (con los mismos parámetros mencionados anteriormente).

La concentración que mostró una mayor similitud en tamaño y homogeneidad respecto a los nanocomplejos sin el marcaje, fue seleccionada como ideal, ésta fue procesada para evaluar también su potencial zeta y verificar que variara poco respecto a los nanocomplejos sin marcaje. Gráficas de ambos valores para dicha concentración son reportadas en la sección de resultados.

#### **6.2.11 Evaluación de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF a gran escala**

Antes de proceder a la elaboración de los microbots se realizaron evaluaciones de los



nanocomplejos magnéticos preparados a gran escala. Se elaboraron nanocomplejos a la concentración que se pretendía utilizar en el modelo *in vivo*: 50 µg de pDNA acomplejados, y se realizaron mediciones de tamaño y potencial zeta (reportados en tabla). Posteriormente, se realizaron mediciones de fluorescencia tanto de las nanopartículas solas como de los nanocomplejos magnéticos, ambas mediciones a diferentes concentraciones de pDNA acomplejado (1 µg, 5 µg, 10 µg, 25 µg y 50 µg).

Para la medición de las nanopartículas, éstas se utilizaron a la concentración empleada en los nanocomplejos [100 µg/ml] empleando un microlitro por cada µg de pDNA), se colocaron los microlitros según las concentraciones a medir (1 µg, 5 µg, 10 µg, 25 µg y 50 µg), y se aforaron a 50 µL con PBS (los resultados se muestran como 1x, 5x, 10x, 25x y 50x respectivamente). La preparación y medición fue por triplicado, las muestras se colocaron en una placa negra de 384 pozos fondo plano (Nunc™, Thermo Scientific), y la fluorescencia se midió en un lector de placas Varioskan Lux (ThermoFisher Scientific). Las longitudes de emisión y excitación utilizadas fueron las establecidas por el fabricante: 673 nm y 695 nm, respectivamente. Las lecturas de ésta, y el resto de las evaluaciones fueron realizadas con el lector de placas Varioskan Lux, fueron procesadas utilizando el software SkanIt RE versión 4.1 de la compañía ThermoFisher Scientific, los valores obtenidos fueron analizados y graficados con el software GraphPad Prism versión 6.0 y se reportan como unidades relativas de fluorescencia (RFU).

Al igual que las NPMF, los nanocomplejos se prepararon por triplicado, posterior al periodo de incubación fueron lavados a 3000 rpm (Sorvall Legend Micro 17, ThermoScientific) durante 20 min (menor velocidad y mayor tiempo son requeridos para evitar la aglomeración excesiva de los nanocomplejos a altas concentraciones), se descartó el sobrenadante y cada muestra fue resuspendida en 150 µL de PBS. Las mediciones se realizaron colocando los 150 µL de cada muestra en una placa negra de 96 pozos de fondo plano (Costar®, Corning Inc), los valores obtenidos para cada medición fueron graficados y se reportan como unidades relativas de fluorescencia (RFU).

Tabla 4. Diferentes componentes para la elaboración de los nanocomplejos magnéticos a gran escala.

NC	Tubo (+)			Tubo (-)			
	Quitosán	PBS		NPMF [100µg/ml]	pDNA	TPP	PBS
<b>1X</b>	15 µL	15 µL	+	1 µL	1 µL	3.75 µL	24.25 µL
<b>5X</b>	75 µL	75 µL	+	5 µL	5 µL	18.75 µL	121.25 µL
<b>10X</b>	150 µL	150 µL	+	10 µL	10 µL	37.5 µL	242.5 µL
<b>25X</b>	375 µL	375 µL	+	25 µL	25 µL	93.75 µL	606.25 µL
<b>50X</b>	750 µL	750 µL	+	50 µL	50 µL	187.5 µL	1212.5 µL

### 6.3 Elaboración y cracterización de los microbots basados en Eritrocitos

Para las estandarizaciones en los primeros ensayos de elaboración de los microbots, se utilizaron eritrocitos humanos, y una vez establecidas las condiciones ideales, se utilizaron eritrocitos murinos. Los microbots se elaboraron uniendo los nanocomplejos magnéticos a la membrana celular de los eritrocitos mediante interacción de cargas, utilizando TPP como agente entrecruzante y estabilizador de cargas.

#### 6.3.1 Elaboración de los microbots

Para la elaboración de los microbots se partió de 50 µL de sangre total, colectada en tubos con K<sub>2</sub>EDTA como anticoagulante (Microtainer, BD). Para separar los eritrocitos se agregaron 50 µL de PBS al tubo con sangre total, y los 100 µL totales fueron agregados a un tubo eppendorf con 75 µL de Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Premium 1.084 (GE Healthcare), sin mezclar, el tubo fue centrifugado a 500 g (Sorvall Legend Micro 17, ThermoScientific) durante 30 min a temperatura ambiente. Posterior a la centrifugación se tomó la fase que contenía los eritrocitos y se colocó en otro tubo, se resuspendieron en 1 mL de PBS y centrifugaron de nuevo a las mismas condiciones. Se retiró el sobrenadante y se realizaron tres lavados más, resuspendiendo en 1 mL de PBS y centrifugando ahora por 15 min.

Después del último lavado, los eritrocitos fueron resuspendidos en 500  $\mu\text{L}$  de PBS y separados en 5 tubos de 100  $\mu\text{L}$  cada uno.

Al mismo tiempo en que se realizó la purificación de eritrocitos, se prepararon los nanocomplejos con 1  $\mu\text{g}$  de pDNA acomplejado, como ya se describió, posterior al tiempo de incubación se centrifugaron a 14,800 rpm durante 15 min, se retiró el sobrenadante y agregaron 60  $\mu\text{L}$  de PBS, se dio vórtex por 3 min y se mantuvieron en agitación a 950 rpm durante 30min.

Para formar los microbots los nanocomplejos fueron agregados a un tubo con 100  $\mu\text{L}$  de eritrocitos purificados y se adicionaron 3.75  $\mu\text{L}$  de TPP, se mezcló por pipeteo y se incubaron en agitación a 950 rpm por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 3000 g por 10 min, se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados más con 1 mL de PBS, después del último lavado se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Un tubo de eritrocitos aislados fue utilizado como control, dichas células se sometieron al mismo tratamiento de incubación y lavados que los microbots.

### **6.3.2 Caracterización de los microbots**

Para evaluar que los complejos fueron adheridos en las células, los microbots se observaron por microscopía de fuerza atómica y microscopía de fluorescencia, y empleando como control eritrocitos solos.

#### **6.3.2.1 Caracterización de los microbots por microscopía de fuerza atómica**

Para poder observar tanto los eritrocitos, como los microbots por MFA, se realizó un tratamiento adicional a las muestras. Se obtuvieron 3mL de sangre total sin anticoagulante en tubos eppendorf, la muestra se dejó reposar por 30 minutos para permitir su coagulación y se centrifugó a 6000 g por 20 minutos para obtener el suero. Una vez obtenido el suero, éste se utilizó en lugar de PBS para realizar un último lavado y resuspensión de las muestras (con las condiciones mencionadas anteriormente).

Para realizar las observaciones se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se colocaron en un portaobjetos, la muestra se extendió en el portaobjetos de tal forma como se realiza un frotis sanguíneo, y se esperó a que seca para poder ser analizada por MFA. Las lecturas, registro y análisis de imágenes fueron realizadas de la misma forma en que se explicó anteriormente.

### **6.3.2.2 Caracterización de los microbots por microscopía de fluorescencia**

La caracterización de los microbots por microscopía de fluorescencia se realizó utilizando las muestras disueltas en PBS. Para poder observarlas se tomaron 3  $\mu\text{L}$  de cada muestra, se colocaron en un portaobjetos y se protegieron con cubreobjetos. Los análisis se realizaron con un microscopio de fluorescencia modelo BX61WI de la compañía Olympus, empleando un láser de 473 nm. Las imágenes fueron registradas y analizadas con el software FluoView FV10-ASW Viewer Versión 4.2a.

### **6.3.3 Estandarización de la capacidad de carga de los microbots**

Posterior a la caracterización por microscopía, se realizaron diferentes pruebas para evaluar qué tantos nanocomplejos magnéticos pueden unirse al eritrocito sin afectarlo. Se procedió entonces a estandarizar la capacidad de carga de los eritrocitos, para esto se realizaron combinaciones de nanocomplejos magnéticos a una sola concentración (nanocomplejos con 50  $\mu\text{g}$  de pDNA acomplejado), unidos a diferentes diluciones de células.

Para elaborar los microbots se elaboraron los nanocomplejos magnéticos y se aislaron eritrocitos partiendo de 80 $\mu\text{L}$  de sangre total como ya se mencionó anteriormente. Los eritrocitos obtenidos al final de la purificación fueron resuspendidos en 1.6 mL de PBS, y se separaron en diferentes volúmenes: 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$  y 500  $\mu\text{L}$ , cada tubo fue nombrado como microbots 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. A cada tubo se agregaron los nanocomplejos y 187.5  $\mu\text{L}$  de TPP, además de aforar con PBS para un volumen final de 1.3 mL. Se mezcló por pipeteo y se incubaron en agitación a 950 rpm

durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 3000 g por 10 min, se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados más con 1mL de PBS, después del último lavado se resuspendieron en 100  $\mu$ L de PBS.

La primera evaluación realizada una vez que se elaboraron los microbots, fue la determinación del potencial zeta de éstos. Las mediciones, así como el procesamiento y análisis de las muestras se realizaron como se mencionó ya anteriormente.

La segunda evaluación a realizar fue la determinación de fluorescencia de cada muestra, para esto, las muestras preparadas se resuspendieron en 450  $\mu$ L de PBS, y se cargaron en placas de 96 pozos (150  $\mu$ L por pozo, lecturas por triplicado). Al igual que en la evaluación de los nanocomplejos, se utilizó el lector de placas Varioskan Lux y se midieron dos diferentes longitudes de emisión y excitación. Los valores obtenidos para cada medición fueron graficados y se reportan como unidades relativas de fluorescencia (RFU).

La tercera y última evaluación fue el análisis del perfil de sedimentación de los microbots a diferentes concentraciones. Para realizar esta evaluación, las diferentes muestras fueron incubadas en reposo a temperatura ambiente, y se fotografiaron a diferentes tiempos (10, 20 y 30 minutos), además, las muestras se centrifugaron a 3000 g por 10 minutos y posterior a esto se fotografiaron también. En ésta evaluación se omitió el tratamiento con eritrocitos más diluidos (microbots 5). Las imágenes obtenidas se muestran en la sección de resultados.

#### **6.4 Evaluación *in vivo* de los microbots**

Para determinar tanto la eficiencia de transporte y entrega, así como la de expresión génica, se realizaron evaluaciones *in vivo*. Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6 de 6 semanas de edad, con pesos comprendidos entre 25-30 gr, a los cuales se les indujo tumores sólidos. El modelo tumoral de metástasis en muslo se desarrolló inyectando, con una jeringa de insulina (Ultra-fine 31G x 6mm, BD Becton, Dickinson and Company) 500,000 células B16F10 resuspendidas en 100  $\mu$ L de PBS, esto de manera

subcutánea en el muslo derecho de cada ratón. Se permitió el crecimiento de la masa tumoral por 14 días post inoculación, pasado ese tiempo, los ratones se inocularon con los diferentes tratamientos. En total se trabajó con tres grupos experimentales con una n=3:

**Grupo 1:** Control negativo, ratones con inducción de tumor sin tratamiento.

**Grupo 2:** Control positivo, ratones con inducción de tumor e inoculados con los nanocomplejos magnéticos.

**Grupo 3:** Ratones con inducción de tumor e inoculados con microbots basados en eritrocitos.

Tanto los nanocomplejos como los microbots, fueron preparados para llevar 50 µg de pDNA por ratón, la elaboración de ambos se realizó como se explicó anteriormente, empleando los microbots con mejores resultados, y al final fueron resuspendidos en 100 µL de PBS. La inoculación de los diferentes tratamientos se realizó vía intravenosa utilizando una jeringa de insulina, e inyectando por la vena de la cola, que fue dilatada previamente mediante inmersión en agua tibia (37 – 40 °C).

Posterior a la inoculación, a cada ratón (incluidos controles), se le colocó un magneto de Neodimio con un diámetro de 3/8" e intensidad de 30,000 Gaus (3 T) por una hora. El magneto fue colocado directamente sobre el tumor (sujetándolo con bandas adhesivas) con la finalidad de dirigir el tratamiento a dicha zona. Cuarenta y ocho horas después de la exposición al magneto, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, el tumor, así como diferentes órganos: corazón, bazo, riñón, pulmón e hígado fueron extraídos y congelados a -20°C para su posterior procesamiento.

Para realizar el procesamiento de las muestras los órganos fueron primero lavados con 300 µL de PBS para eliminar restos de sangre, posteriormente fueron cortados en pequeños trozos y colocados en tubos eppendorf para ser macerados con micropistilos de polipropileno. Las muestras procesadas fueron entonces tratadas para lisar el tejido con el buffer "Cell Culture Lysis 5X Reagent" de Promega. El buffer se utilizó frío añadiendo 500 µL por tubo, la muestra con el buffer se mezcló por vórtex durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 10,000 g. El sobrenadante resultante se colectó en otro tubo, y se añadieron 250 µL más del buffer de lisis al pellet, se repitió el mismo

procedimiento de homogenizado y centrifugación, y el sobrenadante resultante se colectó y mezcló con el primer sobrenadante obtenido. Las muestras ya procesadas y lisadas fueron almacenadas en frío para su posterior análisis.

#### **6.4.1 Análisis de la eficiencia de transporte específico**

Para evaluar que los nanocomplejos magnéticos y los microbots se hayan dirigido de manera específica al sitio en que se colocó el magneto (sitio tumoral), se midió la fluorescencia en cada muestra, para esto se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 100  $\mu\text{L}$  de PBS, los 150  $\mu\text{L}$  resultantes de cada muestra se colocaron en una placa oscura de 96 pozos de fondo plano (Costar®, Corning Inc). La fluorescencia se midió con el lector de placas Varioskan Lux, de la misma forma en que se explicó anteriormente para ambos fluoróforos utilizados en éste proyecto.

#### **6.4.2 Análisis de la eficiencia de expresión del gen de luciferasa**

La última evaluación experimental a realizar fue la determinación de expresión del gen contenido en el plásmido pCEM-Luc enviado: luciferasa. Para este análisis, se utilizó el kit ONE-Glo™ Luciferase Assay System de Promega, para la determinación de luminiscencia se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra, los cuales fueron colocados en placas blancas de 96 pozos de fondo plano (Costar®, Corning Inc). Posteriormente, a cada muestra se agregaron 100 $\mu\text{L}$  del buffer con sustrato (acorde con las instrucciones del fabricante). La luminiscencia de la placa se leyó utilizando el equipo Varioskan Lux, y el procesamiento de los datos utilizando el software SkanIt, los valores en las gráficas se reportan como unidades relativas de luminiscencia (RLU).

## **6.5. Análisis estadístico**

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos se verificó primero la distribución normal de los datos aplicando una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov utilizando el software estadístico SPSS versión 20. Una vez verificada la normalidad de los datos, se realizó una prueba ANOVA de dos vías, seguida de una prueba post ANOVA para comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey. Estas últimas pruebas, así como las gráficas de los datos, se realizaron con el software estadístico GraphPad Prism versión 6.0.



