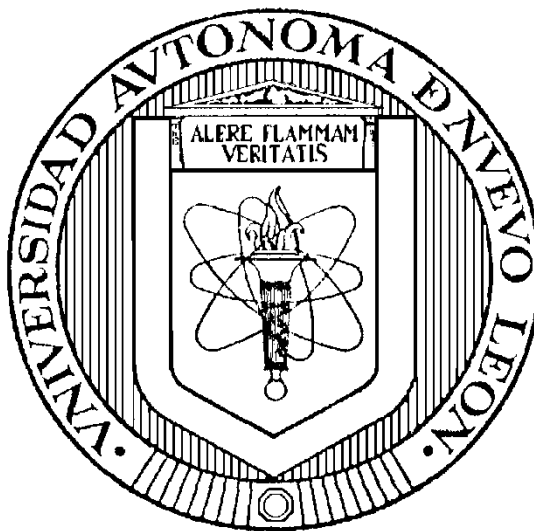


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



ANÁLISIS DE LA BIODISTRUBUCIÓN Y TIEMPO DE EXPRESIÓN GÉNICA DE
LAS MICROPARTÍCULAS ACOMPLEJADAS CON ADN/QUITOSÁN DIRIGDAS
POR UN CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO *IN VIVO*.

Por

JORGE LEONARDO GUZMÁN HERNÁNDEZ

Como requisito parcial para optar al título de:
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

Cd. Universitaria, Mayo 2017

ANÁLISIS DE LA BIODISTRIBUCIÓN Y TIEMPO DE EXPRESIÓN GÉNICA DE
LAS MICROPARTÍCULAS ACOMPLEJADAS CON ADN/QUITOSÁN DIRIGIDAS
POR UN CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO *IN VIVO*

Comité de Tesis

Dra. Itza Eloisa Luna Cruz
Director

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Secretario

Dra. María Cristina Rodríguez Padilla
Vocal

Dr. José Alberto Valadez Lira
Vocal

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides
Suplente

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en la unidad de Biología Molecular bajo la dirección de la Dra. Itza E. Luna Cruz

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado durante mis estudios con el registro 631658 para la maestría en ciencias con acentuación en Inmunobiología, ya que sin el apoyo que nos brinda día a día a cada uno de los estudiantes estos de proyectos no serían posibles.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, jefe del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por permitirme sus instalaciones para la realización de este trabajo

Quiero dar mi más grande agradecimiento a la Dra. Itza E. Luna, por su confianza al realizar este trabajo, especialmente por toda la paciencia que tuvo en esta etapa de mi vida y mi carrera, por la oportunidad de ser parte de su equipo, por sus enseñanzas, su consejo, su apoyo, y por ser no solo mi asesora sino también por brindarme su amistad.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González por permitirme el uso de materiales y equipo para la realización de este trabajo. También a la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales y al Dr. José Alberto Valadez Lira por ser parte del comité de Tesis.

A las personas que conocí y con las que conviví en el Laboratorio de Inmunología y Virología: a la LBG. Carolina Bonilla, al QBP. Luis Daniel Terrazas y al resto del equipo de laboratorio, quienes me brindaron su apoyo, cariño y amistad. De ellos obtuve buenas, oportunas enseñanzas y sobre todo un ambiente agradable para todos en nuestro lugar de trabajo, y finalmente convirtiéndose en una gran familia para mí durante mi estancia en este laboratorio.

También quiero agradecer a todos mis compañeros y compañeras de generación de Maestría los cuales demostraron ser personas valiosas, que aportaban en todo momento su apoyo y comprensión y que agradezco haber conocido durante este proceso académico.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi familia a mi padre Jorge Guzmán, por dedicarme siempre su esfuerzo, su trabajo y su sacrificio, a mi madre Gabriela Hernández por siempre escucharme en todo momento, escucharme y procurar entenderme, a mi hermano Eduardo Guzmán mi más grande y mejor amigo, que siempre me ha acompañado y aconsejado. Los 3 siempre han sido mi apoyo, y se encuentran conmigo en las buenas y en las malas y me han ayudado a salir adelante a pesar de todo, para mí el dedicarles este trabajo con mucho amor, es una pequeña forma de darles las gracias por todo lo que han hecho y dado por mí.

El más grande y profundo agradecimiento a Marilyn Castillo que sin ella nada de lo que hemos logrado durante este proceso sería posible y que ha estado junto conmigo en todo momento por todo ese cariño, amor, tolerancia, compañía, alegría y que enriquece mi vida cada uno de mis días. Se ha convertido en mi mejor amiga, mi consejera, mi maestra, mi cómplice y que me alienta siempre a cumplir todos mis deseos, a superarme y a lograr cosas que antes no creía que podía lograr.

También agradezco a su madre Irene Muñoz y su padre Benjamín Castillo y al resto de su familia. Quienes me han permitido ser de sus vidas, de su familia, me han brindado toda su confianza, paciencia, cariño y apoyo.

A mis más grandes amigos David Daniel Fernández, Carlos Aréchiga y Roger Maldonado que han aportado a mi vida grandes experiencias, que me escucharon siempre, me aconsejaron, me ofrecieron grandiosas enseñanzas y que su amistad no ha tenido comparación.

Y también dedicar mi trabajo a Dios, por permitirme llegar a esta etapa de mi vida. Que a pesar de los grandes obstáculos que se han presentado, me ha ayudado y me ha ayudado a salir adelante y que aunque a veces me he perdido en el camino siempre me ayuda a encontrar un regreso. Y por permitirme tener siempre cerca a mi familia, darme grandes amistades y estar con el amor más grandioso que nunca me hubiera imaginado.

ÍNDICE

	PÁGINA
Resumen	I
Summary	II
Introducción	1
Antecedentes	3
1.- El cáncer y su impacto en el mundo	3
2.- Terapias contra el cáncer	4
3.- Terapias dirigidas	5
4.- Nanoacarreadores como terapia	7
5.- Nanopartículas de óxido de hierro como acarreadores	9
6.- Nanopartículas recubiertas con quitosán	10
7.- Aplicaciones actuales de las nanopartículas de hierro	12
8.- Biodistribución de nanopartículas	13
9.- Factores que afectan la biodistribución	15
a) Vías de administración	16
b) Tamaño de la partícula	17
c) Carga de superficie	18
d) Recubrimiento de la partícula	19
e) Biodegradación y metabolismo	20
f) Eliminación	21
Justificación	23
Hipótesis	24

Objetivo General	25
Objetivos Particulares	25
Metodología	26
1.-Elaboracion y caracterización de los nanocomplejos	28
a) Purificación de los plásmidos pCEMLuc y pEGFP-N3 por maxiprep	26
b) Producción de Nanocomplejos de Quitosán con el plásmido p CEM-Luc	28
c) Ensayo de retención de los nanocomplejos y perfil de liberación de las micropartículas	29
2.- Determinación de la CC₅₀ de los plásmidos	30
3.- Determinación de la concentración de Fe incorporado por las células y el tiempo óptimo de expresión del gen luciferasa posterior a la administración de las micropartículas magnéticas in vitro	31
a).-Estandarización del volumen de transfección de las micropartículas	31
b).- Curva estándar de la técnica de Azul de Prusia y determinación de Hierro de las micropartículas	32
c).-Determinación de Fe en las células, posterior a la administración de micropartículas ensayo de Azul de Prussia	32
d).-Determinar el tiempo óptimo de expresión del gen reportero luciferasa acomplexado a las nanopartículas <i>in vitro</i>	33
4.- Analizar la biodistribución y expresión de las micropartículas magnéticas ADN/Quitosán in vivo	34
a) Inducción de tumor en ratones C57BL6/J	34

b) Biodistribución de micropartículas <i>in vivo</i>	35
c) Ensayo de expresión génica <i>in vivo</i>	35
Análisis de datos	36
Resultados	37
1.- Elaboración y caracterización de los nanocomplejos	37
a) Purificación de los plásmidos pCEMLuc y pGFP-N3 por maxiprep	37
b) Ensayo de retención de los nanocomplejos	38
c) Perfil de liberación de las micropartículas	40
2.- Determinación de la CC50 de las micropartículas	41
3.- Determinación de la concentración de Fe incorporado por las células y el tiempo óptimo de expresión del gen luciferasa posterior a la administración de las micropartículas magnéticas <i>in vitro</i>	42
a) Estandarización del volumen de transfección de las micropartículas	42
b) Curva estándar de la técnica de Azul de Prusia y determinación de Hierro de las micropartículas	43
c) Determinación de Fe en las células, posterior a la administración de micropartículas ensayo de Azul de Prussia	44
d) Determinar el tiempo óptimo de expresión del gen reportero luciferasa acompañado a las nanopartículas <i>in vitro</i>	45
4.-Analizar la biodistribución y expresión de las micropartículas magnéticas ADN/Quitosán <i>in vivo</i>	47
a) Inducción de tumor en ratones C57BL6/J	47

b) Biodistribución de micropartículas in vivo	48
c) Ensayo de expresión génica in vivo	50
Discusión	53
Conclusiones	60
Perspectivas	61
Bibliografía	62

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Diseño de acarreadores para terapias anti-cáncer	7
Tabla 2. Concentraciones observadas al nanodrop para cada plásmido extraído.	37
Tabla 3. Anova de 2 vías para la expresión <i>invitro</i> del gen reportero	46
Tabla 4. Prueba de Tukey para la expresión <i>invitro</i> del gen reportero	46
Tabla 5. Pesos obtenidos de los tumores para cada ratón	47
Tabla 6. Anova de 2 vías para la prueba de Azul de Prussia en órganos	48
Tabla 7. Prueba de Tukey para la prueba de Azul de Prussia <i>in vivo</i>	49
Tabla 8. Anova de 2 vías para la prueba de expresión de luciferasa en órganos	51
Tabla 9. Prueba de Tukey para la prueba de expresion de luciferasa <i>in vivo</i>	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Esquema de nanoacarreadores comúnmente utilizados en terapias anti cáncer	8
Figura 2. Nanoacarreadores de óxido de hierro	10
Figura 3. Estructura del Quitosán	11
Figura 4. Direccionamiento de nanopartículas	13
Figura 5. Biodistribución de partículas de hierro	15
Figura 6. Extracción del plásmido.	26
Figura 7. Mapa del Vector pCEMLuc.	27
Figura 8. Cálculo de radios proporcionales.	28
Figura 9. Gelación iónica.	29
Figura 10. Purificación de plásmido por maxiprep.	37
Figura 11. Prueba de retención del plásmido.	38
Figura 12. Curvas de tamaño y Polidispersidad de las micropartículas.	39
Figura 13. Ensayo de liberación del plásmido.	40
Figura 14. Ensayo de viabilidad por MTT.	41
Figura 15. Ensayo de transfección.	42
Figura 16. Ensayo de azul de Prussia de las micropartículas	43
Figura 17. Ensayo azul de Prussia en células transfectadas	44
Figura 18. Análisis de la expresión génica de las micropartículas in vitro.	45
Figura 19. Fotografías del tumor inducido en ratones B16F10	47
Figura 20. Ensayo de Azul de Prussia in vivo	48

Figura 21. Biodistribución de micropartículas en órganos	50
Figura 22. Ensayo de expresión del génica de las micropartículas	52

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

CC50	Concentración citotóxica media
IONPs	Iron Oxide Nanoparticles
PBS	Buffer fosfato salino
NPMs	Nanopartículas magnéticas
SRE	Sistema Retículo Endotelial
TPP	Tripolifosfato pentasódico

RESUMEN

Recientemente las micropartículas magnéticas ofrecen nuevas oportunidades en el desarrollo de sistemas de acarreamiento de drogas, gracias a que un gradiente presentado por un campo magnético externo localizado puede ser aplicado para escoger un sitio de atracción para una nanopartícula magnética cargada con alguna droga desde la circulación hasta el tejido de importancia (Alexiou C. *et al.* 2002).