## VII. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización del plásmido pCEM-Luc

El plásmido purificado y digerido se muestra en la Figura 9 donde se presentan los geles de electroforesis de dichas restricciones: un marcador de peso molecular, el plásmido pCEM-Luc digerido y el plásmido sin cortar como control. En los carriles de los plásmidos sometidos a restricción se observó el patrón de corte esperado para cada digestión, en la digestión con *HindIII-NheI*: un fragmento de 4800 pb correspondiente al vector sin promotor y otro de 273 pb correspondiente al promotor de HSP70, y en la digestión con *XbaI-HindIII*: un fragmento de 3384 pb correspondiente al vector sin el gen de luciferasa y otro de 1689 pb correspondiente al gen de luciferasa. Por otra parte, en los controles se observan dos bandas, correspondientes a dos de las tres conformaciones características que presenta un plásmido en un corrimiento electroforético.

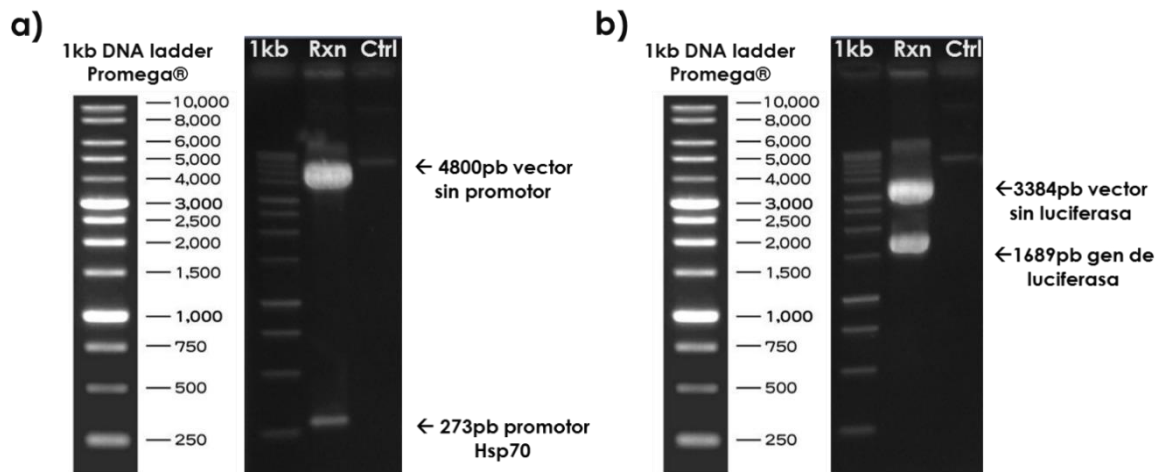


Figura 9. Caracterización enzimática del plásmido pCEM-Luc. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido digerido con diferentes enzimas de restricción. a) Enzimas *HindIII-NheI*, b) Enzimas *XbaI-HindIII*.

## 7.2 Caracterización del perfil de retención, liberación y homogeneidad de los nanocomplejos de Q/pDNA

Las diferentes combinaciones evaluadas en la elaboración de los nanocomplejos fueron: radios proporcionales Q:pDNA (10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 y 60:1) y TPP a ciertos pH (9.2, 5.5 y 3.0), para encontrar la combinación idónea, esto en un volumen final de 30  $\mu$ L.

### 7.2.1 Caracterización del perfil de retención de los nanocomplejos de Q/pDNA

Posterior a la formación de los distintos nanocomplejos, éstos fueron cargados en un gel de agarosa al 0.8% para evaluar su capacidad para retener el DNA plasmídico. Se corrió un gel para cada uno de los diferentes tratamientos de TPP y sus respectivos radios, en cada gel se agregó como control el plásmido desnudo, y los diferentes radios en los siguientes carriles. En la figura 10 se presentan los distintos geles, de manera general se observa que en el radio proporcional menor (R10) se presenta mayor cantidad de pDNA libre (que presenta un corrimiento electroforético igual al control), excepto en la combinación con TPP pH 5.5 (inciso c), donde no se observa pDNA libre. De manera más tenue, se observa algo de pDNA libre en el radio 20 de las combinaciones sin TPP, y con TPP pH 9.2 y 3.0 (incisos a, b y d respectivamente).

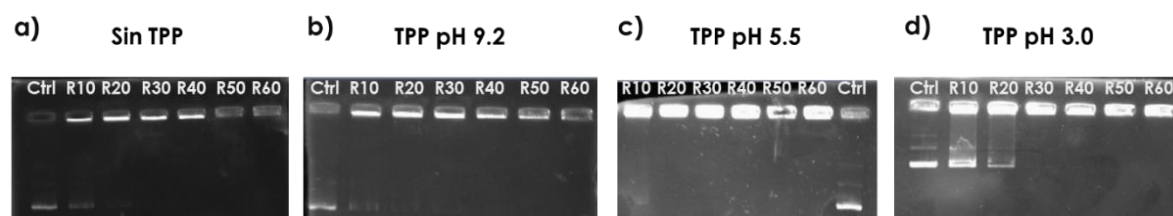


Figura 10. Caracterización del perfil de retención de DNA plasmídico por parte de los nanocomplejos de Q/pDNA. Corrimientos electroforéticos en gel de agarosa de las distintas combinaciones. a) Nanocomplejos sin adición de TPP, b) Nanocomplejos con TPP a pH 9.2 c) Nanocomplejos con TPP a pH 5.5, d) Nanocomplejos con TPP a pH 3.0.

### 7.2.2 Caracterización de homogeneidad y tamaño de los nanocomplejos de Q/pDNA

Al mismo tiempo en que se evaluó el perfil de retención de cada una de las diferentes combinaciones de radios proporcionales y TPP, se evaluó también la estabilidad de los nanocomplejos (a partir del radio 30). Se evaluó la homogeneidad y tamaño de éstos por dispersión de luz dinámica, la media de los tamaños obtenidos se muestra en la Tabla 5, mientras que en la Figura 11 se muestran imágenes representativas de cada uno de los diferentes tratamientos respecto al pH del TPP. En las gráficas se observó que en las combinaciones sin TPP y con TPP a pH básico (incisos a y b) había una alta heterogeneidad y tamaños entre 1-10 nm y 1-30 nm, respectivamente, con una media de ~2 nm. Respecto a las combinaciones con TPP a pH ácido, éstas presentaron nanocomplejos más homogéneos y con tamaños de 1-10 nm (pH 5.5, inciso c) y 1-5 nm (pH 3.0, inciso d) y una media de ~3nm.

Tabla 5. Tamaño de nanocomplejos de Q/pDNA elaborados a diferentes combinaciones de radios proporcionales y TPP.

<b>Radio proporcional Q:pDNA</b>	<b>Sin TPP</b>	<b>TPP pH 9.2</b>	<b>TPP pH 5.5</b>	<b>TPP pH 3.0</b>
<b>Radio 30</b>	2.555	2.068	2.77	3.193
<b>Radio 40</b>	2.294	2.388	3.165	2.264
<b>Radio 50</b>	2.365	2.131	2.168	2.623
<b>Radio 60</b>	2.165	2.214	3.283	2.593

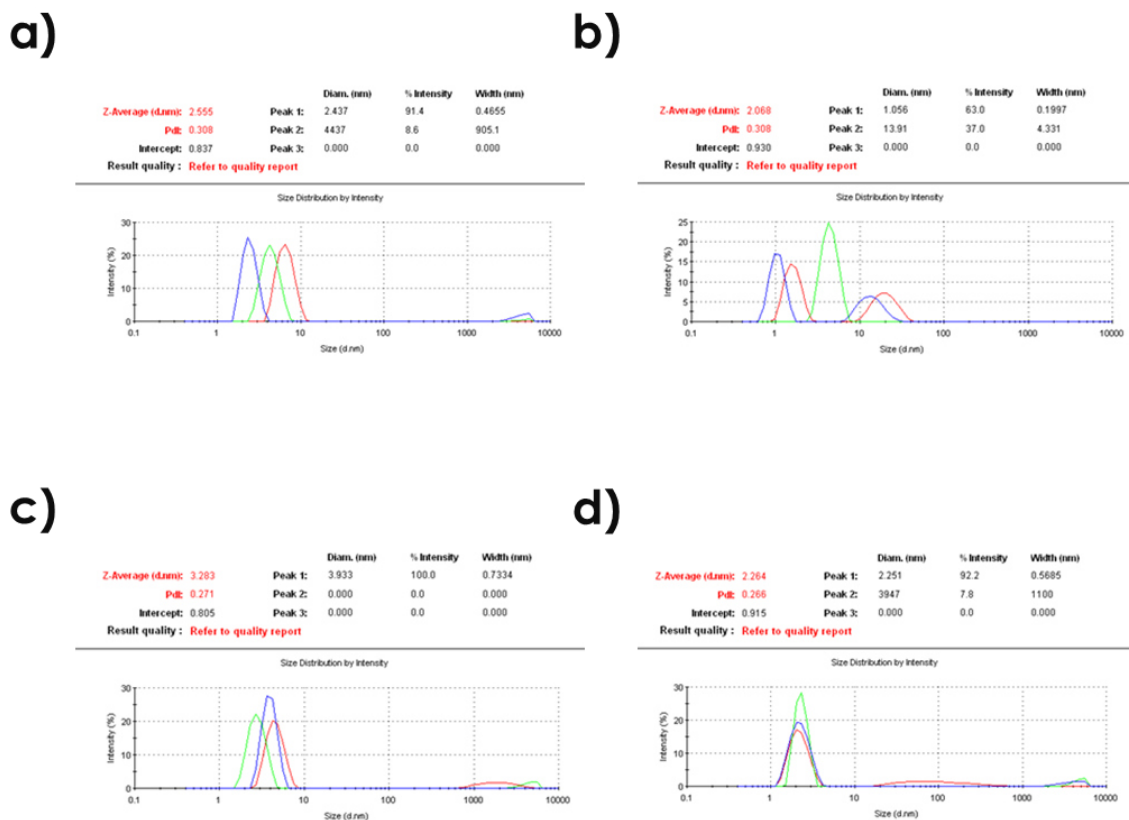


Figura 11. Homogeneidad y tamaño de los nanocomplejos de Q/pDNA. Gráficas del porcentaje de intensidad según el tamaño observado. a) Nanocomplejos sin adición de TPP, b) Nanocomplejos con TPP a pH 9.2 c) Nanocomplejos con TPP a pH 5.5, d) Nanocomplejos con TPP a pH 3.0.

### 7.2.3 Caracterización del perfil de liberación de DNA de los nanocomplejos de Q/pDNA

Los nanocomplejos incubados durante 144 horas, fueron centrifugados cada determinado tiempo, y su sobrenadante colectado para cuantificar el DNA plasmídico presente. Las mediciones de cada hora fueron registradas para cada una de las combinaciones diferentes de TPP y radio proporcional. En la Tabla 6 se muestra el pDNA liberado en cada una de las combinaciones durante las 144 horas, en donde de manera general, se observa una menor liberación de pDNA en los radios con TPP a pH 5.5 respecto a la cantidad liberada en los radios con TPP a pH 3.0. En la figura 12 se muestran gráficas representativas de ambos pHs. En la mayoría de las combinaciones con TPP a pH 5.5 (inciso a) se observó

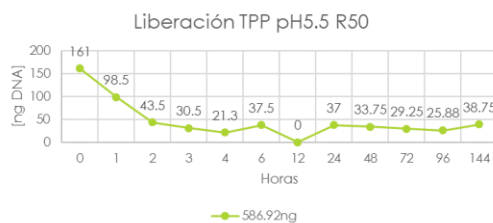
que se liberaban ~600 ng de DNA con un pico negativo a las 12 horas, mientras que para las combinaciones con TPP a pH 3.0 (inciso b) fueron liberados ~700 ng con un pico positivo a las 12 horas.

Tabla 6. Liberación total de pDNA por parte de los nanocomplejos de Q/pDNA durante 144 horas.

<b>Radio proporcional Q:pDNA</b>	<b>TPP pH 5.5</b>	<b>TPP pH 3.0</b>
<b>Radio 30</b>	646.15 ng	724.925 ng
<b>Radio 40</b>	597.925 ng	662.075 ng
<b>Radio 50</b>	586.925 ng	605.4 ng
<b>Radio 60</b>	721.2 ng	714.075 ng

a)

TPP pH 5.5



b)

TPP pH 3.0



Figura 12. Liberación de DNA por parte de los nanocomplejos de Q/pDNA. Gráficas lineales de la cantidad de DNA plasmídico liberado durante 6 días. a) Nanocomplejos con TPP a pH 5.5, b) Nanocomplejos con TPP a pH 3.0.

### 7.3 Caracterización del tamaño y potencial Z de las NPMF y los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF

Se evaluó en principio tamaño y homogeneidad de las NPMF; y posteriormente de los nanocomplejos, todo por dispersión de luz dinámica. En la Figura 13 se muestra la gráfica obtenida para la evaluación de tamaño y homogeneidad de las NPMF, en donde se puede

observar un poco de heterogeneidad en el tamaño de la muestra, con polidispersión de 0.184 y un tamaño promedio de ~125 nm con 93.6% de intensidad en el primer pico, y un segundo pico de ~5396 nm con 6.4% de intensidad.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 159.9	<b>Peak 1:</b> 125.0	93.6	26.00
<b>Pdl:</b> 0.184	<b>Peak 2:</b> 5364	6.4	332.2
<b>Intercept:</b> 0.566	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Result quality : Refer to quality report</b>			

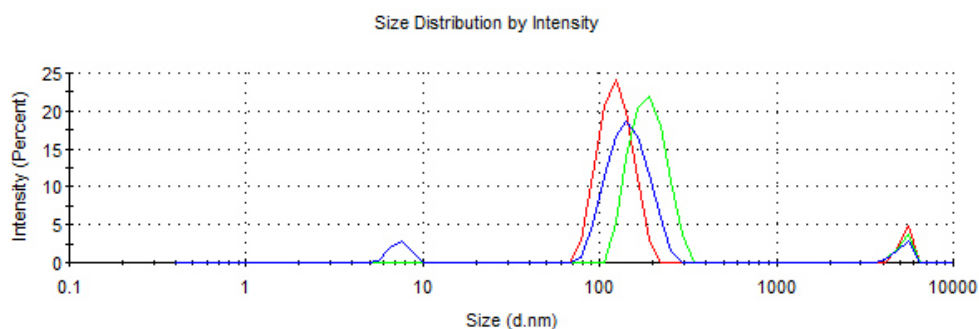


Figura 13. Homogeneidad y tamaño de las NPMF.

Respecto a las evaluaciones de los nanocomplejos, en la Tabla 7 se muestran los tamaños obtenidos, porcentajes de intensidad y homogeneidad de los nanocomplejos obtenidos para los diferentes radios proporcionales Q:pDNA.

Tabla 7. Tamaño e intensidad de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF elaborados a diferentes combinaciones de radios proporcionales T = tamaño I = intensidad.