Estas micropartículas poseen características fisicoquímicas únicas como lo son: un tamaño a nanoescala y una gran área de superficie, además de mostrar una excelente estabilidad química y en algunos casos propiedades térmicas (Jun Wang *et al.* 2010).

Se ha estudiado la habilidad de las IONP's de producir fuertes magnetizaciones únicamente en presencia de un campo magnético, lo que las convierte en vehículos prometedores para diversas aplicaciones. Sin embargo, las interacciones entre las nanopartículas y los organismos no son todavía completamente controladas. Uno de los retos actuales es determinar la biodistribución de nanopartículas tras la administración sistémica, ya que existen una amplia variedad de factores que juegan un papel importante en la distribución, permanencia y eliminación de las nanopartículas de óxido de hierro.

En el presente estudio se elaboraron micropartículas acomplejadas con ADN/Quitósán y éstas se caracterizaron obteniendo un tamaño aproximado de 320nm, se determinó la CC50 por MTT de 60.14 μ l de micropartículas. Además se obtuvo un tiempo óptimo de incorporación *in vitro* de 30 min con estimulación magnética determinado por la técnica de azul de Prusia. El tiempo óptimo de expresión del gen reportero y la biodistribución de las micropartículas *in vivo* se determinaron por ensayos de luminiscencia obteniendo tiempos de 60 horas para la expresión, una mayor distribución en tumor y órganos del Sistema Retículo Endotelial principalmente. Se pudo observar una mejora tanto en la distribución de las nanopartículas así como en la expresión del plásmido pCEMLuc al utilizar un campo magnético confirmando así la optimización de esta metodología al utilizar dicho campo.

SUMMARY

Recently the magnetic microparticles offer new opportunities in the development of drug augmentation systems, thanks to a gradient presented by an external magnetic field that can be applied to choose a site of attraction for a magnetic nanoparticle loaded with a drug from the circulation to the tissue of importance (Alexiou C. et al., 2002). These microparticles possess unique physicochemical characteristics such as: a nanoscale size and a large surface area, as well as showing excellent chemical stability and in some cases of thermal properties (Jun Wang et al., 2010).

The ability of IONPs to produce strong unique magnetizations on the presence of a magnetic field has been widely studied, making them promising vehicles for various applications. However, interactions between nanoparticles and organisms are not completely controlled.

One of the current challenges is to determine the biodistribution of nanoparticles after systemic administration, since there are a wide variety of factors that play an important role in the distribution, permanence and elimination of iron oxide nanoparticles.

In the present study microparticles were prepared with DNA / Chitosan and obtained approximately 320 nm in size, CC50 was determined by MTT of 60.14 μ l of microparticles. In addition, an optimal 30-minute in vitro incorporation time was obtained with the magnetic stimulation determined by the Prussian blue technique. The optimal time of reporter gene expression and biodistribution of the microparticles in vivo was determined by luminescence assays obtaining the times of 60 hours for expression, a greater distribution in the tumor and organs of the Endothelial Reticulum system mainly.

An improvement in both the nanoparticle distribution and the expression of the pCEMLuc plasmid has been observed in the use of a magnetic field, thus confirming the optimization of this methodology in field.

INTRODUCCIÓN

La nanociencia y la nanotecnología han obtenido un impulso significativo en los recientes años, relacionando a la biología con la ciencia médica, llevando a la emergencia de un nuevo campo interdisciplinario llamado nanomedicina (Ruirui Qiao *et al.* 2009).

La tecnología basada en nanopartículas presenta un gran potencial en una amplia variedad de aplicaciones biológicas y biomédicas, como lo son las drogas dirigidas a tejidos específicos o el acarreamiento de genes, representando una considerable innovación en las áreas de biociencia y biomedicina (Lin Yang *et al.* 2015).

Para las terapias que necesitan cierta especificidad a tejidos, como en las drogas dirigidas a tumores o drogas para otras condiciones patológicas, es deseable que exista un acarreador eficiente ya que, drogas como los agentes anti cáncer demuestran toxicidades no específicas que pueden afectar significativamente sus potenciales terapéuticos (Jain K *et al.* 2008).

Las nanopartículas poseen características fisicoquímicas únicas como lo son: un tamaño a nanoescala y una gran área de superficie, además de mostrar una excelente estabilidad química y en algunos casos propiedades térmicas (Jun Wang *et al.* 2010). En particular las nanopartículas magnéticas (NPMs) son exploradas por sus numerosas aplicaciones biomédicas, la función dual de estas NPMs como agentes contrastantes de imagen así como acarreadores resultan ser complementarias, ya que la detección de patologías y el transporte efectivo de una droga son componentes críticos de una terapia exitosa en muchas condiciones de enfermedad (Jain K *et al.* 2008).

Las nanopartículas magnéticas ofrecen nuevas oportunidades en el desarrollo de sistemas de acarreamiento de drogas gracias a que un gradiente presentado por un campo magnético externo puede ser aplicado para sitio dirigir una nanopartícula magnética cargada con alguna droga desde la circulación hasta el tejido de importancia (Alexiou C. *et al.* 2002).

El uso de nanopartículas magnéticas como vectores para el acarreamiento de drogas debe superar problemas como la capacidad de carga de drogas, un perfil de liberación deseable, una estable dispersión acuosa, biocompatibilidad con las células y los tejidos y retención de sus propiedades magnéticas tras la modificación con polímeros químicos o reacciones químicas (Jain K *et al.* 2008).

Por lo tanto, debido al continuo desarrollo para aplicaciones *in vivo* de estos nanomateriales, existe una necesidad por entender la biodistribución *in vivo* y sus mecanismos de eliminación.

La biodistribución de nanopartículas afecta tanto su eficacia como su seguridad, que son factores que deciden si una tecnología basada en nanopartículas podría ser utilizada en clínica de manera exitosa.

Se ha establecido que las nanopartículas son principalmente reconocidas y tomadas del flujo sanguíneo por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial (Banu S. Zolnik *et al.* 2010), sin embargo su biodistribución está influenciada por una cantidad de factores, incluyendo: la ruta de administración, las propiedades de la nanopartícula así como las características de superficie, tamaño, carga y forma, que pueden afectar las interacciones célula-nanopartícula e interacciones con proteínas séricas (Jain K *et al.* 2008), además de ser afectadas por el ambiente fisiológico en el que estas son introducidas (Almeida M. *et al.* 2011).

De esta manera, resulta de vital importancia monitorear una acumulación no deseada en otros tejidos así como caracterizar un destino a largo plazo (residencia indefinida, metabolismo o excreción) son requeridas para un completo entendimiento de una administración segura de nanopartículas (Li MG *et al.* 2010).

En este proyecto se evalúo el tiempo óptimo de expresión génica, así como la biodistribución *in vivo* de micropartículas magnéticas acomplejadas con ADN/quitosán dirigidas bajo un campo magnético *in vivo*.

ANTECEDENTES

1.- El cáncer y su impacto en el mundo

El cáncer se ha descrito como una de las enfermedades con mayor riesgo de la actualidad la cual se categoriza por un crecimiento celular no controlado (Chow AY. 2010). Las estadísticas en Estados Unidos (EU) indican que uno de cada cuatro personas muere de cáncer, y una de cada tres desarrolla algún tipo de cáncer en su vida (Téllez López 2009).

Las células cancerosas pueden crecer y dividirse rápidamente, produciendo un nuevo tejido que invade y destruye el tejido sano. Algunas de estas células pueden viajar a través del torrente sanguíneo o a través del fluido linfático y generar tumoración en otra u otras partes del cuerpo produciendo metástasis. En EU la incidencia se duplica cada 5 años a partir de los 25 años de edad y ciertos cánceres tales como el de próstata, mama, estómago y colon, alcanzan su incidencia máxima entre los 60 y 80 años (Téllez López 2009). A nivel mundial, ha habido un incremento de casi el 100% en el número de casos de cáncer de del año de 1980 al 2002 ya que paso de 572,000 casos a 1, 050,000 respectivamente.

En México del total de defunciones en la población a causa de tumores malignos durante los últimos 20 años, los localizados en órganos digestivos son la primera causa de mortalidad, con 32.52 casos por cada 100 mil habitantes; los tumores de órganos respiratorios e intratorácicos ocupan el segundo sitio (10.58 defunciones por cada 100 mil habitantes) y en tercer lugar se ubican los tumores del sistema reproductor masculino con 8.44 defunciones por cada 100 mil habitantes. Considerando este último dato y que entre las mujeres el cáncer de mama aparece como segunda causa de mortalidad con 14 defunciones por cada 100 mil., 13.6% se debieron a algún tumor y de estas, 93.6% a los tumores malignos, teniendo como total de defunciones por cáncer, 48.8% ocurren en varones y 51.2%, en mujeres (INEGI 2016).

La biología del cáncer es compleja, involucrando oncogénesis, evasión de los mecanismos de defensa del huésped, angiogénesis, invasión y metástasis. Además recientemente, la progresión del cáncer ha sido demostrada por la contribución de la información aportada en estudios de interleucinas y citocinas pleiotrópicas (Kozlowski L. *et al.* 2003).

Es debido a esto que ha surgido una enorme cantidad de terapias anti cáncer, diseñadas especialmente para combatir a la enfermedad, de manera de que pueda disminuirse tanto la mortalidad como la incidencia de la enfermedad.

2.- Terapias contra el cáncer

Actualmente las terapias que combaten el cáncer involucran procesos como la cirugía, la radioterapia, además de métodos invasivos que consisten en la introducción de agentes quimioterapéuticos al organismo. El efecto esperado de estas terapias es disminuir y matar a los tumores que son susceptibles a estas, buscando la manera más efectiva tomando en cuenta la alta tasa de crecimiento de estas células comparada con células sanas.

La efectividad de estos tratamientos está directamente relacionada con la habilidad de seleccionar y matar células cancerosas afectando la menor cantidad de células sanas posibles. Sin embargo, la administración de estos agentes terapéuticos de manera sistémica posee una variedad de efectos secundarios que en ocasiones son tan intensos que producen que los pacientes abandonen las terapias en conjunto de una disminución en la esperanza de vida del paciente antes de que las células tumorales puedan ser erradicadas (S.S. Feng y S. Chien 2003).

El máximo objetivo de las terapias contra el cáncer es incrementar la sobrevivencia y la calidad de vida del paciente, por lo cual la efectividad de los tratamientos se mide en su capacidad para eliminar tumores evitando dañar a los tejidos sanos.

Por lo que la capacidad para seleccionar de manera específica un blanco es vital para el éxito de un tratamiento, una especificidad a un sitio incrementada y una buena

internalización disminuyen la posibilidad de tener los efectos secundarios que los pacientes con cancer experimentan (Brannon-Peppas y Blanchette 2004).

Debido a esto, se han realizado investigaciones en los años recientes, las cuales buscan mejorar estos tratamientos, de manera que se pueda mejorar tanto la esperanza, así como la calidad de vida del paciente.

Estas terapias involucran el desarrollo de acarreadores para los agentes terapéuticos, en conjunto con nuevas vías de administración, obteniendo así una terapia más específica y de menor riesgo.

3.- Terapias dirigidas

Actualmente las terapias más comunes para el tratamiento del cáncer incluyen procesos invasivos como la quimioterapia, la radiación y la cirugía, que generalmente, resultan en el incremento de la tasa de mortalidad de los pacientes así como en una amplia gama de efectos secundarios que disminuye la calidad de vida en estos.

Dando como resultado a que los esfuerzos en investigación han ido creando métodos adicionales basados en numerosas moléculas, principalmente enfocándose en la disminución de efectos tóxicos y daños colaterales, más sin embargo, los riesgos aún continúan presentes por lo que la toxicidad y la no especificidad en muchos de los fármacos utilizados, entre otras, aun representan un duro reto para este tipo de terapias.

Gracias a esto es que surgen las terapias específicas dirigidas a tumor con el principal interés de concentrar a los tratamientos únicamente en el sitio de interés y así evitar el daño en sitios no deseados, reduciendo considerablemente la toxicidad de estas terapias. En todos los casos la efectividad del tratamiento está directamente relacionada en su habilidad para usar como blanco específico y matar a las células del cáncer y en consecuencia incrementar la sobrevivencia y la calidad de vida de los pacientes (Brannon-Peppas Lisa y Blanchette 2004).

Las terapias dirigidas representan una serie de estrategias combinadas las cuales pueden incluir el uso de anticuerpos monoclonales modificados como agente para la orientación hacia el tumor, liposomas que reduzcan la toxicidad de los fármacos y otras

formulaciones alternativas. La terapia dirigida está ganando popularidad debido a su especificidad sobre las células del cancer evadiendo así a las células sanas (Viswanadha V. 2015).

Dentro de los tipos de terapias dirigidas que se han utilizado en los últimos años encontramos la utilización de anticuerpos monoclonales, en esta terapia actualmente popular se utilizan anticuerpos en contra de antígenos específicos de la superficie de las células cancerosas permitiendo dirigir el tratamiento hacia células específicas disminuyendo la toxicidad hacia las células sanas. Dentro de la terapia con anticuerpos monoclonales los más utilizados son: Alemtuzumab, Gemtuzumab, Rituximab, Trastuzumab, Ibritumomab (Chemocare 2015).

Otra de las terapias estudiadas en la actualidad son los inhibidores de la angiogénesis, su utilización en el tratamiento del cáncer es uno de los campos más prometedores en la actualidad, ya que actúan inhibiendo procesos específicos tumorales y no afectan a otras poblaciones celulares. Por ello, este tratamiento presenta una menor toxicidad. Además, el tratamiento no está diseñado para atacar directamente las células tumorales sino procesos controlados por éstas, como el desarrollo del endotelio vascular, por lo que la efectividad del tratamiento no se ve afectada por el elevado número de mutaciones de las células tumorales (Liekens S. *et al* 2001).

Hoy en día una de las areas de investigación para el tratamiento del cáncer incluyen el desarrollo de acarreadores que permitan rutas alternativas para la dosificación de fármacos, nuevos blancos terapéuticos como lo son los vasos sanguíneos que alimentan al tumor y terapias que sean más específicas en su actividad, etc.

Finalmente los acarreadores basados en sistemas microparticulados sugieren una excelente alternativa esto gracias a su versatilidad ofreciendo una mejor biocompatibilidad y la oportunidad de transportar compuestos que serían altamente tóxicos para el organismo sin el apoyo de estos vectores.

4.-Nanoacarreadores como terapia

La nanotecnología tiene el potencial para revolucionar tanto el diagnóstico como la terapia anti-cáncer. Los avances en la ingeniería genética de proteínas y materiales han contribuido a nuevos descubrimientos de dirección a nanoescala. Diversos nano-acarreadores han sido aprobados para uso clínico y que sin embargo existen pocos de estos que se unan e incorporen de manera selectiva a las células del cáncer (Dan Peer, Jeffrey y M. Karp 2007).

Los nanoacarreadores son materiales en tamaño a nanoescala (diámetros de 1-100nm) que pueden ser cargados con múltiples drogas. Esto es debido a su alto rango área de superficie-volume. Estos nanoacarreadores también pueden ser utilizados para incrementar la concentración local de drogas además de controlar la liberación una vez que se unen a sus blancos (Dan Peer, Jeffrey y M. Karp *et al.* 2007).

Existen dos tipos de direccionamiento de estos acarreadores: el tipo pasivo, el cual explota las características y la biología del tumor, en donde estos se acumulan en el tumor debido a la permeabilidad y retención aumentada propias del tumor. El tipo activo se logra al conjugar a estos acarreadores moléculas que se unan a antígenos sobre-expresados o receptores sobre las células blanco (Dan Peer, Jeffrey y M. Karp 2007).

Los nano-acarreadores enfrentan numerosas barreras y retos en su camino hacia el sitio blanco, como lo pueden ser las barreras mucosas, la captura no específica por parte de las defensas del huésped, etc. Para enfrentar estos retos en cuestión de dirección hacia el tumor es necesario combinar un diseño razonable de estos nano-acarreadores con el entendimiento fundamental de la biología del tumor (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño de acarreadores para terapias anti-cáncer. Factores a tomar en cuenta para el diseño adecuado de un nanoacarreador (Dan Peer 2007).

Diseño de los nano-acarreadores	
Ventajas de los nano-acarreadores	Factores a tomar en cuenta
Protege al agente de degradación prematura	Hechos de un material biocompatible, bien caracterizado y fácilmente funcionalizado
Previene al agente de interactuar de forma prematura con el ambiente biológico	Exhibir una alta eficiencia en la captación por las células blanco en comparación con las células o tejidos normales
Aumenta la absorción del agente en el tejido seleccionado	Ser ya sea solubles o coloidales en condiciones acuosas para incrementar su efectividad
Controla el perfil de distribución en tejido y el perfil farmacocinético	Tener una vida media extendida en circulación, un bajo rango de agregación y una vida elevada protectora
Incrementa la penetración intracelular	

Actualmente se utilizan polímeros tanto naturales como sintéticos, la familia de los nanoacarreadores incluye conjugados poliméricos, nanopartículas poliméricas, acarreadores basados en lípidos como los liposomas y las micelas, dendrimeros, nanotubos de carbono, etc. (Figura 1).

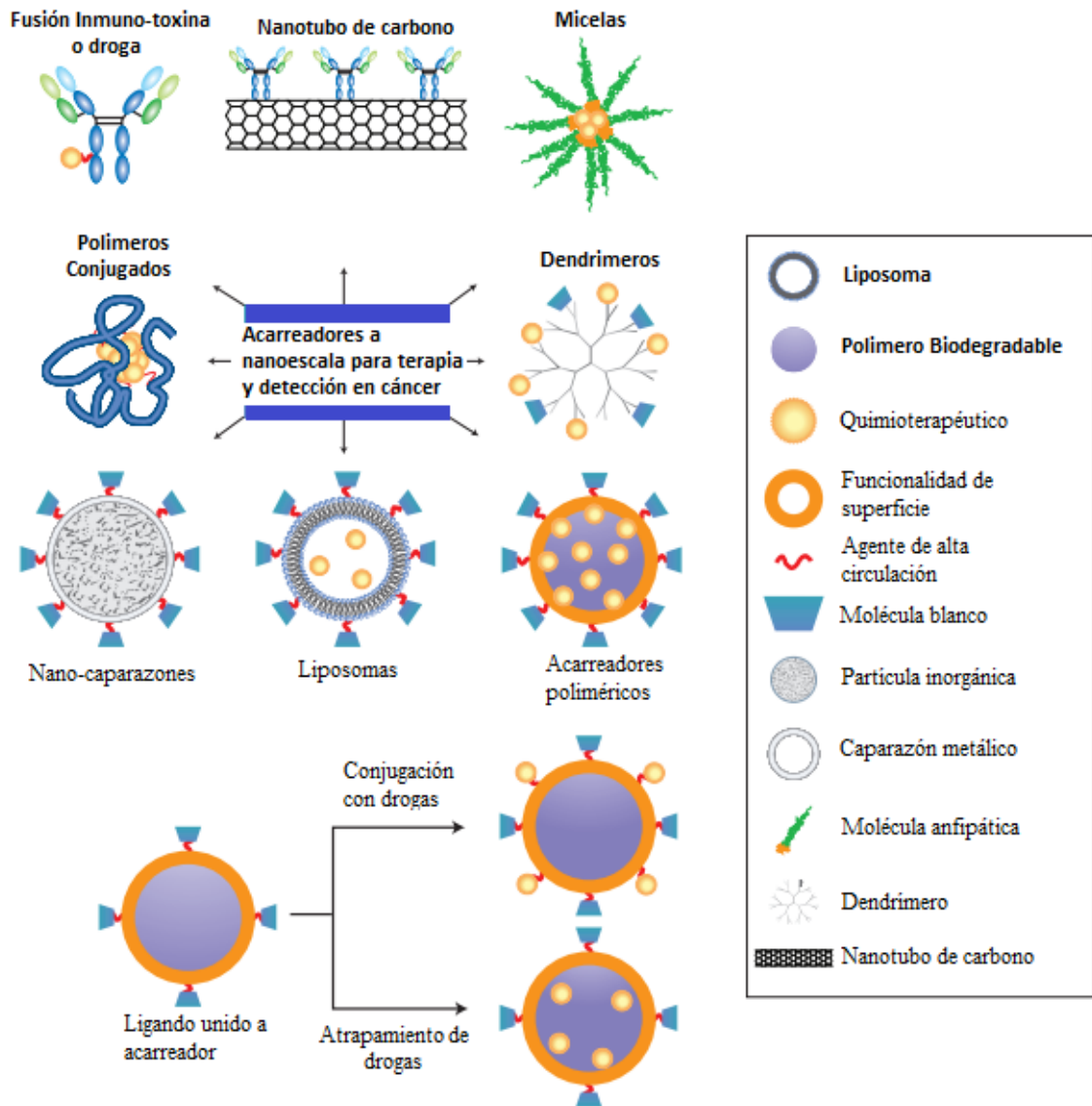


Figura 1. Esquema de nanoacarreadores comúnmente utilizados en terapias anti cáncer (Dan Peer 2007).

5.- Nanopartículas de óxido de hierro como acarreadores

Actualmente los sistemas de transporte de drogas nanomarcadas han ganado aplicaciones en la industria farmacéutica desde que las drogas basadas en nanopartículas han mejorado la solubilidad, farmacocinética y biodistribución. Las drogas acarreadas por nanopartículas son fáciles de administrar, poseen menos efectos secundarios y ofrecen una ventaja de mercado (Powers M. 2006). Con las nanopartículas utilizadas como vectores, los agentes terapéuticos pueden estar en circulación por periodos extendidos de tiempo además de la llegada a tejidos específicos donde los vasos sanguíneos son más permeables (L. Brannon-Peppas y J. Blanchette 2012).

Se ha puesto un especial enfoque en los recientes años para estudiar a las nanopartículas magnéticas debido a su particular área de superficie, efecto cuántico de tamaño y características magnéticas para el uso en medicina e investigación (Powers M. 2006).

Recientemente se ha estudiado la habilidad de las nanopartículas de óxido de hierro (IONP's) de producir fuertes magnetizaciones únicamente en presencia de un campo magnético, lo que las convierte en vehículos prometedores para diversas aplicaciones biomédicas (Villaraza AJL *et al.* 2010).

Las IONP's se definen por la composición de su núcleo (Figura 2), su recubrimiento y su tamaño, las más comúnmente estudiadas consisten de un núcleo de Fe_3O_4 (magnetita) o $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita), el diámetro promedio de un poco más de 50 nm clasificadas como IONP's superparamagneticas, además de algunas que poseen diámetros menores a 50 nm clasificadas como IONPs ultrapequeñas (Gupta AK y Gupta M. 2005).