<b>R30</b>		<b>R40</b>		<b>R50</b>		<b>R60</b>	
<b>T</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>I</b>
660.8 nm	33.5%	383.7 nm	52%	554.3 nm	56%	521.7 nm	52.1%
670 nm	14.1%	594 nm	70.5%	559.2 nm	54.5%	527.3 nm	74.6 %
466.7 nm	31%	625.5 nm	35.7%	634.2 nm	53.4%	669.1 nm	64%
454.8 nm	18.5%	373.2 nm	49.2%	429.6 nm	63.3%	371 nm	38.6%
<b>Promedio</b>							
<b>T</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>I</b>
563.08 nm	24.27%	494.1 nm	51.85%	544.33 nm	56.8%	522.28 nm	57.33%

Una vez que se determinó, en base a todas las evaluaciones anteriores, que las mejores condiciones eran utilizar TPP a pH 3.0 y radio proporcional Q:pDNA 60:1, se procedió a variar entre la concentración de las NPMF, así como en el volumen final (datos no mostrados) determinando como mejores una concentración de 100 µg/ml de nanopartículas acomplejadas a 1µg de pDNA, y una volumen final de 60 µL . Una velocidad de 950 rpm y un volumen de 60 µL, junto con las condiciones establecidas anteriormente, fueron las ideales para la elaboración de los nanocomplejos finales. En la Figura 14 se muestra la gráfica obtenida para la evaluación de tamaño de éstos nanocomplejos, en donde se observa una homogeneidad de la muestra con polidispersión de 0.216, y un tamaño promedio de ~226 nm con 100% de intensidad.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 226.3	<b>Peak 1:</b> 209.2	100.0	49.14
<b>Pdl:</b> 0.216	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Intercept:</b> 0.969	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Result quality :</b> Good			

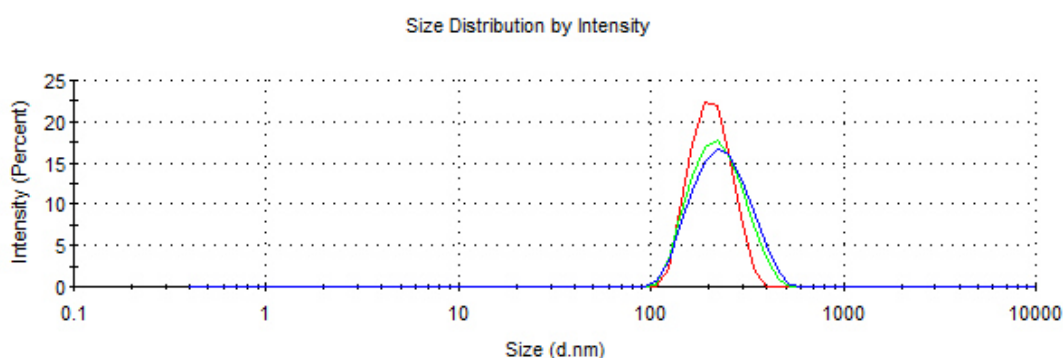


Figura 14. Homogeneidad y tamaño de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF. Nanocomplejos con radio proporcional 60:1 y TPP a pH 3.0.

Respecto al potencial zeta de los nanocomplejos, en la figura 15 se muestra la gráfica obtenida para ésta medición, los resultados mostraron un potencial Z positivo con una media de ~14.7 mV en el 100% de la muestra.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> 14.7	Peak 1: 14.7	100.0	4.30
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 4.30	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 0.603	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

**Result quality : Good**

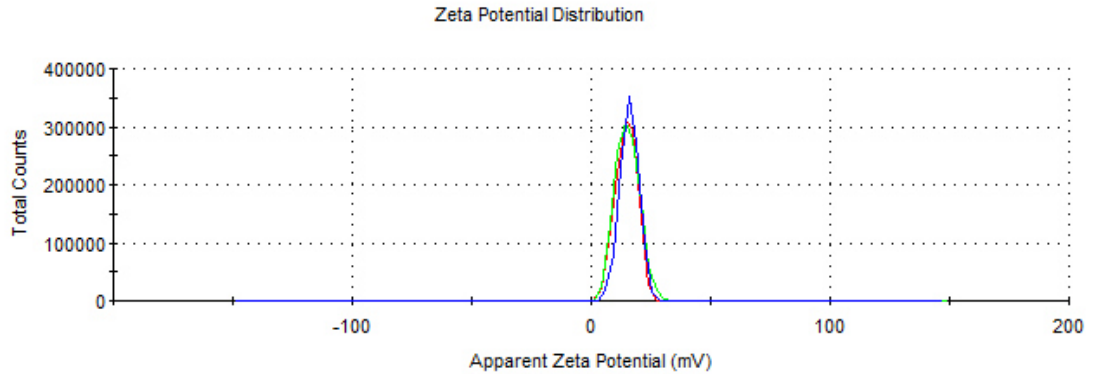


Figura 15. Potencial Z de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF. Nanocomplejos con radio proporcional 60:1 y TPP a pH 3.0.

#### 7.4 Evaluación de la citotoxicidad de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF

En la figura 16 se muestran las gráficas para cada uno de los tratamientos, y en la Tabla 8 su  $CC_{50}$  correspondiente.

Tabla 8. Concentración citotóxica 50 calculada para los nanocomplejos o sus componentes.

	Nanocomplejos	NPMF	Quitósán	DNA
$CC_{50}$	2.52 $\mu$ g	2.50 $\mu$ g	5.99 $\mu$ g	2.30 $\mu$ g



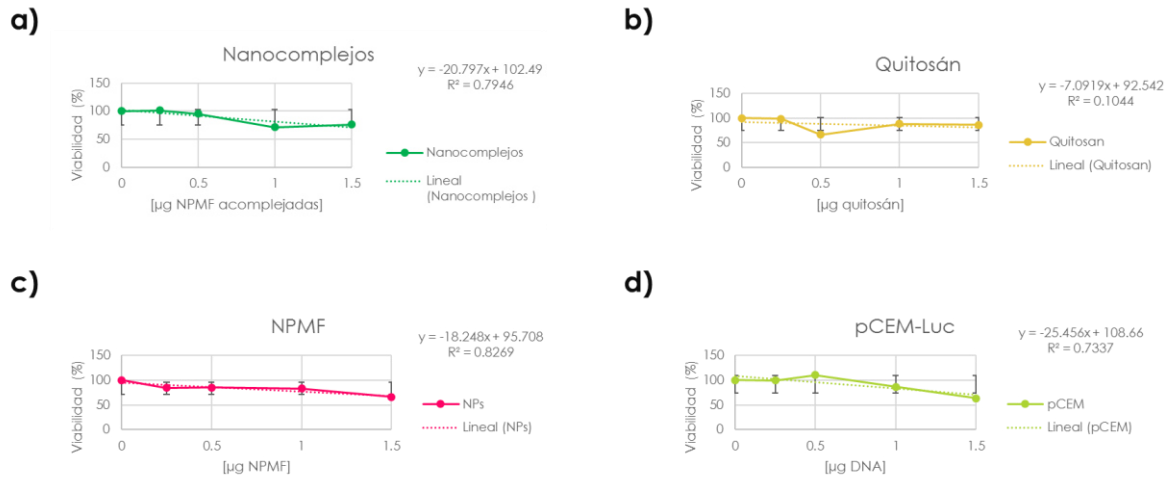


Figura 16. Viabilidad de células B16F10 transfectadas con los nanocomplejos y sus componentes. Graficas lineales de las absorbancias obtenidas con diferentes concentraciones de nanocomplejos o sus componentes. a) Nanocomplejos b) Quitosán c) NPMF d) pDNA.

En los ensayos realizados se observó que tanto los nanocomplejos (inciso a) como el pDNA (inciso d) y las NPMF (inciso c) presentaron una  $CC_{50}$  similar:  $\sim 2.5 \mu\text{g}$ , y solo la  $CC_{50}$  del quitosán (inciso b) fue diferente, con un valor de casi el doble que el resto:  $5.99 \mu\text{g}$ .

## 7.5 Caracterización de forma y tamaño de las NPMF y los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF por MFA

Los nanocomplejos, así como las nanopartículas por separado, fueron analizados por microscopía de fuerza atómica. En la figura 17 se muestran las imágenes de altura obtenidas, en donde se puede observar que el tamaño aproximado de las NPMF (inciso a) es de entre 70-120 nm y el de los complejos (inciso b) de 200-300 nm, en cuanto a la forma, tanto las nanopartículas como los nanocomplejos presentan una forma esférica un poco ovalada (elipsoide).

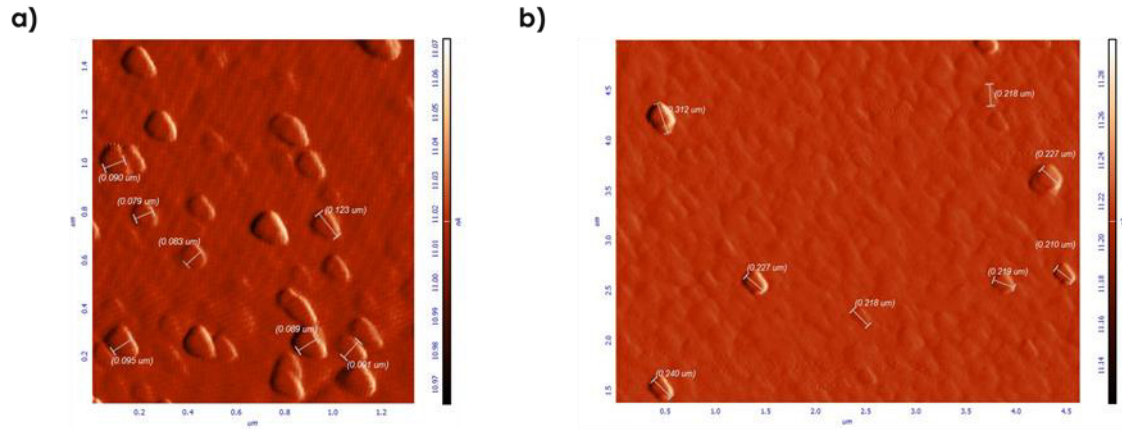


Figura 17. Microscopía de fuerza atómica de las NPMF y los nanocomplejos de Q-DNA-NPMF. a) NPMF b) Nanocomplejos de Q-DNA-NPMF.

### 7.6 Evaluación del tamaño y potencial Z de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF adicionando el fluoróforo FITC

Se elaboraron nanocomplejos con Q marcado con FITC (a diferentes concentraciones) y se evaluó su tamaño por dispersión de luz dinámica. En la tabla 9 se reportan tanto el tamaño como la heterogeneidad obtenida para cada concentración utilizada, se observa que al añadir el fluoróforo a los nanocomplejos, el tamaño de éstos aumenta, sin embargo, entre más baja sea la concentración utilizada (1.98 mg/ml), menor el tamaño obtenido, lo mismo ocurre con la heterogeneidad de la muestra, a menor concentración menor heterogeneidad. En la Figura 18 se muestra la gráfica obtenida en la concentración de 1.98 mg/ml, el tamaño promedio obtenido fue de ~289 nm con 98.8% de intensidad en el primer pico, y un segundo pico de ~5411 nm con 1.2% de intensidad, se observa también una homogeneidad de la muestra con polidispersión de 0.230.

Tabla 9. Tamaño de nanocomplejos marcados con diferentes concentraciones de FITC.

Concentración final quitosán	Tamaño (nm)	Heterogeneidad
[1.5 mg/ml]	1034 y 4554	Muy alta
[1 mg/ml]	102 y 4610	Muy alta
[1.8 mg/ml]	604	Baja
[1.98 mg/ml]	289 y 5411	-

Ya establecida la concentración ideal para elaborar los nanocomplejos marcados con FITC, se determinó también el potencial zeta de éstos. El valor obtenido se presenta en la Figura 19, donde se observa un potencial Z positivo con una media de ~13.9 mV en el 100% de la muestra.

**Z-Average (d.nm): 280.7**  
**Pdl: 0.230**  
**Intercept: 0.962**  
**Result quality : Good**

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Peak 1:	289.9	98.8	100.7
Peak 2:	5411	1.2	301.1
Peak 3:	0.000	0.0	0.000

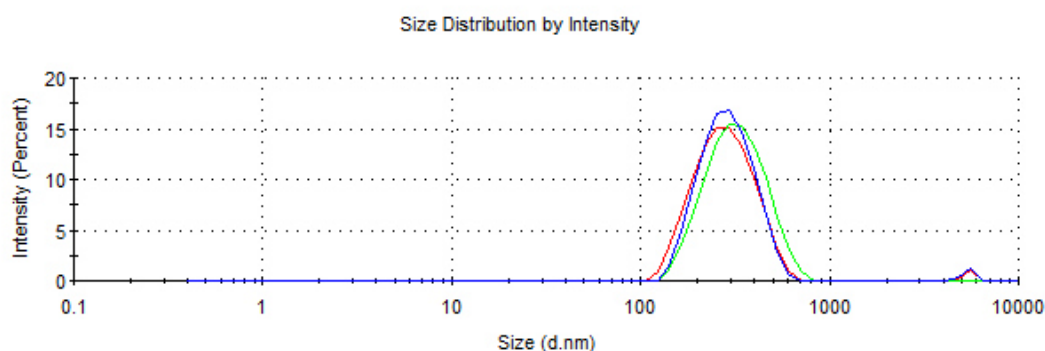


Figura 18. Homogeneidad y tamaño de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF marcados con FITC. Nanocomplejos con radio proporcional 60:1 y TPP a pH 3.0, con FITC a una concentración de 1.98 mg/ml.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> 13.9	Peak 1: 13.9	100.0	3.98
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 3.98	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 0.579	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

**Result quality :** Good

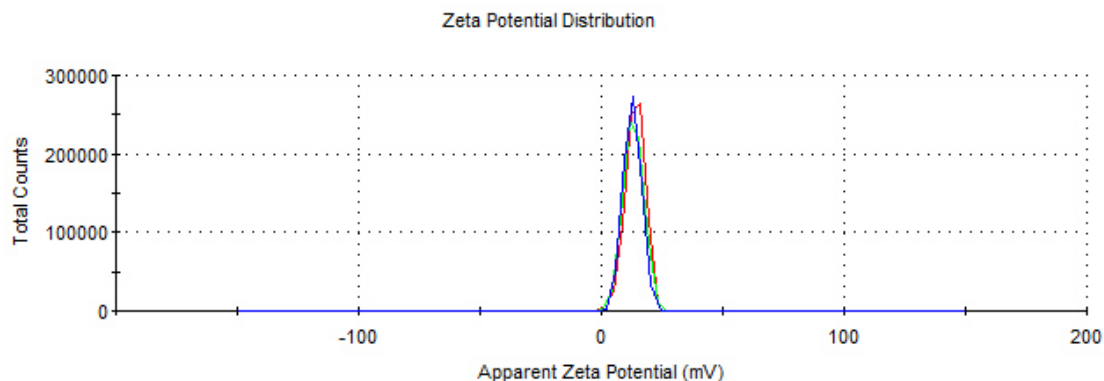


Figura 19. Potencial Z de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF marcados con FITC. Nanocomplejos con radio proporcional 60:1 y TPP a pH 3.0, con FITC a una concentración de 1.98 mg/ml.

### 7.7 Evaluación de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF a gran escala

Se estandarizó y evaluó la fluorescencia que presentaban las NPMF y los nanocomplejos a diferentes concentraciones, desde la cantidad usada en la estandarización de los nanocomplejos, hasta la empleada para los ensayos *in vivo*. En la Figura 20 se presenta la fluorescencia de las NPMF en donde se observa un aumento de fluorescencia gradual, a medida que aumenta la concentración de nanopartículas.

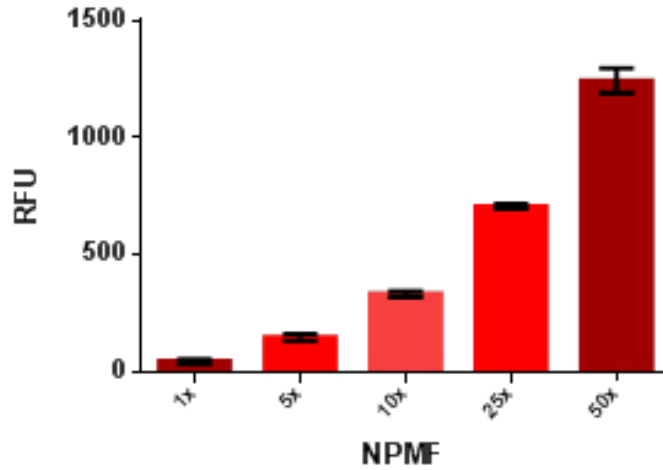


Figura 20. Fluorescencia de NPMF a diferentes concentraciones. Promedio de mediciones realizadas por triplicado de NPMF a la cantidad empleada para la elaboración de nanocomplejos, ex 673nm em 695nm.