Estas IONP's son de gran interés para la medicina gracias a su tamaño, propiedades magnética y modos relativamente simples de síntesis y biocompatibilidad (Gupta AK y Gupta M. 2005). Además poseen un gran potencial en una amplia variedad de aplicaciones biomédicas y biológicas, como el contraste de imagen por resonancia magnética, drogas dirigidas o transporte de genes, ingeniería de tejidos, detoxificación de fluidos biológicos, hipertermia en terapia de cáncer, entre otros (Lin Yang *et al.* 2015).

Los estudios de las IONP's y su potencial como vehículos para el transporte de drogas para quimioterapia en contra de tumores han tenido un incremento en los recientes años. (Hoskins C. *et al.* 2010).

Sin embargo la metodología para el acarreamiento *in vivo* enfrenta diversos retos. Un ejemplo son las nanopartículas de silica comúnmente usadas, poseen un tamaño aproximado de 50 a 100 nm, y pueden cargar un número muy limitado de IONP's, por lo que se produce una atracción magnética débil, haciendo que la magnetotaxis sea insuficiente para un acarreamiento débil en un ambiente biológico complicado (Trever Todd *et al.* 2014).

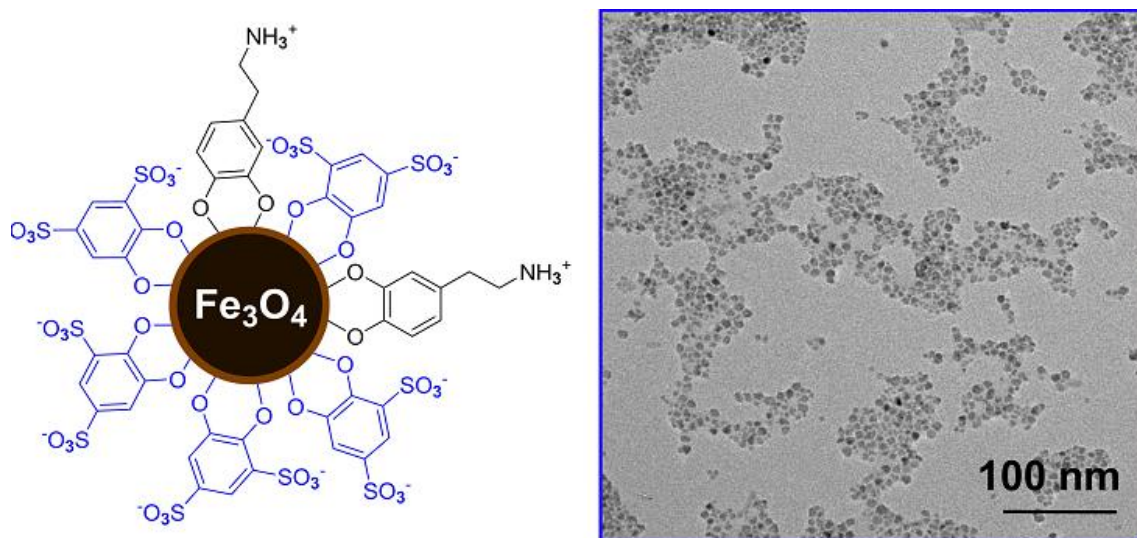


Figura 2. Nanoacarreadores de óxido de hierro. Estructura molecular y tamaño aproximado de una nanopartícula de óxido de hierro (Katalin V. Korpany 2013).

6.- Nanopartículas recubiertas con quitosán

Actualmente se han documentado una numerosa cantidad de biomoléculas o compuestos utilizados como acarreadores los cuales se caracterizan por tener una inestabilidad muy marcada debido a sus propiedades fisicoquímicas, lo que hace de su administración todo un reto y disminuyen su promesa terapéutica, lo que representa uno de los principales problemas hoy en día en la aplicación de nuevas terapias contra el cáncer.

Uno de las principales motivos de esta problemática, se deben a que la única ruta de ingreso al organismo es por vía parenteral, la cual frecuentemente lleva a complicaciones terapéuticas (Andrade F. 2011).

Por lo que encontrar y desarrollar alternativas adecuadas se ha convertido en un gran interés en investigación diseñando acarreadores adecuados que permitan administración parenteral con una menor cantidad de riesgos. Estos acarreadores deben exhibir características que incluyen: capacidad de asociarse a drogas, la habilidad de promover su estabilidad fisicoquímica, protección a los fármacos encapsulados y en algunos casos controlar la liberación de los mismos (Chiellini *et al.* 2008).

En este contexto las nanopartículas poliméricas han surgido como vehículos prometedores debido a que poseen propiedades atractivas, como lo son: un radio volumen-superficie incrementado y un aumento en la absorción de drogas (Silva *et al.* 2007).

El quitosán (Figura 3) es uno de los polímeros naturales más comúnmente utilizados, esto es debido a que muestra una variedad de características atractivas para el acarreamiento de drogas y ha probado ser muy efectivo cuando se encuentra en una formulación de nanopartículas. Propiedades como lo son: su carácter catiónico y su solubilidad en un medio acuoso han sido reportadas como determinantes en el éxito de este polisacárido (Janes *et al.* 2001).

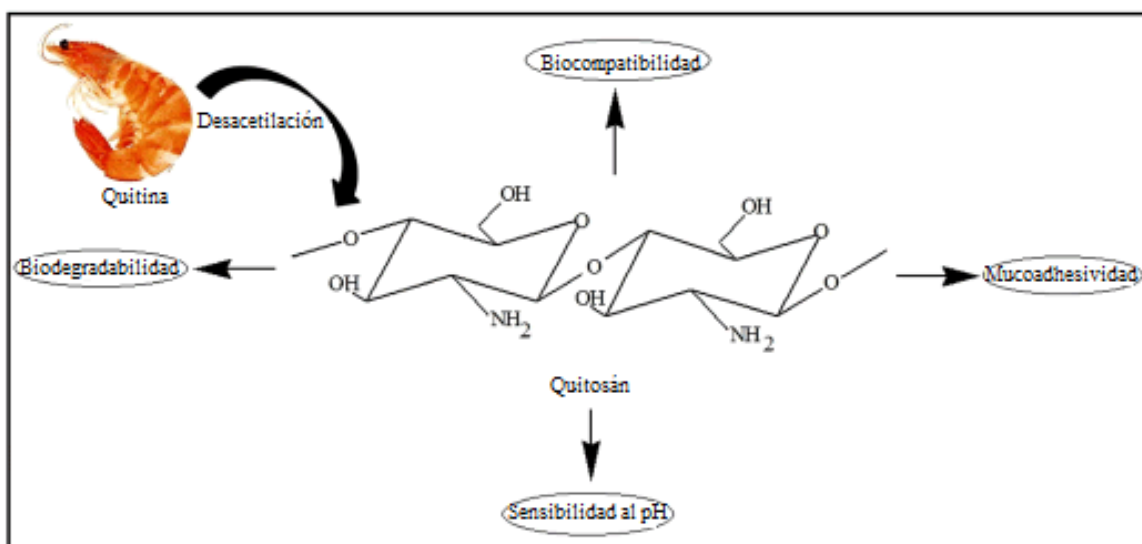


Figura 3. Estructura del Quitosán. Estructura del quitosán junto a sus propiedades características (Saikia C. 2015).

Además, el quitosán ha demostrado una capacidad para incrementar la permeabilidad epitelial a macromoléculas (Schipper *et al.* 1996), también es reconocido por exhibir una baja toxicidad y ser altamente biocompatible (Andrade *et al.* 2011) los cuales son dos requisitos para el acarreamiento de drogas.

Notablemente, el quitosán ha sido referido por aumentar la eficiencia de captación de drogas cuando se encuentra en una formulación de nanopartículas (Bowman y Leong 2006).

Gracias a esto que existe una enorme cantidad de información prominente que sostiene la utilización de nanopartículas, reforzando así el potencial de estos acarreadores en campos biofarmacéuticos y biomédicos. Estas pueden ser aplicadas tanto como acarreadores de drogas, para la entrega dirigida de material genético y aplicaciones más específicas como lo es la terapia del cáncer.

7.- Aplicaciones actuales de las nanopartículas de hierro

El uso de micropartículas magnéticas ha ganado popularidad en los últimos años, esto gracias a su capacidad de transportar moléculas de interés al sitio diana siendo dirigidas por un campo magnético (Figura 4).

Entre los ejemplos que se han trabajado recientemente encontramos los estudios realizados por Jain *et al.*, en el 2005 quienes desarrollaron micropartículas de óxido de hierro cubiertas con ácido oleico con el propósito de transportar sustancias insolubles hacia el tumor. Giustini *et al.*, en el 2011 generó un sistema de micropartículas magnéticas cubiertas con dextrano en el que una vez dirigidas al sitio del tumor se utilizaba un campo magnético alternativo para generar hipertermia en el sitio tumoral. Todd *et al.* (2014) utilizó diatomeas encapsuladas en conjunto con micropartículas de hierro con el fin de dirigir moléculas pequeñas al tumor.

Estudios como estos demuestran la versatilidad que representan estos sistemas siendo una promesa interesante en la generación de nuevos modelos terapéuticos y aplicación de diversos tratamientos.

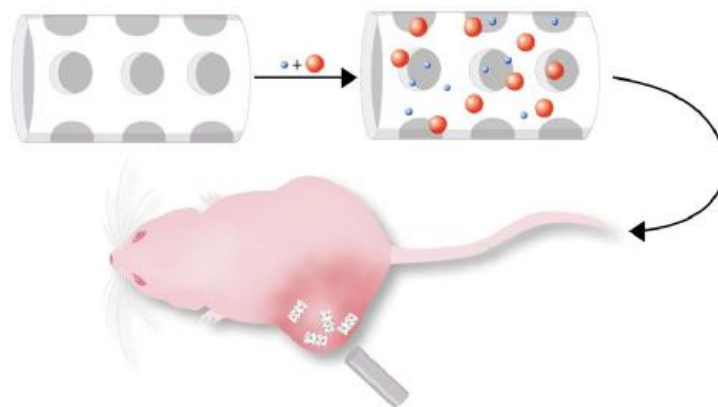


Figura 4. Direccionamiento de nanopartículas. Atracción de nanopartículas cargadas con un agente terapéutico hacia un tumor estimulado por un campo magnético (Todd *et al.* 2014).

8.- Biodistribución de nanopartículas

La biodistribución de nanomateriales estudia su acumulación en ciertos órganos, en los cuales a su vez se refleja en el comportamiento tóxico de este nanomaterial. La toxicidad de los nanomateriales depende de su persistencia o el visto bueno de sus órganos diana. Existen numerosos trabajos que se han enfocado en estudiar cómo es que estos materiales pueden interactuar y/o acumularse en ciertos órganos.

Un análisis *in vivo* de la biodistribución tras la administración intravenosa de nanopartículas mediante la PET reveló una fuerte dependencia del tamaño en la distribución y acumulación de las nanopartículas en los órganos. El movimiento de estas partículas depende de sus características, su superficie, sus propiedades químicas y las interacciones con otras proteínas y moléculas relacionadas biológicamente. Además, la unión de proteínas a las nanopartículas ocurre casi instantáneamente una vez que la partícula entra el medio biológico, esta unión puede contribuir a diferentes respuestas biológicas importantes para la biodistribución de la nanopartícula.

Sin embargo en situaciones en las que no se desea un acarreamiento específico a células del sistema inmune, es de suma importancia que estas partículas no estimulen la detección por parte de éste de manera que puedan permanecer invisible a las células inmunes que puedan eliminarlas de circulación (Dobrovolskaia *et al.* 2009).