Respecto a la fluorescencia de los nanocomplejos, en la Figura 21 se presenta la gráfica de éstos nanocomplejos a diferentes concentraciones. La fluorescencia aumenta de manera gradual y se presentan intensidades 10 veces menor que en las NPMF solas.

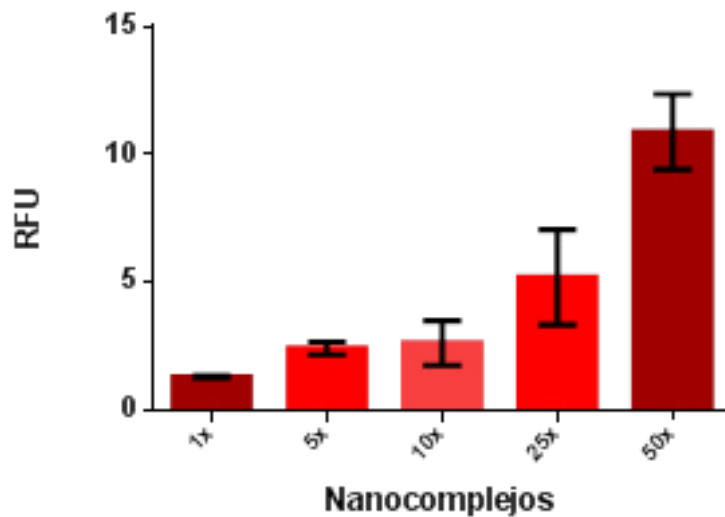


Figura 21. Fluorescencia de Nanocomplejos a diferentes concentraciones. Promedio de mediciones realizadas por triplicado, ex 673 nm em 695 nm.

## **7.8 Caracterización de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos**

Para caracterizar los microbots se realizaron distintas evaluaciones, tanto morfológicas como de capacidad de carga. En cuanto a las evaluaciones morfológicas, éstas se observaron por microscopía de fuerza atómica (FMA) y por microscopía de fluorescencia, respecto a la capacidad de carga, las evaluaciones se realizaron a través de potencial zeta, cuantificación de fluorescencia y perfil de sedimentación.

### **7.8.1 Caracterización de los microbots basados en eritrocitos**

#### **7.8.1.1 Caracterización de los microbots basados en eritrocitos y nanocomplejos magnéticos por FMA**

En la Figura 22 se muestran imágenes de altura de un eritrocito completo (a), la gráfica de altura y la imagen en 3D resultantes de la primera imagen (b y c respectivamente). Se muestra también un acercamiento al centro del eritrocito (d), y las respectivas gráficas de altura (e) e imagen en 3D (f), (la línea celeste en las imágenes a y d indican el área mostrada en la gráfica de altura, el mismo formato fue utilizado para el resto de las imágenes de FMA presentadas). En las imágenes presentadas se puede observar la morfología bicóncava característica del eritrocito, así como su membrana lisa y sin protuberancias y un tamaño de  $\sim 8\mu\text{m}$ .

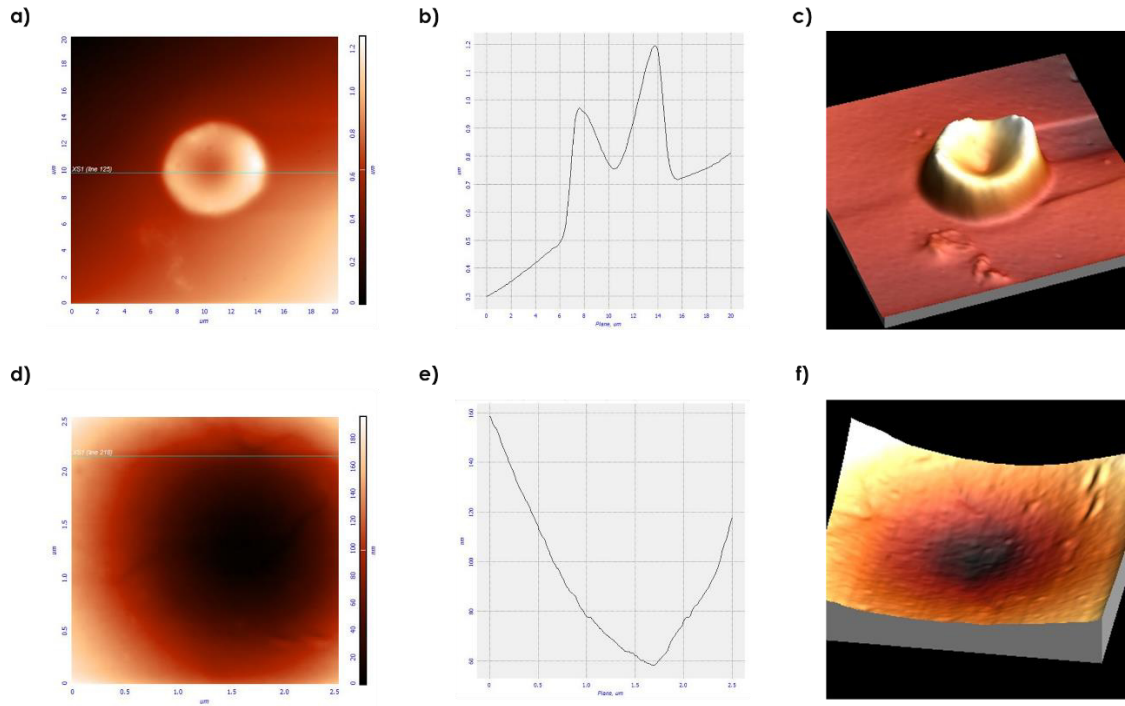


Figura 22. Microscopía de fuerza atómica de un eritrocito completo y el centro de éste. Eritrocito completo; a) Imagen de altura, b) Gráfica de altura, c) Imagen en 3D. Centro del eritrocito: d) Imagen de altura, e) Gráfica de altura, f) Imagen en 3D.

Respecto a las imágenes del microbot, éstas se presentan en la Figura 23, los incisos a, b y c corresponden a la imagen de altura, gráfica de ésta e imagen en 3D respectivamente, de un eritrocito con nanocomplejos. Los incisos d, e y f corresponden al mismo tipo de imágenes anteriores, pero de un eritrocito con la mitad de concentración de nanocomplejos respecto al representado en los incisos a, b y c. Por último, los incisos g, h, e i muestran las imágenes de altura, gráfica de ésta, e imagen en 3D, de la mitad superior del eritrocito anterior. En las imágenes de dicha figura se puede observar la morfología bicóncava característica del eritrocito, y de manera adicional, los nanocomplejos unidos a su superficie, observadas como ciertas protuberancias sobre ésta, y picos en las gráficas de altura.

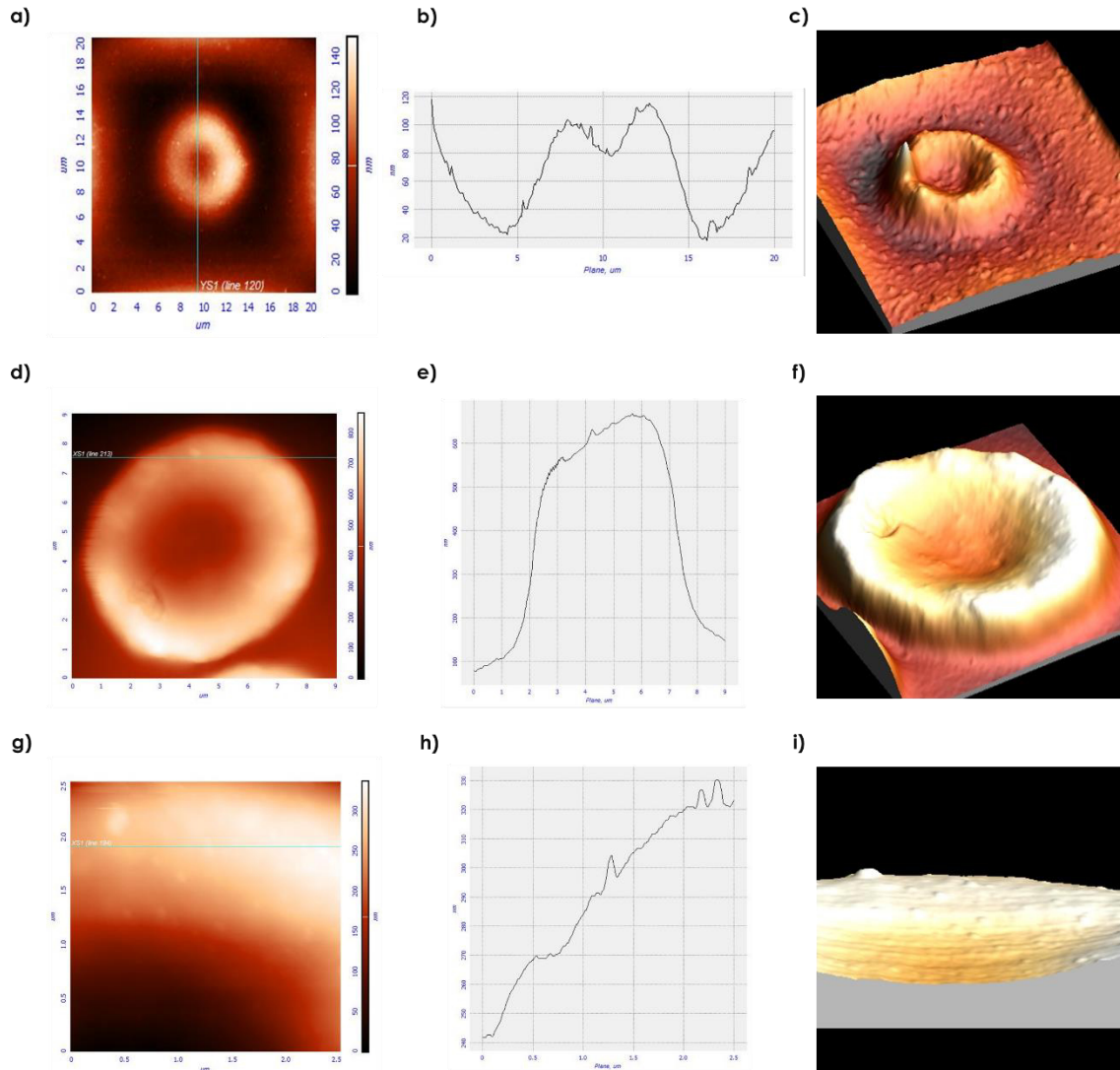


Figura 23. Microscopía de fuerza atómica de un microbot basado en eritrocitos. Microbot completo; a) Imagen de altura, b) Gráfica de altura, c) Imagen en 3D. Microbot completo con concentración media de nanocomplejos: d) Imagen de altura, e) Gráfica de altura, f) Imagen en 3D. Área superior del microbot: g) Imagen de altura, h) Gráfica de altura, i) Imagen en 3D.

### 7.8.1.2 Caracterización de microbots basados en eritrocitos y nanocomplejos magnéticos por microscopía de fluorescencia

Al igual que en la microscopía de fuerza atómica, se observaron primero los eritrocitos solos, y después los eritrocitos con los nanocomplejos magnéticos adheridos a la



membrana celular, las imágenes obtenidas se muestran en las Figuras 24 y 25. En la Figura 24 se observan varios eritrocitos en campo claro (a) y campo oscuro (b), así como un acercamiento a un solo eritrocito en campo claro y campo oscuro también (c y d), en las imágenes se aprecia la morfología circular característica del eritrocito, así como la escasa o nula autofluorescencia que presenta por sí misma la célula.

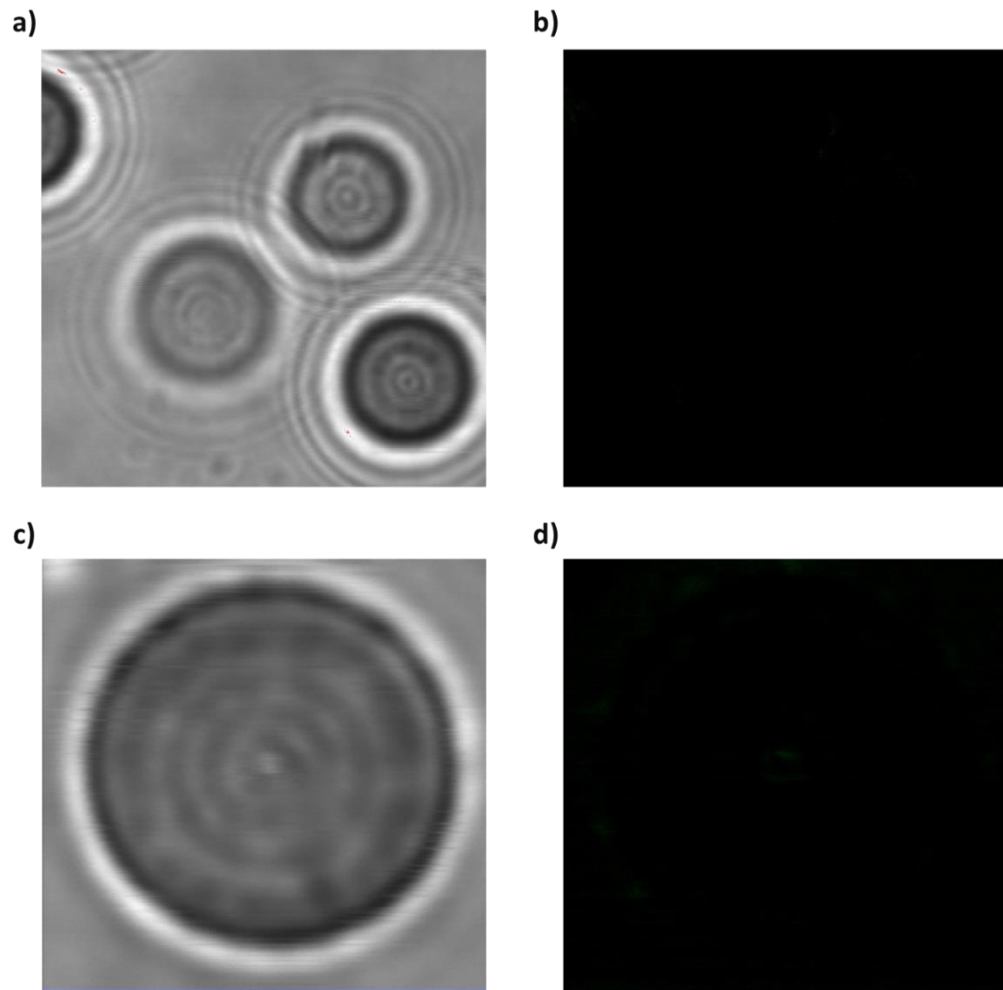


Figura 24. Microscopía de fluorescencia de eritrocitos. Eritrocitos: a) Campo claro, b) campo oscuro; Eritrocito individual: c) Campo claro, d) Campo oscuro.

Respecto a las imágenes de los microbots (Figura 25), se muestran varios microbots en campo claro y campo oscuro (a y b), así como un acercamiento a uno de éstos en campo claro y campo oscuro (c y d). Al igual que los eritrocitos solos, se observa

la morfología circular característica de la célula, y a diferencia de las anteriores, se observa fluorescencia en toda la membrana celular, sobre todo al centro de la célula y en los bordes de ésta.