Uno de los principales conceptos que deben ser tomados en cuenta para conocer la biodistribución de un material, son las diversas interacciones con el sistema inmune, existen tres principales categorías que son consideradas relevantes para la distribución de nanopartículas en el sistema inmune y los órganos; estas son la hemolisis, trombogenicidad y la activación de complemento (Dobrovolskaia *et al.* 2009).

El termino hemolisis se utiliza para describir el daño a las células rojas de la sangre. Una nanopartícula que induce hemolisis puede absorber la hemoglobina liberada y esto incrementar la eliminación por parte de los macrófagos (Schroit AJ. *et al.* 1985). En cuanto a la trombogenicidad, que hace referencia la producción de coágulos por parte de los materiales y debido a que las nanopartículas son diseñadas para permanecer un largo tiempo en la sangre esta debe ser diseñado para evitar la cascada de coagulación.

Además, los monocitos y macrófagos que se encuentran alrededor del cuerpo y más ampliamente distribuidos en el hígado, bazo, nódulos linfoides y medula ósea se denominan en conjunto sistema retículo endotelial (RES). Estas células tienen la capacidad de reconocer y fagocitar a las nanopartículas, de esta manera las nanopartículas se pueden encontrar secuestradas comúnmente en estos órganos del RES (Owens y Peppas 2006).

Además, estudios tempranos acerca de la biodistribución de IONP's (Figura 5) determinaron que éstas se acumulan principalmente en los órganos del RES y en las células de Kupffer del hígado (Reimer y Balzer 2003) involucrando a este órgano como uno de los principales encargados en la eliminación de nanopartículas fuera del sistema RES.

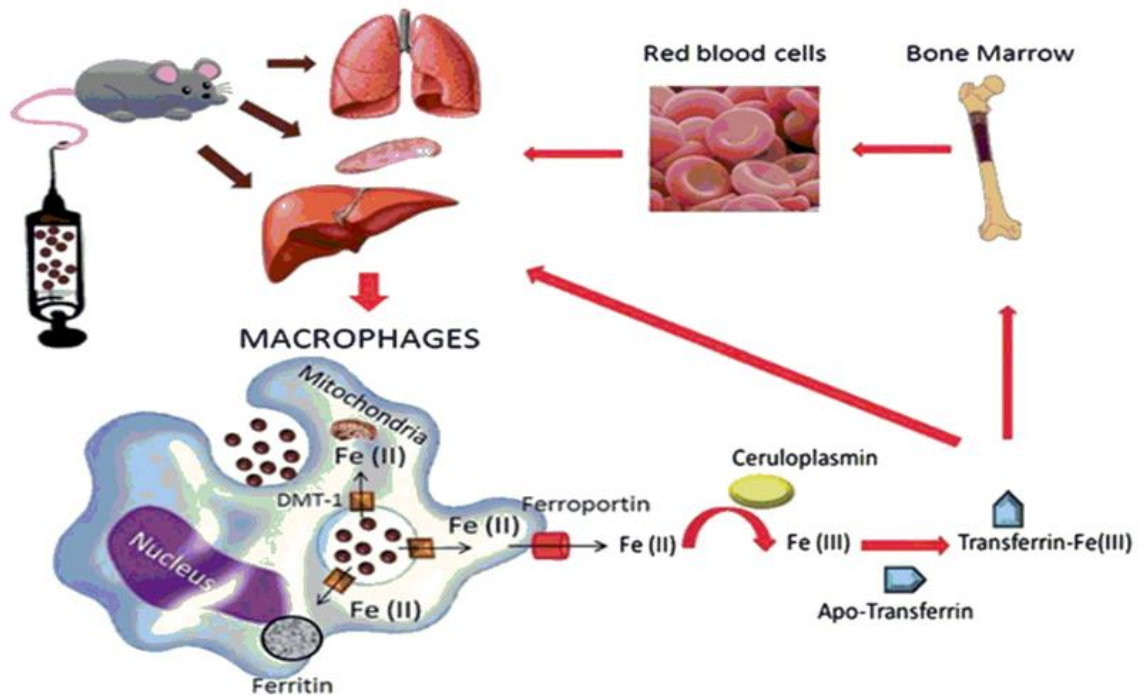


Figura 5. Biodistribución de partículas de hierro. Rutas metabólicas que siguen las partículas de hierro tras su administración parenteral (A. Ruiz *et al* 2013).

Como se ha mencionado anteriormente la absorción de proteínas en la nanopartículas es importante para el destino de las nanopartículas ya que pueden absorber opsoninas (proteínas del complemento, IgG, laminina) y de esta manera ayudar a las células inmunes a reconocer a estas partículas y rápidamente ser fagocitadas o activar una cascada de respuestas inmunes (Owens y Peppas 2006).

Finalmente las proteínas involucradas en la cascada del complemento pueden unirse al sistema de nanopartículas, alterando su biodistribución eliminándolas rápidamente de la circulación. Además de que la activación del complemento de manera sistémica pudiera provocar reacciones de hipersensibilidad, provocando efectos indeseables en la aplicación terapéutica (Dobrovolskaia *et al.* 2009).

9.- Factores que afectan la biodistribución

La biodistribución *in vivo* se puede ver afectada por una considerable cantidad de factores. Las características de la superficie y el tamaño pueden afectar a la absorción de proteínas por parte de estas, una gran diversidad de proteínas existen en el plasma y estudios sugieren que la absorción de proteínas depende del tamaño de la partícula, su

curvatura, su hidrofobicidad y la carga de la superficie, se ha descrito que esta absorción de proteínas puede causar agregación de nanopartículas o afectar a todas las características de la nanopartícula afectando finalmente su distribución en el organismo (Karmali y Simberg 2011). A continuación se enlistan algunos de los factores más comunes que se encuentran involucrados en la biodistribución:

a) Vías de administración

Dentro de las múltiples rutas de administración de nanopartículas se puede incluir a las vías: intravenosa, oral, pulmonar y dérmica, donde la inyección intravenosa es actualmente uno de los métodos más estudiados (Choi y Frangioni 2010).

Tomando en cuenta la vía de administración intravenosa, el tamaño de la nanopartícula y el endotelio del vaso sanguíneo afectan el transporte de la nanopartícula hacia los tejidos de interés. Por ejemplo: el endotelio de los capilares del pulmón y el músculo se caracterizan por una morfología continua que permite únicamente el paso de pequeñas moléculas (< 3 nm), por otro lado los riñones tienen capilares fenestrados, estos espacios permiten un transporte de nanopartículas de tamaños menores a 60 nm (Chrastina y Schnitzer 2011).

En órganos de difícil acceso como lo es el cerebro, un factor determinante en la terapia en diversas patologías, es la ruta de administración. Diversos estudios al respecto han demostrado que la ruta intraarterial posee resultados prometedores sobre la ruta subcutánea e intravenosa, la ventaja de esta ruta reside en que la vasculatura de los órganos que son perfundidos por las arterias que son inyectadas recibe una alta concentración de plasma durante el primer paso durante la circulación, esto sumado a la acción de un campo magnético impartido a las IONP's resulta en una aplicación ideal en el tratamiento de patologías cerebrales (Cole AJ. *et al.* 2011).

Tomando en cuenta esto el proceso de transporte siguiendo una administración intravascular puede ser dividida en dos componentes: primero un transporte pasivo hacia la vasculatura del tejido blanco y segundo el atrapamiento de estas partículas en el tejido apoyado por un campo magnético (Eckman WW. *et al.* 1974).

Además, Se ha demostrado que la focalización de las nanopartículas en el flujo sanguíneo depende de la interacción entre la fuerza magnética y el arrastre hidrodinámico, la captura magnética de las nanopartículas ocurre únicamente cuando la fuerza magnética es mayor a la fuerza de arrastre opuesta impartida por el flujo sanguíneo (Pankhurst Q. *et al.* 2003).

b) Tamaño de la partícula

El tamaño de las nanopartículas es crucial para su biodistribución, se ha reportado que las nanopartículas de mayor tamaño son eliminadas del flujo sanguíneo más rápido que las nanopartículas de menor tamaño. Además se demostró que las nanopartículas menores a 40 nm en diámetro, tanto la biodistribución como vida media en sangre de nanopartículas de óxido de hierro, son determinadas principalmente por el material que las cubre que por el tamaño medio de la partícula. (Neuberger *et al.* 2005).

El endotelio juega un papel importante en la distribución de la partícula hacia los diversos tejidos y que se ve afectado directamente por el tamaño de la partícula, por ejemplo: el endotelio del bazo posee hendiduras inter-endoteliales cuyo tamaño es aproximadamente 200 nm y su función es filtrar células envejecidas o dañadas.

Tomando en cuenta este tamaño de hendidura las nanopartículas mayores a 200 nm tienden a acumularse en este órgano (Moghimi SM. *et al.* 2001).

Por lo tanto, las IONP más grandes son rápidamente tomadas por el hígado y el bazo y poseen menor tiempo en circulación, mientras que las partículas más pequeñas tienen un acceso incrementado a órganos como los nódulos linfáticos y poseen mayor tiempo en circulación.

En un estudio utilizando ferumoxtran, una nanopartícula de 30 nm recubierta de dextrano, y comparando con IONPs de mayor tamaño se observó que estos se encontraban de un 37 a 46% en el bazo y de 5 a 11 % en nódulos linfoides 24 horas tras su inyección, mientras que las nanopartículas de 80 nm mostraron un 83% de acumulación en el hígado (Bourrinet P. *et al.* 2006).

Mientras que en otro estudio realizado por Chouly *et al.*, se reportaron tendencias similares en nanopartículas de óxido de hierro de 33 a 90 nm donde las nanopartículas más grandes eran tomadas principalmente por el hígado (Chouly C. *et al.* 1996).

También se ha reportado para el caso de la distribución de las nanopartículas de oro, esta es dependiente de tamaño, donde las partículas pequeñas (5 a 10 nm) se acumularon en el hígado; partículas de medio tamaño (30 nm) se almacenaron en el bazo; mientras que partículas de mayor tamaño (60 nm) no se observaron en estos órganos (X.D. Zhang *et al.* 2011).

Por otra parte, se ha observado que las nanopartículas mayores a 120 nm son capaces de entrar a capilares altamente permeables que proveen sangre a los tumores en constante crecimiento. Sin embargo esto no ocurre en tejidos normales ya que los capilares sanguíneos están bien organizados y no poseen poros, provocando una acumulación en el tumor (Maryam Malekigorji *et al.* 2014).

Respecto al tamaño de la partícula y su eliminación, estudios en vivo muestran que las IONP's más grandes muestran tiempos cortos en sangre y son eliminado principalmente por macrófagos en el hígado y en el bazo. En contraste las IONP's más pequeñas mostraron una vida media en sangre más larga y se almacenaban principalmente en nódulos linfoides y tejidos periféricos (K. Muller *et al.* 2007).

c) Carga de superficie

Otra de las características que resulta importante en esta clase de tecnología es la superficie de carga. Las IONP que son diseñadas con una superficie de carga neutra exhiben comúnmente un mayor tiempo en circulación y tienen una captación reducida por parte de los órganos del RES debido a su opsonización reducida (Aggarwal P. *et al.* 2009).

Papisov *et al.*, realizó estudios sobre el efecto de la superficie de carga en la distribución de las IONP generando nanopartículas recubiertas de dextrano de aproximadamente 21 nm de diámetro, estas poseían cargas positivas inmovilizándolas con poli-L-lisina y con cargas negativas inmovilizadas con poli-L-lisina seguidas de succinato.

Las nanopartículas cargadas positivamente mostraron una eliminación más rápida (una vida media de 1 a 2 min en sangre) y se encontraron principalmente en el hígado y el bazo, mientras que las nanopartículas cargadas negativamente tuvieron una eliminación más lenta (40 - 50 min en sangre), encontrándose mayormente en nódulos linfoides y exhibieron una biodistribución y farmacocinética similar a las partículas con carga neutra (Papisov MI. *et al.* 1993).