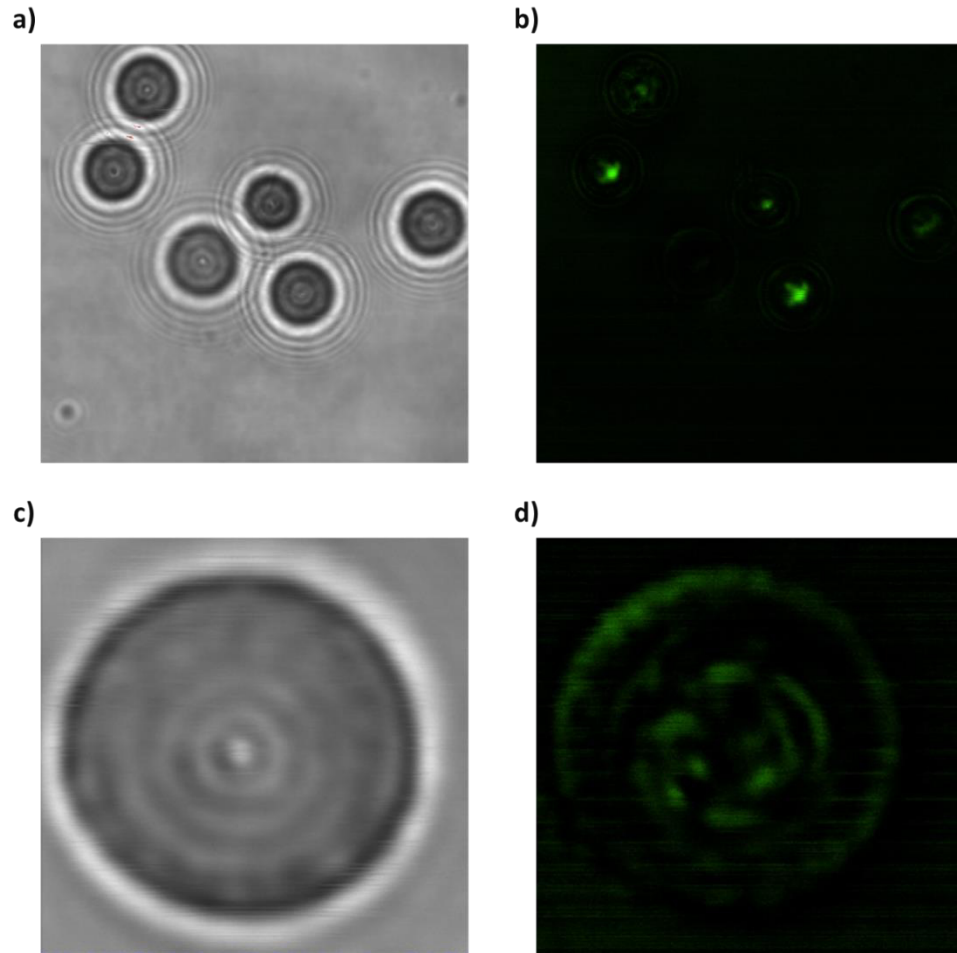


Figura 25. Microscopía de fluorescencia de microbots basados en eritrocitos. Microbots: a) Campo claro, b) Campo oscuro; Microbot individual c) Campo claro, d) Campo oscuro.

## 7.9 Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos

Una vez que se comprobó, a través de ambas microscopías, que los nanocomplejos se unían a los eritrocitos para formar los microbots, se procedió a estandarizar la capacidad

de los eritrocitos, que se evaluaron mediante medición de potencial zeta, fluorescencia y perfil de sedimentación.

### **7.9.1 Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos mediante medición de potencial zeta**

En la Tabla 10 se presentan los valores obtenidos para dichas mediciones. En los resultados se observa que en potencial zeta de los eritrocitos sin nanocomplejos es de -16.3 mV, y que en los microbots con eritrocitos menos diluidos cambia a -11.1 mV, se observa también que a medida que la concentración de eritrocitos aumenta, el potencial zeta se estabiliza y se mantiene en un valor cercano al de los eritrocitos solos.

Tabla 10. Potencial zeta de eritrocitos a diferentes concentraciones cargados con nanocomplejos 50X.

<b>Tratamiento</b>	<b>Potencial Z (mV)</b>
Eritrocitos Ctrl	-16.3
Microbots 1	-11.1
Microbots 2	-12.9
Microbots 3	-12.3
Microbots 4	-17.0
Microbots 5	-14.0

### **7.9.2 Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos mediante fluorescencia**

Se registró la fluorescencia de los distintos microbots elaborados, y se añadieron como controles nanocomplejos y eritrocitos solos, las gráficas obtenidas se muestran en las

Figuras 26 y 27. Para la fluorescencia en verde (Figura 26) se observó que los eritrocitos solos no presentaron señal, y que los microbots 1 presentaron una mayor fluorescencia que el resto, en donde la fluorescencia observada fue similar. Por otro lado, en la gráfica correspondiente a la fluorescencia en rojo (Figura 27) se observa que los eritrocitos solos si presentan cierta señal, pero que los microbots presentan una intensidad de fluorescencia mayor, y similar entre ellos.

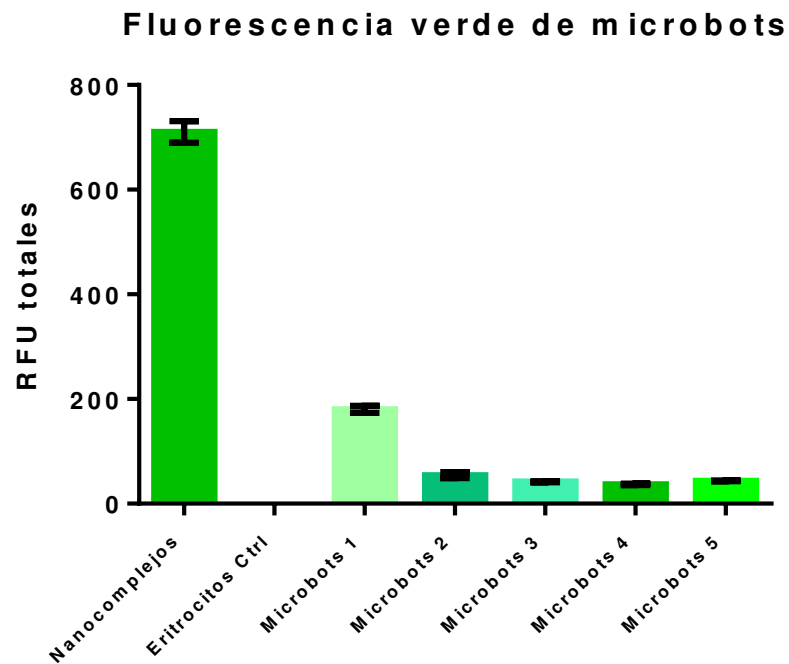


Figura 26. Fluorescencia verde de microbots a diferentes concentraciones. Promedio de mediciones realizadas por triplicado a la misma concentración de eritrocitos unidos con una concentración de nanocomplejos constante, ex 495nm em 525nm.

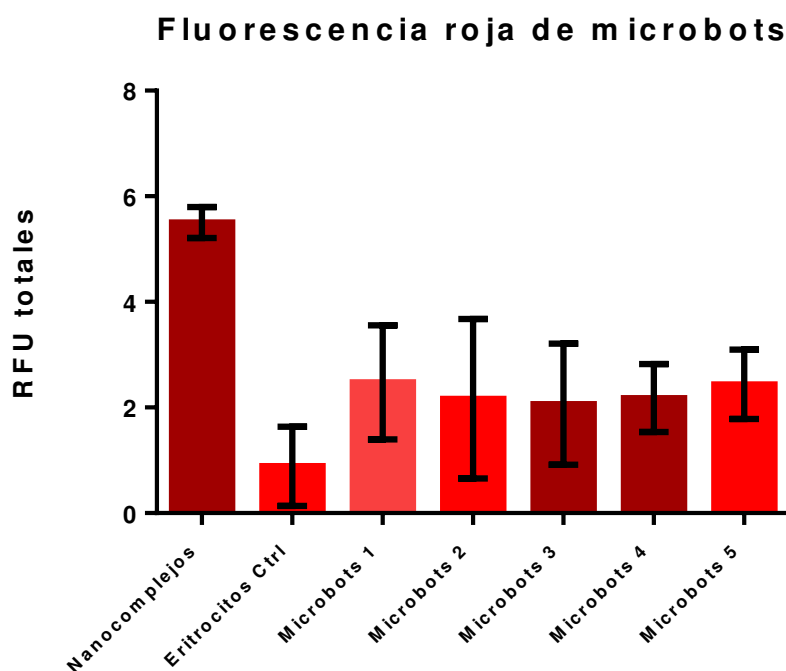


Figura 27. Fluorescencia roja de microbots a diferentes concentraciones. Promedio de mediciones realizadas por triplicado a la misma concentración de eritrocitos unidos con una concentración de nanocomplejos constante, ex 673nm em 695nm.

### 7.9.3 Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos mediante perfil de sedimentación

Posterior a los análisis de potencial zeta y fluorescencia, se observó el perfil de sedimentación de los eritrocitos a diferentes concentraciones y cargados con nanocomplejos, omitiendo el tratamiento de microbots 5. En la figura 28 se muestran las fotografías del perfil de sedimentación al incubar por 10, 20 y 30 minutos (incisos a, b y c respectivamente), así como el perfil post centrifugación (inciso d). En los resultados se puede observar que la sedimentación aumenta cuando se tiene una mayor concentración celular, los eritrocitos con nanocomplejos sedimentan en un menor tiempo, pero quedan unidos la pared del tubo, de manera importante, se observó que posterior a la centrifugación, todos los tratamientos presentan una completa sedimentación con un

sobrenadante claro, a diferencia del tratamiento microbots 1, donde el sobrenadante se observa con una coloración roja.

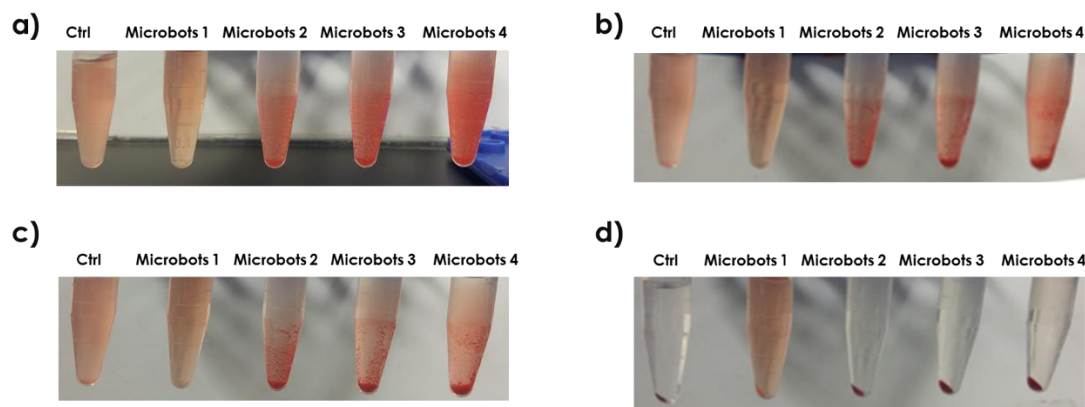


Figura 28. Perfil de sedimentación de microbots a diferentes concentraciones. a) 10 minutos de sedimentación, b) 20 minutos de sedimentación, c) 30 minutos de sedimentación, d) sedimentación post centrifugación.

## 7.10 Evaluación *in vivo* de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos

Para la evaluación *in vivo* de los microbots, se buscó probar dos principios: su eficiencia de transporte específico, así como la eficiencia de expresión génica del gen reportero.

### 7.10.1 Análisis de la eficiencia de transporte específico de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos

La intensidad de fluorescencia de cada órgano, así como del tumor, por grupo se muestra en la figura 29. En donde se registró una mayor intensidad de fluorescencia en tumor, seguido de hígado, y con una diferencia altamente significativa entre los grupos de microbots vs nanocomplejos y microbots vs control.

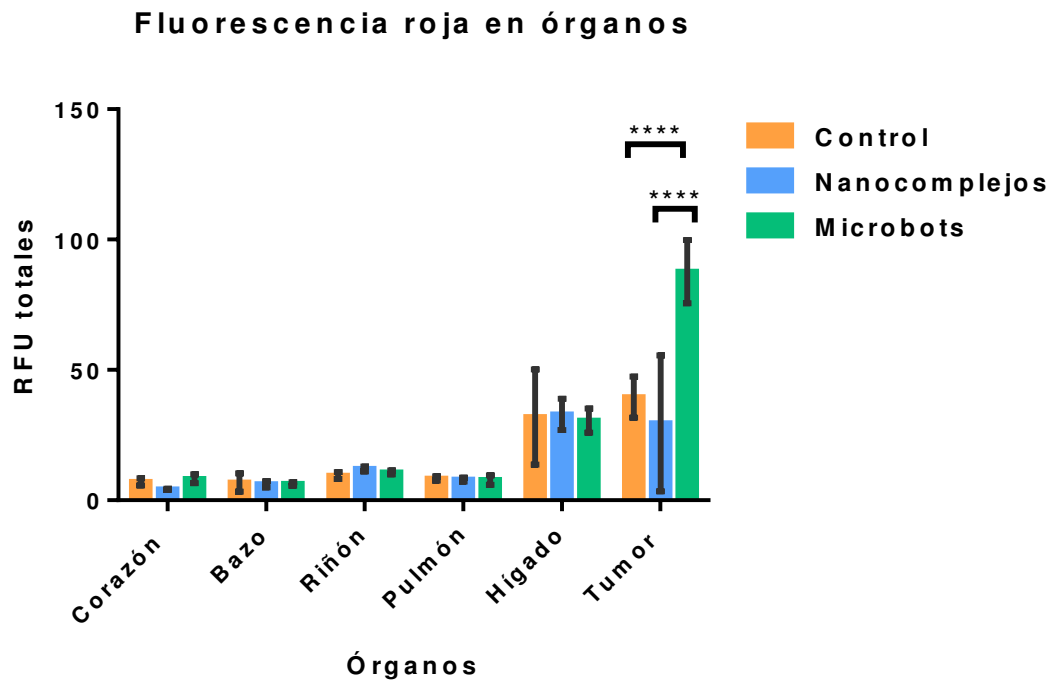


Figura 29. Fluorescencia de órganos y tumor de ratones inoculados con los diferentes tratamientos. Promedio de las mediciones (n=3) ex 673nm en 695nm. Barras de desviación estándar mostradas, 2way ANOVA, Tukey post ANOVA, \*\*\*\* p<0.0001.

### 7.10.2 Evaluación de expresión génica específica de los microbots basados en células y nanocomplejos magnéticos

Para analizar la intensidad de luminiscencia tanto de órganos como tumor de cada grupo, se muestra la lectura de intensidad de luminiscencia, los resultados de cada órgano por grupo se presentan en la Figura 30.

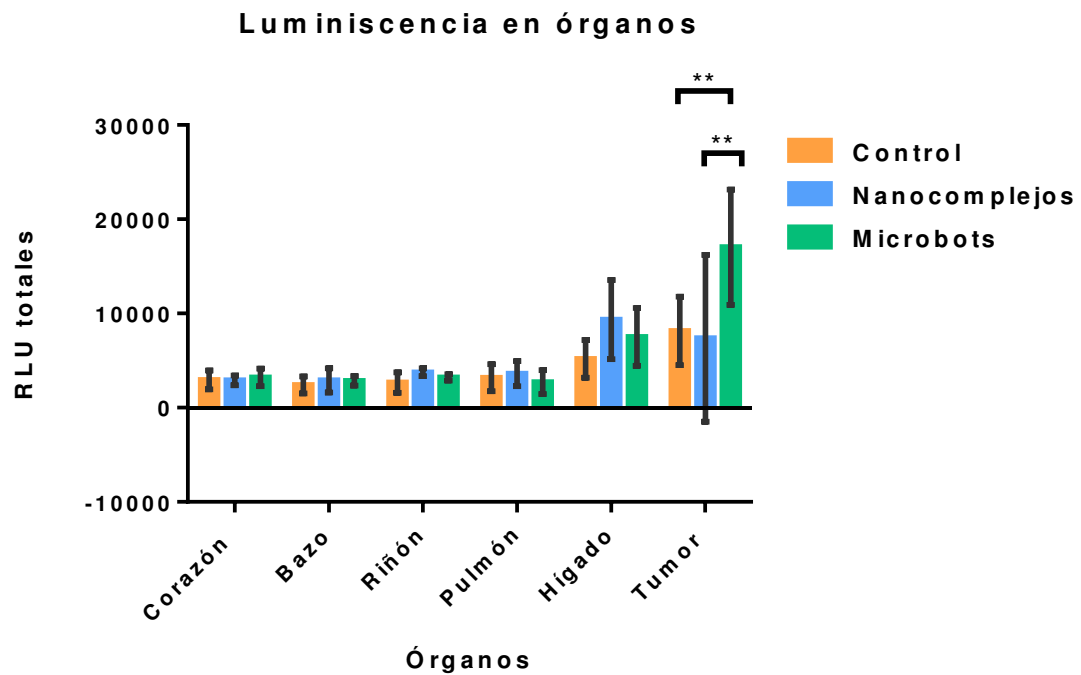


Figura 30. Luminiscencia de órganos y tumor de ratones inoculados con los diferentes tratamientos. Promedio de las mediciones (n=3). Barras de desviación estándar mostradas, 2way ANOVA, Tukey post ANOVA, \*\* p<0.01.

Al analizar los resultados obtenidos en luminiscencia se observó una mayor intensidad de señal en tumor, seguido de hígado, y al analizar estadísticamente los datos, se determinó que existe una diferencia altamente significativa entre los grupos de microbots vs nanocomplejos y microbots vs control en tumor.



## VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló y evaluó un microbot basado en eritrocitos y nanocomplejos magnéticos, como prototipo para el envío dirigido de genes terapéuticos. Un aspecto importante que debe ser resaltado, es que para el desarrollo del microbot propuesto se emplearon componentes no tóxicos, ya que, aunque muchas de las terapias que se desarrollan prometen ser exitosas en etapas *in vitro*, cuando estas se escalan y son administradas a nivel *in vivo* presentan múltiples desventajas, pues resultan ser tóxicas o invasivas. Por lo tanto, en el sistema aquí desarrollado se tomaron en cuenta dichos aspectos desde el inicio del planteamiento del sistema.

Las nanopartículas magnéticas empleadas están compuestas por un núcleo de SPIO: un material empleado ya en clínica para diagnósticos por resonancia magnética, la cubierta de las nanopartículas es de sílice: un componente material biocompatible similar a los utilizados en suplementos diarios de calcio; y finalmente, la fluorescencia está dada por un fluoróforo orgánico unido covalentemente y aprobado por la FDA (Fu *et al.*, 2012). En la elaboración de los nanocomplejos, para proteger al pDNA se utilizó quitosán, el cual es un biopolímero biocompatible y no tóxico, cuyo uso está aprobado por la FDA, empleándose ya en diversas áreas alimenticias y médicas (Dash *et al.*, 2011).

Utilizar eritrocitos como vectores representa una gran ventaja para el sistema, pues las células permiten dirigir y proteger los nanocomplejos a través del cuerpo hasta llegar al sitio de acción. Pueden ser obtenidas de manera fácil y rápida, no provocan un rechazo, efecto adverso o respuesta inmune al ser tomadas del mismo sujeto a tratar. Son una alternativa muy poco invasiva y la mejor opción de células tomadas del paciente, pues no necesitan ser diferenciadas para poder utilizarse, y son el tipo celular más abundantes en sangre, en promedio, un adulto presenta de 4 a 6 millones de células por  $\mu\text{L}$ .

Otro aspecto importante del sistema es el elemento que permite controlar la liberación del gen enviado. Como se ha mencionado ya a lo largo de éste escrito, la expresión del gen contenido en el plásmido pCEM-Luc es inducida por la presencia de un campo magnético externo, pues dicho plásmido contiene el promotor de la proteína HSP70, el cual como se ha reportado ya por el grupo de Lin y cols en 1999, puede ser

inducido por un campo magnético para activar la expresión de un gen río abajo del cassette de expresión en que se encuentre. El plásmido utilizado en este proyecto fue construido por nuestro grupo de trabajo (Rodríguez *et al.*, 2009) y su efectividad ha sido ya evaluada tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* en diferentes líneas celulares y modelos murinos (Heredia *et al.*, 2010; Alvizo *et al.*, 2014). A pesar de que el uso de plásmidos con promotores inducibles pueda ser una terapia prometedoras en terapia génica, su efectividad es limitada cuando se pretenden utilizar *in vivo*, pues al administrar el pDNA desnudo, éste puede ser fácilmente degradado por endo/exo nucleasas intra/extracelulares (Ribeiro *et al.*, 2004).

Debido a esta limitante, desde hace décadas se buscó acomplejar el pDNA con biopolímeros que pudieran protegerlo y mejorar sus niveles de transfección. Son muchas ya las opciones en este campo, y entre las más empleadas se encuentra el uso de quitosán, un biopolímero catiónico biodegradable y no tóxico, cuyo uso en industria farmacéutica y alimenticia ha sido ya aprobado por la FDA (Dash *et al.*, 2011). Entre las diferentes variedades de quitosán que se usan actualmente, en éste proyecto utilizamos uno soluble en agua, que, a diferencia de la mayoría de los comercialmente disponibles, no emplea el uso de ácido acético, cítrico o tartárico para su disolución (Tømmeraas *et al.*, 2002), lo que lo vuelve un reactivo mucho más fácil para trabajar, además de conservar su biocompatibilidad total. Además de que se ha reportado que el ácido acético puede influir en la estabilidad y distribución de tamaño de las nanopartículas (Fan *et al.*, 2012).

El uso de quitosán como acarreador ha sido mejorado a través de la nanobiotecnología, mediante la elaboración de nanopartículas a partir de éste. Uno de los métodos más empleados para su elaboración es el de gelación iónica (empleado en este proyecto) y entre los principales aspectos a evaluar cuando se fabrican nanopartículas de quitosán acomplejadas a plásmidos, están el perfil de retención y liberación de pDNA de dichas nanopartículas. En éste trabajo se combinaron diferentes condiciones para la elaboración de las nanopartículas: Radio proporcional Q:pDNA, y pH del agente entrecruzante. Al analizar los resultados obtenidos para las nanopartículas elaboradas sin TPP y con TPP a pH 9.2 se observa que, si bien hay encapsulación de pDNA desde el radio 30, en la evaluación de tamaños se obtienen muestras muy heterogéneas de tamaño,

determinando que en ausencia de TPP o a un mayor pH de éste se obtienen muestras más heterogéneas y dispersas.

Se ha reportado que la interacción iónica durante la elaboración de las nanopartículas por el método de gelación iónica, es dependiente del pH (Ko *et al.*, 2002). En la solución original de TPP (pH 9.2), éste se disocia en  $\text{OH}^-$  y iones tripolifosfóricos ( $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$  y  $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ ), sin embargo, en un pH ácido, solo están presentes aniones  $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ .

En pH básico los iones  $\text{OH}^-$ , compiten con los iones tripolifosfóricos para reaccionar con los grupos aminos del quitosán, y debido a su pequeño tamaño tienen mayor movilidad y pueden penetrar más fácilmente la matriz de quitosán. Los grupos  $\text{OH}^-$  reaccionan con el quitosán a través de la desprotonación de los iones  $\text{NH}_3^+$ , lo cual no solo induce una flexión de las cadenas quitosán, sino que también disminuye el número de  $\text{NH}_3^+$  libres, dando como resultado la formación de menos enlaces intermoleculares quitosán-TPP (Mattu *et al.*, 2013).

En los estudios referenciados se ha determinado que cuando se emplea una solución de TPP ácida, las nanopartículas elaboradas presentan un menor tamaño y distribución de éste, y superficies más esféricas y lisas respecto a nanopartículas elaboradas con TPP a pH básico (Ko *et al.*, 2002). Con base en lo anterior, se explica el por qué se obtuvieron nanocomplejos más homogéneos cuando se emplean soluciones de TPP a pH ácidos.

Respecto al perfil de retención del DNA, se observó que, a mayor pH, mayor encapsulación del DNA. Esto puede ser interpretado si se considera la información anterior, empleando TPP a pH menor (3.0) se generan nanopartículas con cadenas de quitosán compactas y completamente entrecruzadas y de menor tamaño, por lo que el pDNA probablemente es unido solo en la superficie de las nanopartículas, por otro lado, cuando se emplea TPP a pH más alto (9.2 o 5.5) se generan nanopartículas menos compactas, por lo que el pDNA puede quedar atrapado dentro de éstas y no solo en la superficie, por lo tanto, el pDNA tendrá mayor encapsulación, y por ende un perfil de liberación más lento, como se observó en el ensayo de liberación.

Un aspecto más a considerar es que, el pDNA por ser una molécula polianiónica al igual que el TPP, compite por los enlaces intermoleculares del quitosán. Por lo que, en un pH más ácido, existe una mayor cantidad de iones  $P_3O_{10}^{5-}$  que compiten por dichos enlaces, presentándose una menor encapsulación de DNA en radios bajos de nanopartículas elaboradas con TPP a pH 3.0. Sin embargo, al aumentar el radio proporcional Q:pDNA, y por ende, aumentar la cantidad de quitosán disponible, el pDNA tiene mayor oportunidad de formar enlaces intermoleculares con éste, presentando así una mayor eficiencia de encapsulación. Además, que el uso de TPP a pH 3.0 presenta mayores ventajas en cuestión de homogeneidad, tamaño, superficie y forma de las nanopartículas.

Respecto al tamaño y homogeneidad en base al radio proporcional, el que se obtuvo como mejor fue el R60, ya reportado antes por nuestro grupo de trabajo (Alvizo *et al.*, 2014) así como un tamaño de 200-300 nm, similar también al obtenido por nuestro grupo de trabajo a pesar de utilizar nanopartículas magnéticas diferentes. Dicho tamaño se encuentra dentro del ideal para terapia tumoral, pues las nanopartículas pueden ingresar hasta el tejido tumoral ya que se han reportado fenestraciones (término empleado para referirse a una membrana o tejido que posee numerosos orificios u aberturas) en endotelio tumoral de 600-800nm (Angelova *et al.*, 2015), y fenestraciones vasculares en tumores que van de 400-600nm hasta micrones (Yuan *et al.*, 1995).

El potencial zeta ( $\xi$ ) es un parámetro importante que determina la carga superficial de nanopartículas en solución, los nanocomplejos elaborados presentaron un potencial zeta positivo de 14.7mV. Un potencial zeta positivo representa una ventaja en terapias de envío dirigido y términos de eficiencia de transfección, pues es ya conocido que la membrana celular está cargada negativamente, por lo que nanopartículas catiónicas pueden tener una fuerte interacción electrostática con la célula, lo cual resulta en una rápida endocitosis de las nanopartículas, permitiendo así una transfección eficiente (Kou *et al.*, 2013). Una carga ligeramente positiva es benéfica, pues cuando se tiene una carga excesivamente positiva, se presenta citotoxicidad, interacción no específica y agregación en sangre (Honary *et al.*, 2013).

Se ha reportado que nanopartículas con gran carga negativa exhiben una gran captación por el sistema reticuloendotelial, y nanopartículas positivas pueden inducir la

agregación de proteínas séricas. Nanopartículas neutrales ( $\xi \pm 10$  mV) podrían exhibir menor interacción con el sistema reticuloendotelial y mayores tiempos de circulación (Ernsting *et al.*, 2013). Sin embargo, tener valores absolutos bajos, trae consigo desventajas de estabilidad en términos de dispersión en la suspensión, como regla general, valores absolutos arriba de 30 mV proporcionan una buena estabilidad, y arriba de 60 mV una excelente estabilidad, alrededor de 20 mV proporcionan solo estabilidad a corto plazo, y valores en el rango de 5 mV muestran una rápida agregación. A pesar de todo, no se presentaron problemas de agregación con las nanopartículas, pues estas se preparaban e inoculaban hasta el momento en que se necesitaban.

Respecto a la  $CC_{50}$  obtenida tanto de los nanocomplejos como de los componentes por separado, los valores obtenidos fueron altos, lo que significa que se requeriría una gran concentración de nanocomplejos para que éstos pudieran ejercer un real efecto citotóxico. Los resultados obtenidos son confirmados por estudios previos, en los que se reporta que nanopartículas de quitosán/TPP/pDNA no interfieren con la viabilidad celular en el rango de concentración necesario para transfección (Karimi *et al.*, 2013).

En cuanto a la determinación de forma y tamaño por microscopia de fuerza atómica, los resultados nos permitieron validar y corroborar los tamaños ya obtenidos por dispersión de luz dinámica, así como observar la forma de los nanocomplejos. La forma de la nanopartícula influye en la captación celular, las nanopartículas en forma de varillas exhiben una mayor captación, seguidas por formas en nanoesferas, cilindros y cubos (Oh, *et al.*, 2014; Ernsting *et al.*, 2013). Lo que nos permite inferir que los nanocomplejos elaborados presentan una internalización celular eficiente.

Para poder realizar las evaluaciones y caracterización *in vitro* de los microbots se buscó adicionar un fluoróforo común, debido a que al cubrir las NPMF con quitosán, la intensidad del fluoróforo disminuye considerablemente (10 veces menor), al comparar la fluorescencia de las NPMF con la de los nanocomplejos. Debido a lo anterior se marcó el quitosán con un fluoróforo más común y de mayor intensidad: FICT, se evaluó tanto tamaño como potencial zeta para asegurar que dichos parámetros no variaran en gran manera al realizar el marcaje del quitosán, observando que al utilizar una menor cantidad de FITC, se obtenían nanocomplejos de menor tamaño y más homogéneos. Esto puede ser

debido a que, a mayor concentración de FITC, se tiene una mayor cantidad de grupos isotiocianato, los cuales interaccionan con los grupos amino primarios del quitosán, dejando menor oportunidad de tener enlaces quitosán-TPP, generando nanocomplejos heterogéneos y de mayor tamaño (Huang *et al.*, 2002; Mattu *et al.*, 2013).

En las imágenes de fuerza atómica es donde puede observarse mejor la unión de los nanocomplejos a la superficie de los eritrocitos, al comparar éstas con las obtenidas de eritrocitos sin nanocomplejos. Al saturar de nanocomplejos la muestra, se observan los nanocomplejos sobre la célula e incluso en el soporte, y para corroborar que realmente los nanocomplejos estuvieran unidos a la superficie, y no solo estuvieran como una capa sobre éstos, se utilizó una menor concentración de nanocomplejos. En las imágenes con menor concentración de nanocomplejos se puede apreciar de una mejor manera los nanocomplejos unidos a la célula, como pequeñas protuberancias con diferente intensidad de color en las imágenes de altura y 3D, y como relieves o picos que sobresalen en las gráficas de altura. Esto a diferencia de las imágenes de eritrocitos control, en donde se observa una superficie homogénea sin cambios de intensidad en las imágenes de altura y 3D, y una superficie lisa sin relieves en las gráficas de altura.