Chouly *et al.*, en un estudio con nanopartículas recubiertas con dextrano, reportaron que la captación por parte del hígado de partículas cargadas es mayor que el de partículas neutrales. Por lo que una carga casi neutral representa una ventaja en la prevención de su rápida eliminación del flujo sanguíneo (Chouly C. *et al.* 1996).

d) Recubrimiento de la partícula

Se sabe que las nanopartículas de óxido de hierro comúnmente se recubren por una pequeña partícula o un polímero, como dextrano, almidón, citrato, entre otros, algunos estudios han comparado la distribución de las IONP's con diferentes recubrimientos observando que cualquier cambio mínimo en el recubrimiento de la partícula muestra defectos significativos en la morfología celular y la vitalidad *in vitro* (Soenen SJH. y De Cuyper M. 2010).

Respecto a las terapias con drogas dirigidas, las IONP deben tener la capacidad de circular libremente en la sangre y mostrar una mínima captación en los órganos del RES. Diversos grupos han diseñado métodos de síntesis de IONP's recubiertas con óxido de polietileno (PEO) que contiene grupos químicos cargados que promueven una mayor circulación sanguínea y mayor captación al tejido de interés (Foy SP. *et al.* 2010).

Jain y colaboradores desarrollaron IONP's recubiertas con ácido oleico hidrofóbico (OA) capaz de transportar moléculas de drogas hidrofóbicas, esto seguido de un co-polímero anfifílico, resultando en una nanopartícula de 193 nm. Se observó un 55% de distribución en el hígado tras 6 horas después de la inyección mostrando que estas partículas fueron captadas por el RES. Esto se comparó con lo observado en nanopartículas cubiertas de dextrano, concluyendo que la captación es menor que cuando la partícula se cubría con dextrano (Jain K. *et al.* 2008).

Los métodos de síntesis de IONP's han sido desarrollados de manera que poseen una alta uniformidad, sin embargo, resultando en una partícula hidrofóbica insoluble en agua (Gupta AK. 2005). Cubriendo estas partículas con polímeros anfifílicos puede facilitar su solubilidad en agua y por lo tanto su biocompatibilidad (Yu WW. *et al* 2007).

Las nanopartículas de hierro, además, han sido incorporadas en estructuras macromoleculares para así explotar sus propiedades magnéticas. Un ejemplo de este tipo de fabricación son los magneto-liposomas. Se han construido este tipo de sistema obteniendo un rango de tamaño de 100 a 200 nm, obteniendo un acarreamiento exitoso con una eficiencia de encapsulación entre el 74% a 92% (Maryam Malekigorji *et al.* 2014).

e) Biodegradación y metabolismo

Es conocido que el núcleo de las IONP así como su recubrimiento se degrada con el tiempo. La biodegradabilidad del núcleo de óxido de hierro, de su recubrimiento y además el metabolismo del hierro propio del organismo afectan tanto la biodistribución y la farmacocinética (Bourrinet P. *et al.* 2006).

Uno de los factores que lleva a la lenta excreción de hierro de las IONP, es su posible incorporación en la reserva de hierro del organismo tras la degradación del núcleo de hierro. Se cree que cuando el núcleo de una IONP es degradado en las células de Kupffer en el hígado, el hierro que se libera se une a la proteína apoferritina y forma un complejo hierro-proteína (ferritina) que sirve de almacenaje al organismo (Jain K *et al.* 2008).

Estudios realizados por Jain K. y colaboradores han demostrado que los niveles de hierro en suero primero incrementan alrededor de un periodo de 1 semana posterior al tratamiento con IONP's, disminuyendo lentamente posteriormente, sugiriendo que se necesitan más de 3 semanas para que los niveles de hierro regresen a la normalidad.

Además, los cambios de niveles de hierro varían de tejido a tejido, se ha podido observar que los niveles en el hígado se incrementan tras 6 horas posterior al tratamiento con IONP's disminuyendo lentamente después de 3 días. Otros tejidos también presentaron

niveles incrementados 1 semana después de la inyección, pero el incremento fue mayor en el hígado, bazo, corazón y cerebro en comparación a tejidos como el pulmón y el riñón (Jain K *et al.* 2008).

Así mismo, generalmente las IONP's que exhiben vidas medias largas en sangre poseen una distribución limitada dentro de las células sinusoidales del hígado (células de Kupffer) con una captación significativa en órganos como el bazo, nódulos linfoides y la medula ósea. Sin embargo, las células sinusoidales del hígado captan la mayoría de la dosis inyectada de material articulado (>70%) por lo que exhiben vidas medias cortas en sangre (Pouliquen *et al.* 1991). La captación total y la distribución de partículas en el hígado es importante, ya que tanto la concentración de partículas de óxido de hierro y su distribución específica dentro de las células del hígado influyen al metabolismo hepático (Wise *et al.* 1991).

f) Eliminación

La eliminación de las IONP es un proceso complejo, en un estudio se mostró que la eliminación del hígado es de 3 días y 4 días para una limpieza del bazo, una limpieza total del organismo de 44.9 días aproximadamente. Este tiempo prolongado para una limpieza sistémica se atribuye al metabolismo de las IONP en hierro para las células rojas y la excreción normalmente lenta de hierro del organismo (Weissleder *et al.* 1989).

En el mismo estudio, se probó al Ferumoxido, una IONP recubierta con dextrano con diámetro promedio de 80 nm fue una de las primeras en ser aprobadas, encontrando que un 82% de estas partículas se encontraba acumulado en el hígado y 6.2% en el bazo después de 1 hora tras la inyección intravenosa, alcanzando sus picos máximos tras 2 y 4 horas respectivamente (Weissleder *et al.* 1989).

Lin Yang y colaboradores observaron que las IONP's con un mínimo tamaño (10 nm) se eliminan fácilmente por el hígado y los riñones, sin embargo estas pueden entrar al cerebro y al útero (Lin Yang *et al.* 2015).

Es gracias a todo lo mencionado que el estudio de la biodistribución representa una pieza clave para el estudio de cualquier material que desee ser utilizado en terapias, al

representar una red compleja de interacciones entre el material y los diferentes componentes del organismo. Es importante conocer la biodistribución de estas micropartículas conocer su destino final, las características y los componentes que se encuentran involucrados, con el fin de optimizar un tratamiento y así poder confirmar su seguridad.

JUSTIFICACIÓN

Las micropartículas magnéticas se están mejorando actualmente para ser utilizadas en varias aplicaciones biomédicas tales como soportes magnéticos para la administración de fármacos, agentes de contraste, o hipertermia magnética para el tratamiento del cáncer. Recientemente se ha estudiado la habilidad de las micropartículas de óxido de hierro (IOMP's) de producir fuertes magnetizaciones únicamente en presencia de un campo magnético, lo que las convierte en vehículos prometedores para diversas aplicaciones biomédicas (Villaraza AJL. *et al.* 2010). Específicamente como partículas acarreadoras con el fin de llevar su acción únicamente en el tejido diana. Sin embargo, las interacciones entre las partículas y los organismos no son todavía completamente controladas. En particular, el destino de las micropartículas administradas, así como su potencial toxicidad, son en gran parte desconocidos y por lo tanto merece ser explorado.

Uno de los retos actuales de la nanomedicina es determinar la biodistribución de micropartículas tras la administración sistémica, ya que existen una amplia variedad de factores que juegan un papel importante en la distribución, permanencia y eliminación de las micropartículas de óxido de hierro, como lo son el tamaño de la partícula, la carga de la partícula, sus propiedades magnéticas, así como su interacción con los componentes del organismo, etc., englobados bajo el concepto de biodistribución. Particularmente las micropartículas magnéticas presentan una fuerte dependencia del tamaño en la distribución y acumulación.

Por lo que resulta de vital importancia el estudio de la biodistribución y tiempo de expresión génica de esta clase micropartículas, con el fin de observar su transporte eficaz hacia el tejido deseado y evitar un efecto citotóxico indeseable en otros tejidos, y finalmente de esta manera abrir la posibilidad a un uso terapéutico adecuado de estas tecnologías.

HIPÓTESIS

Las micropartículas ADN/ Quitosán dirigidas bajo un campo magnético incrementan la expresión genética y presentan una biodistribución limitada hacia el sitio dirigido

OBJETIVO GENERAL

Determinar el tiempo óptimo de expresión génica y la biodistribución de micropartículas magnéticas acomplejadas con ADN/Quitósán dirigidas por campos magnéticos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Elaborar y caracterizar las micropartículas magnéticas ADN/Quitósán
- 2.- Determinar la CC50 de las micropartículas magnéticas ADN/Quitósán por MTT
- 3.-Determinar la concentración de Fe incorporado por las células y el tiempo óptimo de expresión del gen luciferasa posterior a la administración de las micropartículas magnéticas *in vitro*
- 4.-Analizar la biodistribución y expresión génica de las micropartículas magnéticas ADN/Quitósán *in vivo*

METODOLOGÍA

1.-Elaboracion y caracterización de los nanocomplejos

a) Purificación de los plásmidos pCEMLuc y pEGFP-N3 por maxiprep

Las cepas seleccionadas para estos ensayos fueron de *Escherichia coli* DH5 α , una que contenía el vector de pCEMLuc resistente a ampicilina y una segunda que contenía el vector de pEGFP-N3 resistente a kanamicina. Estas se inocularon para su posterior activación en 200ml de caldo LB con ampicilina y kanamicina [100 μ g/ml] respectivamente. El proceso de extracción fue realizado para cada plásmido de manera individual.

Estas incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm toda la noche y al día siguiente, se realizó la extracción de plásmido utilizando el Kit commercial “PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit” de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. (Figura 6)

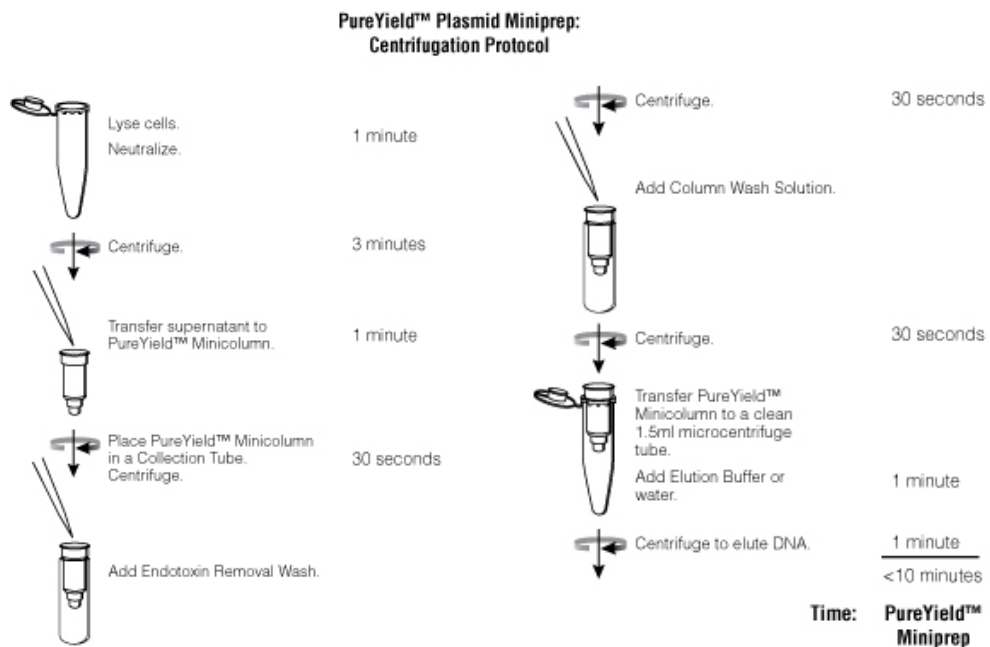


Figura 6. Extracción del plásmido. Protocolo utilizado para la extracción y purificación del plasmido de interés (Promega® 2016).