Respecto a las imágenes de microscopia de fluorescencia, en los eritrocitos control se observa una muy leve señal, sin embargo, ésta es resultado de la auto fluorescencia que presenta la célula por sí misma. Cuando se observan las imágenes de los microbots se observa una mayor intensidad de señal, lo que, aunado a las imágenes de microscopía de fuerza atómica, corrobora que los nanocomplejos se encuentran unidos a la superficie de la célula.

La cantidad de plásmido empleada es un aspecto importante a considerar durante la elaboración de los microbots. En modelos murinos *in vivo*, múltiples estudios emplean una concentración de 50µg, como ideal para poder obtener una expresión significativa (Saravolac *et al.*, 2000; Horton *et al.*, 1999; Paster *et al.*, 2003). Por lo que en base a ese valor se realizaron las evaluaciones de la capacidad de carga de los microbots, manteniendo constante la concentración de nanocomplejos y variando la cantidad de eritrocitos.

La carga superficial del eritrocito, y cómo ésta se ve afectada al unir los nanocomplejos a su membrana, es un aspecto importante a evaluar en la elaboración de los microbots. Se ha demostrado que alteraciones en el potencial zeta de los eritrocitos están relacionadas con ciertas condiciones clínicas como infección por *Plasmodium falciparum* y el síndrome Tn (en el que ocurre una anemia hemolítica debido a aglutinación de eritrocitos). De manera adicional, se ha reportado que una disminución en el potencial zeta provoca una gran agregación de eritrocitos (Sloop *et al.*, 2016).

El potencial zeta de eritrocitos humanos se ha reportado en diferentes valores: -13.07 mV (Omi *et al.*, 1994), -14.82 mV (Harisa *et al.*, 2016), -15.7 mV (Tokumasu *et al.*, 2012) y -18 mV (Van *et al.*, 1983). El valor obtenido en este proyecto (-16.3 mV) se encuentra dentro del rango reportado.

Observamos que en el caso en donde se tiene una menor cantidad de células, el potencial zeta se modifica y disminuye a valores por debajo del rango reportado, conforme la cantidad de células aumenta, el potencial zeta se estabiliza y mantiene en valores dentro del rango reportado. Debido a que, como ya se mencionó, modificaciones en el potencial zeta influyen en condiciones clínicas, la combinación de células en la que dicho valor es modificado drásticamente y se mantiene dentro del rango reportado es microbots 4.

El perfil de sedimentación es un parámetro más a evaluar, determina de manera visual lisis y aglutinación de eritrocitos. Se observó que los nanocomplejos modifican el perfil de sedimentación, pues los eritrocitos con nanocomplejos sedimentan en un menor tiempo, pero quedan unidos a la pared del tubo. Fan y colaboradores, en un estudio similar empleando nanopartículas de quitosán unidas a la superficie de eritrocitos, reportaron que este perfil de eritrocitos unidos a las paredes del tubo, era debido a la aglutinación de los mismos (determinación realizada al observar las células en microscopio óptico). Lo anterior puede dar una explicación del fenómeno observado, sin embargo, evaluaciones posteriores deberán ser realizadas para confirmar agregación de los eritrocitos. Se observó también que, en el caso de nanocomplejos en mayor concentración (menor cantidad de células con nanocomplejos) no solo se altera la carga superficial de la célula, sino que se provoca lisis celular, pues al centrifugar las muestras se observó una coloración roja en el sobrenadante de las células, perfil característico resultante de la hemoglobina liberada al

ser lisada la célula. Dichos resultados validan que la mejor opción a utilizar es la de una mayor cantidad de células para la concentración de nanocomplejos empleada.

Para realizar las evaluaciones *in vivo* se tomaron en cuenta dos parámetros: intensidad de fluorescencia de las nanopartículas y la expresión génica mediante detección de luminiscencia.

La intensidad de fluorescencia se analizó para determinar la eficiencia de transporte específico. Los órganos que presentaron una mayor intensidad fueron tumor e hígado, pero solo en tumor se presentaron diferencias altamente significativas. El grupo con microbots presentó una intensidad mayor y altamente significativa respecto a los grupos con nanocomplejos y control, lo cual nos permite inferir que los microbots se pudieron dirigir de manera sitio específica al sitio tumoral.

Por su parte, la intensidad de luminiscencia permitió determinar el segundo parámetro *in vivo* a analizar: la eficiencia de expresión génica. Al igual que en el caso del análisis de fluorescencia, los órganos que presentaron una mayor intensidad de luminiscencia fueron tumor e hígado. Y de la misma forma, solamente en tumor fue donde se presentaron diferencias significativas, con una intensidad de señal mayor y altamente significativa, del grupo con microbots respecto a los grupos con nanocomplejos y control. Dicho resultado nos permite suponer que los microbots no solo se sitio dirigieron a la región tumoral, sino que también presentaron eficiencia en la entrega y expresión del gen a transportar.

Un punto a resaltar es la falta de detección de señal significativamente mayor en el grupo con nanocomplejos respecto al grupo control. Lo que se hubiera esperado en este grupo sería una intensidad de señal en tumor significativamente mayor respecto al control, o en órganos como hígado, riñón y bazo que son los principales órganos de depuración del cuerpo y que es en donde se podrían acumular los nanocomplejos después de ser inoculados. Los resultados obtenidos quizá se deban a la gran variación de datos que presenta este grupo, pues en tumor se observan barras desviación muy grandes, también, a que la *n* de los grupos es muy pequeña. Por lo que un análisis con una *n* mayor en los tres grupos podría mejorar los resultados obtenidos.



Muchas de las terapias que se desarrollan y prometen ser exitosas en etapas *in vitro*, presentan múltiples desventajas cuando se escalan a nivel *in vivo*, pues resultan tóxicas o invasivas cuando son administradas. Por lo tanto, en el sistema aquí desarrollado se tomaron en cuenta dichos aspectos desde el inicio del desarrollo del sistema.

Para poder dirigir y focalizar el sistema se utilizó un magneto externo de neodimio, con intensidad de 3 T. Leves efectos secundarios (vértigo y náuseas) a causa de exposición a campos magnéticos, se reportan en intensidades por encima de 2 T, sin embargo, tales efectos son observados cuando existe una exposición prolongada (un ambiente laboral) y son temporales. Efectos agudos solo son probables dentro de campos de más de 8 T, por lo que el uso del magneto aquí empleado, no resultaría invasivo ni conllevaría a efectos secundarios adversos según los reportes de la ICNIRP (ICNIRP 2009).

La cantidad de nanopartículas empleadas es otro punto a considerar, pues si bien el material del que están compuestas se emplea ya en estudios de resonancia magnética, su uso en exceso puede llegar a generar toxicidad. En este experimento se inocularon 5  $\mu\text{g}$  totales de nanopartículas por ratón, si este valor es convertido a unidades por kg, tomando en cuenta un peso promedio de ratón de 25 gr, sería 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . A la fecha se han realizado múltiples estudios a nivel *in vitro* e *in vivo*, y se han observado distintos resultados dependiendo del tamaño, cubierta y forma de nanopartícula. Por citar un ejemplo en el que se emplearon altas dosis, en 2008 Chertok y cols observaron que la administración de SPIO a una concentración de 12 mg Fe/kg en ratas Fischer con inducción de gliosarcoma, no presentó toxicidad en los animales.

Estudios *in vivo* realizados en humanos se han sido enfocados a evaluar el agente de contraste Ferumoxtran-10, que consiste en SPIO cubiertas de dextran, el cual se emplea para resonancia magnética, y se ha observado que su uso solo induce efectos secundarios leves como urticaria, diarrea y náuseas, que son leves y de corta duración.

Se han evaluado distintas dosis para detecciones por resonancia magnética de diversas patologías, empleando dosis de hasta and 3.4 mg Fe/kg, sin que se haya presentado toxicidad o efectos secundarios graves (Tetsumura *et al.*, 2012). Con base a lo anterior, se puede inferir que la dosis aquí empleada, no representa valores significativos altos que pudieran causar efectos secundarios.

## IX. CONCLUSIONES

1. Se elaboraron nanocomplejos formados por NPMF, quitosán y pDNA, y se caracterizó su tamaño, carga y forma para su aplicación en el envío dirigido de genes.
2. Se utilizó un método de marcaje del quitosán con FITC para generar una señal fluorescente en los nanocomplejos, que no altere su tamaño y su carga, y tiene utilidad para el análisis *in vitro*.
3. La microscopía de fuerza atómica demostró ser una técnica adecuada para caracterizar los microbots.
4. Se estableció una combinación adecuada de eritrocitos y nanocomplejos para elaborar microbots sin afectar la célula ni modificar su carga superficial.
5. El microbot construido demostró que es capaz de dirigirse y localizarse significativamente en un tumor sólido.
6. El microbot construido fue capaz de dirigir selectivamente la expresión de un gen exógeno en un tumor sólido.
7. El microbot está diseñado con componentes biocompatibles y no tóxicos que le confieren un potencial para su aplicación en humanos.
8. El microbot prototipo diseñado en el presente estudio puede representar una nueva alternativa para el envío dirigido de genes a tumores.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Abraham DJ, Bathula S, Huang L. 2010. Gene Therapy with Plasmid DNA. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. 457–499.

Ahmed TA., Aljaeid BM. 2016. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, 10:483–507.

Akin D, Sturgis J, Ragheb K, Sherman D, Burkholder K, Robinson JP, Bhunia AK., Mohammed S, Bashir R. 2007. Bacteria-mediated delivery of nanoparticles and cargo into cells. *Nat. Nanotechnol.* 2:441–449.

Alvizo CA, Luna IE, Rodríguez MC, Alcocer JM. 2014. Magnetic Nanoparticles of Chitosan for Targeted Delivery System of Plasmids to the Lungs. *Journal of Nanotechnology*. 313415.

Alvizo CA., Luna IE, Vilches N, Rodríguez C, Alcocer JM. 2016. Systemic delivery and activation of the TRAIL gene in lungs, with magnetic nanoparticles of chitosan controlled by an external magnetic field. *International Journal of Nanomedicine*. 11:6449–6458.

Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. 2008. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5:505–515.

American Cancer Society, 2017. Side Effects of Targeted Cancer Therapy Drugs [En línea] Disponible en: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/targeted-therapy/side-effects.html>.

Anderson WF, Blaese RM, Culver K. 1990. The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol. *Hum. Gene Ther.* 3:331–62.

Angelova N, Yordanov G. 2015. Albumin-stabilized epirubicin nanocarriers of core-shell type based on poly(butyl cyanoacrylate) and poly(styrene-co-maleic acid). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 487:232–239.

- Arruebo M, Fernández R, Ibarra MR, Santamaría J. 2007. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nanotoday* 2(3):22–32.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 270:475–480.
- Bodmeier R, Oh KH, Pramar Y. 1989. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15, 1475-1494.
- Brown JM. 1999. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy – eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res*, 59:5863–70.
- Calvo P, Remunan C. 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied*. 125–132.
- Chambers E, Mitragotri S. 2007. Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells: mechanism and extended circulation. *Experimental Biology and Medicine*. 232(7): 958–966.
- Cherukuri P, Bachilo SM, Litovsky SH, Weisman RB. 2004 Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 15638.
- Chen AA, Derfus AM, Khetani SR et al. 2005. Quantum dots to monitor RNAi delivery and improve gene silencing. *Nucleic Acids Res* 33(22):e190.
- Cheng K, Malliaras K, Li TS et al. 2012. Magnetic enhancement of cell retention, engraftment, and functional benefit after intracoronary delivery of cardiac-derived stem cells in a rat model of ischemia/reperfusion. *Cell Transplant*. 21(6): 1121–1135.
- Chertok B, Moffat BA, David AE, Yu F, Bergemann C, Ross BD, Yang VC. 2008. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*, 29: 487–496.
- Chomoucka J, Drbohlavova J, Huska D, Adam V, Kizek R, Hubalek J. 2010. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*. 62(2): 144–149.

- Corchero J, Villaverde A. 2009. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 27:468–76.
- Cronin M, Morrissey D, Rajendran S, et al. 2010. Orally administered Bifidobacteria as vehicles for delivery of agents to systemic tumors. *Molecular Therapy.* 18:1397-1407.
- Cuéllar A, Cifuentes C, González JM. 2004. Generación in vitro de células dendríticas humanas de origen mieloide. *Universitas Scientiarum.* 9:57-67.
- Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. 2011. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 36:981–1014.
- Dastan T, Turan K. 2004. In vitro characterization and delivery of chitosan- DNA microparticles into mammalian cells. *J Pharm Pharm Sci.* 7(2):205–214.
- De Palma M, Mazzieri R, Politi LS, Pucci F, Zonari E, Sitia G, Mazzoleni S, Moi D, Venneri MA, Indraccolo S, Falini A, Guidotti LG, Galli R, Naldini L. 2008. Tumor-targeted interferon-alpha delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Cell.* 14:299–311.
- De Vocht F, van Drooge H, Engels H, Kromhout H. 2006b. Exposure, health complaints and cognitive performance among employees of an MRI scanners manufacturing department. *J Magn Reson Imaging* 23:197–204.
- Duttagupta DS, Jadhav VM, Kadam VJ. 2015. Chitosan: a propitious biopolymer for drug delivery. *Curr. DrugDeliv.* 12:369-381.
- Emerich DF, Thanos CG. 2007. Targeted nanoparticle-based drug delivery and diagnosis. *J Drug Target.* (3):163-83.
- Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li SD. 2013. Factors Controlling the Pharmacokinetics. Biodistribution and Intratumoral Penetration of Nanoparticles. *J Control Release.* 172(3): 782–794.
- Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. 2012. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 90:21–27.

- Faraji AH, Wipf P. 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17(8):2950–2962.
- Fu A, Wilson RJ, Smith BR, Mullenix J, Earhart C, Akin D, Gambhir SS. 2012. Fluorescent magnetic nanoparticles for magnetically enhanced cancer imaging and targeting in living subjects. *ACS Nano*. 6(8):6862–6869.
- Ginn, SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J. Gene Med*. 15(2): 65–77.
- Goodman R, Blank M. 2002. Insights into electromagnetic interaction mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*. 192(1):16–22.
- Gopi S, Amalraj A, Thomas S. 2016. Effective Drug Delivery System of Biopolymers Based On Nanomaterials and Hydrogels - A Review. *Drug Designing*. 5(1);1–7.
- Gowland PA. 2005. Present and future magnetic resonance sources of exposure to static fields. *Prog Biophys Mol Biol*. 87:175– 183.
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. 2003. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immuno- deficiency. *N Engl J Med*. 348: 255–256.
- Harisa GI, Badran MM, AlQahtani SA, Alanazi FK, Attia SM. 2016. Pravastatin chitosan nanogels-loaded erythrocytes as a new delivery strategy for targeting liver cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 24(1):74–81.
- Heredia J., De La Fuente AOR, Alcocer JM, Rodríguez LE, Rodríguez C, Santoyo MA, Tamez RS. 2010. Effect of 60 Hz magnetic fields on the activation of hsp70 promoter in cultured INER-37 and RMA E7 cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*. 46(9):758–763.
- Herzog RW. 2010. Gene therapy for SCID-X1: round 2. *Mol Ther*. 18:1891.
- Hilger I, Hiergeist R, Hergt R, Winnefeld K, Schubert H, Kaiser WA. 2002. Thermal ablation of tumors using magnetic nanoparticles: an in vivo feasibility study *Invest. Radiol*. 37:580–6.

- Hofmann A, Wenzel D, Becher UM et al. 2009. Combined targeting of lentiviral vectors and positioning of transduced cells by magnetic nanoparticles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106(1):44–49.
- Honary S, Zahir F. 2013. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutic AI Research*, 12(2):265–273.
- Hoppe-Seiler F. 1994. Chitin and chitosan. *BerDtschChem Ges.* 27:3329–31.
- Horton HM, Anderson D, Hernandez P, Barnhart KM, Norman JA, Parker SE. 1999. A gene therapy for cancer using intramuscular injection of plasmid DNA encoding interferon  $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:1553–1558.
- Hoye AT, Davoren JE, Wipf P, Fink MP, Kagan VE. 2008. Targeting mitochondria. *Acc. Chem. Res.* 41:87-97.
- Hu B, Kou L, Li C, Zhu L, Fan Y, Wu Z, Xu G. 2009. Bifidobacterium longum as a delivery system of TRAIL and endostatin cooperates with chemotherapeutic drugs to inhibit hypoxic tumor growth. 655–663.
- Huang M, Ma Z, Khor E, Lim LY. 2002. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Pharmaceutical Research.* 19(10):1488–1494.
- Houston P, White BP, Campbell CJ, Braddock M. 1999. Delivery and expression of fluid shear stress-inducible promoters to the vessel wall: Applications for cardiovascular gene therapy. *Hum Gene Ther.* 10;10(18):3031-44.
- International Commission on Non-Ionizing. 2009. Guidelines on Limits of Exposure To Static Magnetic Fields. *Health Physics.* 96(4):504–514.
- International Commission on Non-Ionizing. 2010. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric and magnetic fields (1Hz to 100 kHz). *Health Physics Society.* 26(1):104–112.
- Iga AM, Robertson JHP, Winslet MC, Seifalian AM. 2007. Clinical potential of quantum dots. *J Biomed Biotechnol.* 10:76087.

Indira TK, Lakshmi PK. 2010. Magnetic Nanoparticles – A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 3(3).

Jabbarzadeh E, Starnes T, Khan YM, Jiang T, Wirtel AJ, Deng M, Lv Q, Nair LS, Doty SB, Laurencin CT. 2008. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy–cell transplantation approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:11099–11104.

Kang H, Mintri S, Menon AV, Lee HY, Choi HS, Kim J. 2015. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Toxicology of Theranostic Nanoparticles. *Nanoscale*. 7(45):18848–18862.

Karakoti AS, Shukla R, Shanker R, Singh S. 2015. Surface functionalization of quantum dots for biological applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 215:28.

Karimi M, Avci P, Ahi M, Gazori T, Hamblin MR, Hossein NM. 2013. Evaluation of Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles as a p-shRNA Delivery Vector: Formulation, Optimization and Cellular Uptake Study. *J Nanopharm Drug Deliv*. 1(3):266–278.

Katabi MM, Chan HL, Karp SE, Batist G. 1999. Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells. *HumGeneTher*. 10(2):155–164.

Kean T, Thanou M. 2009. Chitin and chitosan—sources, production and medical applications. Williams PA, Arshady R, editors. *Deskreference of natural polymers, their sources, chemistry and applications*. London: KentusBooks: 327–61.

Kheifets LI. 2001. The Precautionary Principle and EMF. Meeting on EMF Biological Effects+ Standards Harmonization in Asia & Oceania. Seoul, South Korea, October 22-24.

Ko J, Park H, Hwang S, Park J, Lee J. 2002. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 249(1–2):165–174.



- Kou L, Sun J, Zhai Y, He Z. 2013. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 8(1):1–10.
- Kubo T, Sugita T, Shimose S, Nitta Y, Ikuta Y, Murakami T. 2000 Targeted delivery of anticancer drugs with intravenously administered magnetic liposomes in osteosarcoma-bearing hamsters. *Int. J. Oncol.* 17:309–15.
- Kurita K, Kaji Y, Mori T, Nishiyama Y. 2000. Enzymatic degradation of [beta]-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *CarbohydrPolym.* 42:19–21.
- Li LL, Guan YQ, Liu HY, Hao NJ, Liu TL, Meng XW, Fu CH, Li YZ, Qu QL, Zhang YG, Ji SY, Chen L, Chen D, Tang FQ. 2011. Silica nanorattle-doxorubicin-anchored mesenchymal stem cells for tumor-tropic therapy. *ACS Nano* 5:7462–7470.
- Lee KY, Ha SW, Park WH. 1995. Blood biocompatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. *Biomaterials* 16:1211–1216.
- Lee YJ, Galoforo SS, Battle P, Lee H, Corry PM, Jessup JM. 2001. Replicating adenoviral vector-mediated transfer of a heat- inducible double suicide gene for gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 8:397-404
- Li X, Udagawa N, Takami M, Sato N, Kobayashi Y, Takahashi N. 2003. p38 Mitogen activated protein kinase is crucially involved in osteoclast differentiation but not in cytokine production, phagocytosis, or dendritic cell differentiation of bone marrow macrophages. *Endocrinology.* 144:4999–5005.
- Lin, H., Blank, M., & Goodman, R. (1999). Magnetic field-responsive domain in the human HSP70 promoter. *J CellBiochem* 75:170-176.
- Lin H, Blank M, Rossol-Haseroth K, Goodman R. 2001. Regulating genes with electromagnetic response elements. *JCellBiochem.*81(1):143–148.
- Lindquist S, Craig EA. 1988. The heat-shock proteins. 1988. *Annu. Rev. Genet.* 22:631-677.

Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS. 1994. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *CritRevEukaryot Gene Expr.* 4(1):1–18.

Liu Y, Shaw SK, Ma S, Yang L, Luscinskas FW, Parkos CA. 2004. Regulation of leukocyte transmigration: Cell surface interactions and signaling events. *J Immunol* 172:7–13.

Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. 2008. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60:1650–1662.

Loisel S, Le Gall C, Doucet L, Ferec C, Floch V. 2001. Contribution of plasmid DNA to hepatotoxicity after systemic administration. *Hum Gene Ther.* 12(6):685-96.

Marples B, Scott SD, Hendry JH, Embleton MJ, Lashford LS, Margison GP. 2000. Development of synthetic promoters for radiation-mediated gene therapy. *Gene Ther.* 7:511-517.

Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr.* 73:430S–6S.

Mattu C, Li R, Ciardelli G. 2013. Chitosan Nanoparticles as Therapeutic Protein Nanocarriers: the Effect of pH on Particle Formation and Encapsulation Efficiency. *Polymers and Polymer Composites.* 16(2):1538–1545.

Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. 2005. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science* 307:538–544.

Mima S, Miya M, Iwamoto R, Yoshikawa S. 1983. Highly deacetylated chitosan and its properties. *J ApplPolymSci.* 28:1909–17.

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 2003. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 53:283-318.

Nature, 2014. Promoter Learn Science at Scitable [En línea] Disponible en: <https://www.nature.com/scitable/definition/promoter-259>.

Nature, 2017. Biopolymers – Latest Research and news [En línea] Disponible en: <https://www.nature.com/subjects/biopolymers>.

Nature, 2017. Molecularly targeted therapy [En línea] Disponible en: <http://www.nature.com/subjects/molecular-targeted-therapy>.

Navarro G, Pan J, Torchilin VP. 2015. Micelle-like Nanoparticles as Carriers for DNA and siRNA. *Mol Pharm*. 12(2):301-13x.

Nawroth I, Alsner J, Deleuran BW. et al. 2013. Peritoneal macrophages mediated delivery of chitosan/siRNA nanoparticle to the lesion site in a murine radiation-induced fibrosis model. *Acta Oncol*. 52:1730–1738.

Neffe AT, Wischke C, Racheva M, Lendlein A. 2013. Progress in biopolymer-based biomaterials and their application in controlled drug delivery. *ExpertReview of Medical Devices*. 10(6):813–833.

Niidome T, Huang L. 2002. Gene therapy progress and prospects: non viral vectors. *Gene Therapy*. 9(24):1647–1652.

Nishimura K., Ishihara C, Ukei S, Tokura S, Azuma I. 1986. Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. *Vaccine* 4:151–156.

Nguyen KC, Rippstein P, Tayabali AF, Willmore WG. 2015. Mitochondrial Toxicity of Cadmium Telluride Quantum Dot Nanoparticles in Mammalian Hepatocytes. *Toxicol Sci*. 146(1):31-42.

Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol*. 16:437-45.

Oh N, Park JH. 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*. 9(1):51–63.

Omi T, Kaji E, Ikemoto S. 1994. The electrokinetic behavior of red blood cells from a patient with Tn syndrome by Doppler electrophoretic light scattering analysis. *Tohoku J Exp Med*. 74:369–377.

Paglia P, Medina E, Arioli I, Guzman CA, Colombo MP. 1998. Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood*. 92:3172–3176.

Papadakis ED, Nicklin SA, Baker AH, White SJ. 2004. Promoters and control elements: designing expression cassettes for gene therapy. *Current Gene Therapy*. 4(1):89–113.

Park SJ, Lee Y, Choi YJ, Cho S, Jung HE, Zheng S, Park BJ, Ko SY, Park JO, Park S. 2014. Monocyte-based microrobot with chemotactic motility for tumor theragnosis. *Biotechnol Bioeng*. 111(10):2132–2138.

Paster W, Zehetner M, Kalat M., Schu S. 2003. In vivo plasmid DNA electroporation generates exceptionally high levels of epitope-specific CD8 + T-cell responses. *Gene Therapy*. 10:717–724.

Rachakatla R, Pyle M, Edwards S, Marini F, Weiss ML, Tamura M, Troyer D. 2008. Combination treatment of human umbilical cord matrix stem cell-based interferon-beta gene therapy and 5-fluorouracil significantly reduces growth of metastatic human breast cancer in SCID mouse lungs. *Cancer Invest* 26:662–670.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. 2009. siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61:746–759.

Rao L, Meng QF, Bu LL, Cai B, Huang Q, Sun ZJ, Zhao XZ. 2017. Erythrocyte Membrane-Coated Upconversion Nanoparticles with Minimal Protein Adsorption for Enhanced Tumor Imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 9:2159–2168.

Ribeiro SC, Monteiro GA, Prazeres DMF. 2004. The role of polyadenylation signal secondary structures on the resistance of plasmid vectors to nucleases. *J Gene Med*. 6:565–573.

Robson T, Hirst DG. 2003. Transcriptional Targeting in Cancer Gene Therapy. *Journal of Biomedicine&Biotechnology*. 2:110–137.

Rodríguez AO, Alcocer JM, Heredia JA, Balderas I, Rodríguez LE, Rodríguez C, Taméz RS. 2009. Effect of 60 Hz electromagnetic fields on the activity of hsp70 promoter: An in vitro study. *Cell Biology International*. 33(3):419–423.

Saravolac EG, Ludkovski O, Skirrow R, Ossanlou M, Zhang YP, Giesbrecht C, Scherrer P. 2000. Encapsulation of Plasmid DNA in Stabilized Plasmid- Lipid Particles Composed of Different Cationic Lipid Concentration for Optimal Transfection Activity. *Journal of Drug Targeting*. 7(6):423–437.

Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. 2000. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy. *Gene Ther*.7(6):493–498.

Sloop GD, Bialczak JK, Weidman JJ, St Cyr JA. 2016. Uric acid increases erythrocyte aggregation: Implications for cardiovascular disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 63(4):349–359.

Souders NC, Verch T, Paterson Y. 2006. In vivo bactofection: *Listeria* can function as a DNA-cancer vaccine. *DNA & Cell Biol*. 25:142–151.

Steinwaerder DS, Lieber A. 2000. Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther*. 7:556-567.

Strik HM, Hülper P, Erdlenbruch B, Meier J, Kowalewski A, Hemmerlein B, Gold R, Bähr M. 2006. Models of monocytic invasion into glioma cell aggregates. *Anticancer Res* 26:865–871.

Su J, Sun H, Meng Q, Zhang P, Yin Q, Li Y. 2017. Enhanced Blood Suspensibility and Laser-Activated Tumor-specific Drug Release of Theranostic Mesoporous Silica Nanoparticles by Functionalizing with Erythrocyte Membranes. *Theranostics*. 7(3):523–537.

Tan S, Wu T, Zhang D, Zhang Z. 2015. Cell or cell membrane-based drug delivery systems. *Theranostics*. 5(8):863–881.

Tanaka Y, Sato K, Shimizu T, Yamato M, Okano T, Kitamori T. 2007. Biological cells on microchips: New technologies and applications. *Biosens Bioelectron*. 23:449–458.

Taniguchi S, Fujimori M, Sasaki T, Tsutsui H, Shimatani Y, Seki K. 2010. Targeting solid tumors with non-pathogenic obligate anaerobic bacteria. *Cancer Science*. 101(9):1925–1932.

- Tetsumura A, Nakamura S, Yoshino N, Watanabe H, Kuribayashi A, Nagumo K, Kurabayashi T. 2012. USPIO-enhanced MRI of highly invasive and highly metastasizing transplanted human squamous cell carcinoma: An experimental study. *Dentomaxillofacial Radiology*. 41:55–63.
- Tokumasu F, Ostera GR, Amaratunga C, Fairhurst RM. 2012. Modifications in erythrocyte membrane zeta potential by *Plasmodium falciparum* infection. *Experimental Parasitology*. 131:245–251.
- Tømmeraas K, Köping-Höggård M, Vårum KM, Christensen BE, Artursson P, Smidsrød O. 2002. Preparation and characterization of chitosans with oligosaccharide branches. *Carbohydr. Res*. 337:2455–2462.
- Van Oss CJ, Absolom DR. 1983. Zeta Potentials, van der Waals Forces and Hemagglutination. *Vox Sanguinis*. 44:183–190.
- Vilaboa N, Boellmann F, Voellmy R. 2011. Gene Switches for Deliberate Regulation of Transgene Expression: Recent Advances in System Development and Uses. *J Genet Syndr Gene Ther* 2:107.
- Vilela C, Figueiredo ARP, Silvestre AJD, Freire CSR. 2016. Multilayered materials based on biopolymers as drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 5247:1–12.
- Wang Q, Cheng H, Peng H, Zhou H, Li PY, Lange R. 2014. Non-genetic engineering of cells for drug delivery and cell-based therapy. *Adv. Drug Deliv Rev*. 91:125-140.
- Winter PM, Caruthers SD, Kassner A, Harris TD, Chinen LK, Allen JS, Lacy EK, Zhang HY, Robertson JD, Wickline SA. 2003. Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(nu)beta3-targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. *Cancer Res*. 63(18):5838-43.
- Wu YZ, Eisele K, Doroshenko M, Algara-Siller G, Kaiser U, Koynov K. 2012. A Quantum Dot Photoswitch for DNA Detection Gene Transfection, and Live-Cell Imaging. *Small* 8(22):3465-3475.

- Wu Z, Ávila BE, De Martín A, Christianson C, Gao W, Thamphiwatana SK, Wang J. 2015. RBC micromotors carrying multiple cargos towards potential theranostic applications. *Nanoscale*. 7:13680–13686.
- Wurm FM. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 22:1393–1398.
- Yang YM, Hu W, Wang XD, Gu XS. 2007. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med*. 18:2117–21.
- Yasui H, Ohwaki M. 1991. Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *J Dairy Sci* 1991; 74: 1187–1195.
- Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. 2000. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective location and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther*. 7:269–274.
- Yoshimura K, Rosenfeld MA, Nakamura H, Scherer EM, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. 1992. Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res*. 20(12):3233–3240.
- Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, Jain RK. 1995. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res*. 55:3752–3756.