Al finalizar el proceso, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se resuspendió en 200µl de agua grado PCR. Los plásmidos purificados fueron cuantificados en nanodrop y caracterizados por electroforesis, posteriormente se almacenaron a -20°C, hasta su uso.

El plasmido pCEMLuc de 5 kb, posee la secuencia del promotor de hsp70 la cual funciona como elemento de respuesta a campos magnéticos, además posee una señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40), un gen de resistencia a ampicilina y el gen Luc que expresa la luciferasa, estructura que puede observarse en la Figura 7 (Alvizo Báez 2012).

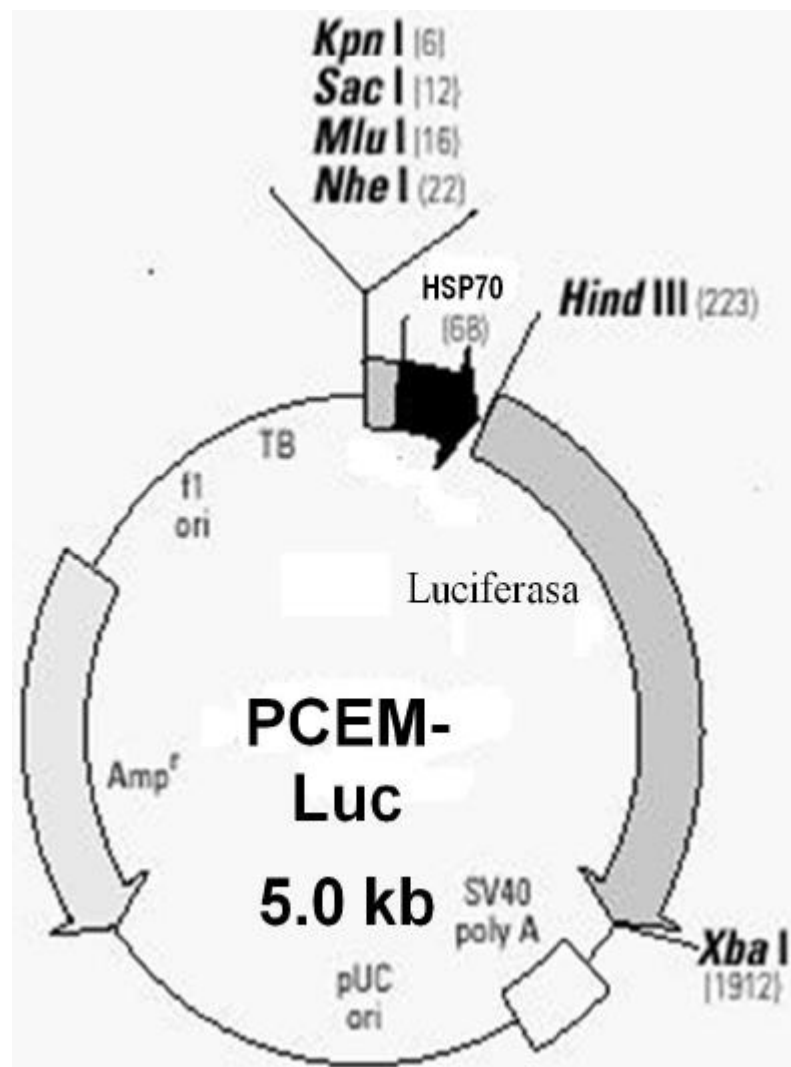


Figura 7. Mapa del Vector pCEMLuc. Mapa que muestra el tamaño del vector así como sus sitios de interés, como lo son sus sitios de restricción, su gen de resistencia a la ampicilina y su región sensible a campos magnéticos del gen de HSP70. (Alvizo Báez 2012).

b) Producción de Nanocomplejos de Quitosán con el plásmido pCEMLuc

Las nanocomplejos de quitosán fueron preparadas de acuerdo al procedimiento descrito por Calvo y cols., 1997, basado en la técnica de gelación iónica, en el cuál los grupos amino cargados positivamente del quitosán interactúan con los cargados negativamente del TPP. La formación espontanea de las nanopartículas ocurrirá debido a las uniones intra e intermoleculares entre las cargas positivas y negativas (Janes K. *et al.* 2001).

En un tubo Eppendorf por separado se agregaron 30 µl de la solución de quitosán [20 mg/ml] Posteriormente se fue agregando la solución de [TPP 0.86 mg/ml] a la solución de Quitosán por goteo en una agitación de 1000 RPM y se dejó incubando 1 hora, para el cálculo de los radios proporcionales se utilizó la formula descrita por Alvizo Báez en el 2012 (Figura 8).

$$\text{Quitosan} = \frac{(\text{Radio})(1)(\text{DNA})}{20\text{nM}} \quad \text{TPP} = \frac{\text{Quitosan}}{3}$$

Figura 8. Cálculo de radios proporcionales. Fórmulas utilizadas para calcular las cantidades de quitosán y TPP a utilizar en función del radio proporcional deseado. (Alvizo Báez 2012).

Después se agregaron en un tubo Eppendorf, 1 µl el plásmido [1 µg/ml] purificado en una proporción 1:60 con el quitosán, 1µl de nanopartículas de hierro CombiMag® (Oz Biosciences), 13µl de TPP en una relación de 1:3 con el quitosán y 15µl de PBS, para dar un volumen final de 30µl, esta solución se dejó incubando 15 min a 850 RPM. En la Figura 9 se esquematiza la forma final que alcanzan estos nanocomplejos.

Finalmente se midió la solución final al Zetasizer® para la obtención de su tamaño y su polidispersidad Para realizar esta medición se utilizó un volumen final de nanopartículas de 60µl, el cual se preparó aparte en solución de quitosán disuelto en agua a una concentración de 20 mg/ml y una solución de TPP a 0.86 mg/ml.

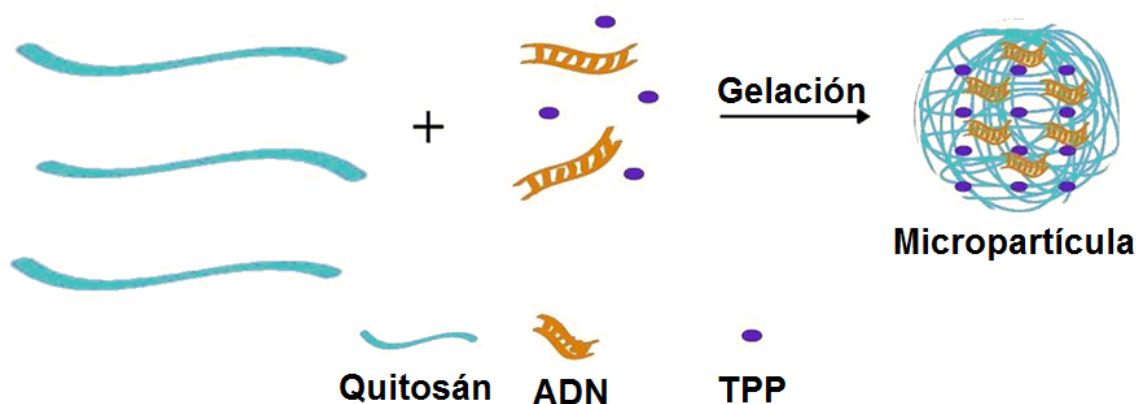


Figura 9. Gelación iónica. Esquemización de la formación de una micropartícula acomplejada ADN Quitosán por el método de gelación iónica

c) Ensayo de retención de los nanocomplejos y perfil de liberación de las micropartículas

Una vez sintetizadas las micropartículas se procedió a realizar un ensayo de retención del plásmido. En un gel de agarosa en una concentración al 0.8% en el cual se cargaron nanocomplejos a en ratios Quitosán/DNA de 1:20, 1:30, 1:40 y 1:60 y se realizó una electroforesis por 40 min. Posteriormente se reveló el gel en bromuro de etidio para finalmente observar la retención de los plásmidos por parte del nanocomplejo.

Para el ensayo de liberación se prepararon micropartículas a las diferentes proporciones antes mencionados se dejaron incubando en condiciones de temperatura ambiente a 600 RPM durante 1 hora, posteriormente se centrifugaron a 12,000 RPM de 15 a 20 min para tomar el sobrenadante y cuantificar la concentración del plásmido en el nanodrop. El proceso se realizó durante las primeras 5 horas y posteriormente se tomaron mediciones a las 24, 25, 48, 72, 96 y 120 horas. Finalmente los resultados se graficaron para obtener el perfil de liberación del plásmido.

2.- Determinación de la CC₅₀ de los plásmidos

Para determinar la CC₅₀ de cada plásmido se realizó un ensayo colorimétrico de viabilidad celular MTT. Para dicho ensayo se plaquearon células B16F10 en placas de 96 pozos, sembrando 3,000 células por pozo y utilizando 100µl de medio de cultivo DMEM en cada uno.

Las células se incubaron en las condiciones de 37°C, 5% de Humedad y 5% de CO₂, de 24 a 48 horas para alcanzar una confluencia aproximada del 80%, pasado este tiempo se retiró el medio de los pozos y se agregó medio nuevo. Posteriormente se agregaron las micropartículas en diferentes volúmenes (10µl, 20µl, 30µl, 40 µl, 50 µl y 60µl) a una concentración de plásmido 1 µg/ml, esto junto a medio de cultivo DMEM sin suero en un volumen final de 100µl.

Se dejaron incubando de 4 a 5 horas en las condiciones antes mencionadas para finalmente retirar el medio de cultivo y reemplazarlo con 100 µl medio de cultivo DMEM nuevo y con suero fetal bovino.

A las 48 horas posteriores a la transfección, se agregaron 20µl de MTT [5mg/ml] por pozo y las células se incubaron durante 45 min en las condiciones normales. Después de la incubación se retiró el MTT y se agregó 100µl de DMSO por pozo para detener la reacción.

La placa se midió a 540nm en lector de microplacas (Synergy 2, BioTek). Los resultados fueron graficados, y se calculó también la desviación estándar para determinar la CC₅₀ de cada volumen utilizado de plásmido.

3.- Determinación de la concentración de Fe incorporado por las células y el tiempo óptimo de expresión del gen luciferasa posterior a la administración de las micropartículas magnéticas *in vitro*

a).-Estandarización del volumen de transfección de las micropartículas

Para determinar el tiempo óptimo en el cual las nanopartículas eran captadas por las células, primero se llevaron a cabo ensayos de transfección de las micropartículas, para determinar el volumen óptimo de transfección. Se tomaron diferentes volúmenes de micropartículas recubiertas con DNA/quitosán (10µl, 20µl, 30µl, 40µl y 50µl) utilizando como gen reportero el plásmido pEGFP-N3 con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), previamente purificado y PEI como control positivo.

Se plaquearon células B16F10 en placas de 96 pozos y se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 85%. Una vez alcanzada esta confluencia las micropartículas fueron lavadas con PBS estéril y se agregaron los diferentes volúmenes de nanopartículas junto con medio DMEM con sin suero fetal bovino hasta alcanzar el volumen de 100µl, posteriormente se somete a 30 min bajo un campo magnético utilizando un magneto para placa de 96 pozos incluido en el kit de nanopartículas de CombiMag 500 de OZBiosciences®. Finalmente se retira el medio y se sustituye con medio con suero fetal bovino.

Para realizar la lectura del tiempo óptimo, la placa se observó a distintos tiempos (1 hr, 4 hr, 7hr y 24hr) bajo el microscopio de fluorescencia con el fin de observar la presencia o ausencia de la GFP en los diferentes tiempos.

b).- Curva estandar de la técnica de Azul de Prusia y determinación de Hierro de las micropartículas

Posteriormente se determinó la cantidad de hierro incorporado a las células por parte de las nanopartículas, para esto se realizó la prueba de azul de Prusia, en esta prueba se utiliza el reactivo de potasio de ferrocianida, el en presencia de un ambiente ácido libera el cianuro contenido en su estructura, el cual reacciona con el hierro presente durante la prueba formando un precipitado conocido como ferrocianuro férrico el cual resulta en una coloración azul característica de esta técnica.

Para la realización de una curva estándar, se colocan en una placa de 96 pozos 25 µl de diferentes concentraciones conocidas de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg/ml de Fe^{2+} se agregan 25 µl de HCl 6M y finalmente se hacen reaccionar con una solución de 50 µl de 5% de una solución de ferrocianida, dejando en agitación por un periodo de 3 a 4 horas.

Para el ensayo, las células B16F10 se colocan en una placa de 96 pozos y posteriormente se transfectan utilizando las micropartículas acomplexadas con el plasmido pCEMLuc, utilizando volúmenes de 10, 20, 30 y 40 µl de estos nanocomplejos. Después se agregaran 25 µl de HCl 6M y 50 µl de 5% de una solución de ferrocianida, dejando en agitación por un periodo de 3 a 4 horas.

La absorbancia de cada pozo será medida en un lector de placa a 680 nm y el promedio de las medidas de absorbancia se compararan con lo obtenido en la curva estándar para medir el contenido de hierro incorporado en las células.

c).-Determinación de Fe en las células, posterior a la administración de micropartículas ensayo de Azul de Prusia.

Una vez obtenida la curva de estandarización se procedió a realizar un ensayo *in vitro* para conocer la cantidad de hierro que se incorpora a la célula por parte de la micropartícula, ya que el volumen 30 µl ya que fue el que demostró eficiencia de transfección observable fue el único en ser tomado en cuenta, para este ensayo se realizó un ensayo de transfección con este volumen y se procedió a realizar el ensayo de azul de Prusia de la misma manera que en el punto anterior.

d).- Determinar el tiempo óptimo de expresión del gen reportero luciferasa acompañado a las nanopartículas *in vitro*.

En este ensayo se crecieron células B16F10 en placas de 96 pozos las cuales fueron transfectadas utilizando la metodología mencionada anteriormente para este ensayo, para esta prueba se utilizó como gen reportero el plásmido pCEM-Luc, el cual contiene el promotor para la proteína de HSP70 el cual sensible a campos magnéticos.

Debido a esto las células se sometieron a estimulación magnética durante 30 min y se dejaron incubando 24 horas. Una vez finalizada esta incubación, se eliminó el medio de cultivo de las partículas y las células se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS), se despegaron y retiraron las células de la placa destinadas a la medición de 12 horas y se colocaron en un tubo eppendorf estéril y posteriormente se realizó el análisis de la expresión de luciferasa mediante el uso del luminómetro (Synergy Luminometer HT 2) donde se utilizó el kit de ensayo de luciferasa E1501 de Promega®, para el resto de las células se sustituyó el PBS con medio de cultivo nuevo.

Posterior a 24 horas de incubación a cada uno de los tubos eppendorf se agregaron 100 µl del reactivo de lisis 1X dejándolo incubar por 10 minutos, posteriormente se tomaron 20µl de esta solución y se colocaron en tubos de ensayo junto con 100µl del sustrato del ensayo de luciferasa. Este se repitió a diferentes tiempos a las 24, 48, 60, 72 y 84 horas para así obtener el tiempo de expresion óptimo de este gen reportero.

4.-Analizar la biodistribución y expresión de las micropartículas magnéticas ADN/Quitósán *in vivo*.

a).- Inducción de tumor en ratones C57BL6/J

Para la determinación de la biodistribución y expresión del gen de luciferasa *in vivo*, se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J de aproximadamente 10 semanas de edad, con pesos comprendidos entre 25-30 gr por grupo, para esto se crearon 4 grupos de 3 ratones cada uno (n=12): el primer grupo comprendió al tratamiento con micropartículas magnéticas bajo el estímulo de un campo magnético, el segundo grupo consistió en el tratamiento con micropartículas en ausencia del estímulo magnético, mientras que el tercer grupo se compuso de la administración de el gel reportero pCEM-Luc acompañado de la aplicación del campo magnético, finalmente el último grupo representa al grupo control negativo bajo la administración de PBS.

Para esta prueba a todos los grupos les fue inducido de tumor, por lo que se cultivaron células de la línea B16F10 y se ajustaron para alcanzar una concentración de 2×10^6 /ml, estas se re-suspendieron en PBS y posteriormente se administraron por vía intraperitoneal. Se monitoreo el crecimiento de los tumores durante un periodo de 10-15 días posterior a la inoculación, hasta alcanzar el crecimiento del tumor aproximado a un tamaño de 2cm, los ratones fueron tratados de acuerdo a los protocolos y normas de bioética.

Una vez alcanzado este tamaño se sintetizaron las micropartículas recubiertas con quitósán/ADN en los ratios de 1:60 a una concentración de 50 µg del plásmido pCEM-Luc.

Las micropartículas se administraron por vena caudal a los ratones en un volumen de 100µl, estos ratones fueron inmovilizados utilizando un sujetador de acrílico para ratones atendiendo a los protocolos de bioética y se sometieron a la influencia del campo magnético utilizando un magneto con una intensidad de 3000 militeslas para pruebas *in vivo* incluido en el kit de nanopartículas CombiMag de OZBiosciences durante un periodo que indica el fabricante de 15 a 20 minutos, para el grupo control se realizó el mismo procedimiento esta vez sin utilizar el magneto.

El tercer grupo fue tratado con 100µl plasmido pCEMLuc desnudo a una concentración de 1µg/µl, mientras que el cuarto grupo el cual fue utilizado como control negativo únicamente le fue administrado 100µl de PBS.

Una vez cumplidas las 48 horas de su tratamiento los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se colectaron los siguientes órganos: Hígado, Bazo, Riñones, Pulmones, Corazón y Estómago, además los tumores fueron recolectados y pesados. Cada uno de estos órganos fue diluido y macerado en 500µl de HCL concentrado, finalmente las muestras fueron divididas para su posterior análisis tanto en la prueba de Azul de Prussia así como de luciferasa.

b).- Biodistribución de micropartículas *in vivo*

Para esta prueba se tomaron 100µl de cada dilución en placa de 96 pozos por triplicado. Después se agregaron 25 µl de HCl 6M y 50 µl de 5% de una solución de ferrocianida, dejando en agitación por un periodo de 3 a 4 horas.

La absorbancia de cada pozo será medida en un lector de placa a 680 nm y un promedio de 3 medidas de absorbancia se realizaron para medir el contenido de hierro en las muestras analizadas.

c).- Ensayo de expresión génica *in vivo*

Para la prueba de luciferasa *in vivo* se utilizó el kit de ensayo de luciferasa E1501 de Promega® para lo que se tomaron nuevamente 100µl del órgano macerado y diluido en 500 µl de NaOH y se colocaron un tubo Eppendorf por triplicado.

A cada uno de los tubos se agregaron 100 µl del reactivo de lisis 1X dejándolo incubar por 10 minutos, posteriormente se tomaron 20µl de esta solución y se colocaron en tubos de ensayo junto con 100µl del sustrato del ensayo de luciferasa.

Inmediatamente las muestras fueron leídas en el luminometro (Synergy Luminometer HT 2 BioTek®), finalmente se obtuvieron los resultados de los triplicados para así realizar el análisis de la expresión de luciferasa.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los gráficos fueron realizados utilizando el software estadístico GraphPad Prism 6®, agregando barras de desviación estándar para cada uno de los puntos.

Para los análisis de datos se llevaron a cabo las pruebas de ANOVA de dos vías para la comparación de medias de los distintos factores que afectan grupos experimentales a analizar y además de una prueba de Tukey para ver la diferencia entre cada uno de los factores en los grupos.

RESULTADOS

1.- Elaboración y caracterización de los nanocomplejos

a).-Purificación de los plásmidos pCEMLuc y pGFP-N3 por maxiprep

Los plásmido pCEMLuc y pGFP-N3 purificados de las cepas de *Escherichia coli* por medio de la técnica de maxiprep dieron como resultado 4 eluidos para cada uno de ellos, los cuales se pueden observar en el gel de agarosa al 1% (Figura 10), mientras que la concentración obtenida mediante el nanodrop de cada plásmidos se presenta en la Tabla 2.

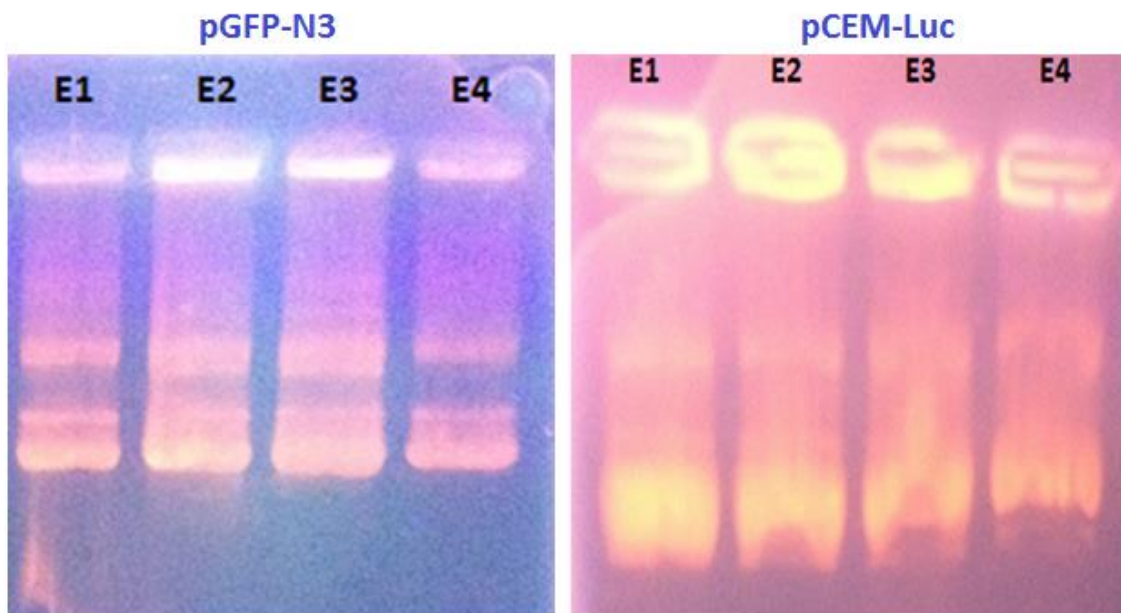


Figura 10. Purificación de plásmidos por maxiprep. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio . Cada eluido de los plasmidos pGFP-N3 y pCEM-Luc esta representado por una banda como E1 hasta E4.

Tabla 2. Concentraciones observadas al nanodrop para cada plasmido extraído.

Eluidos	pCEMLuc	GFP
Eluido 1	5335 ng/μl	1525 ng/μl
Eluido 2	8074 ng/μl	4345 ng/μl
Eluido 3	3128 ng/μl	2835 ng/μl
Eluido 4	1725 ng/μl	1335 ng/μl

b).-Ensayo de retención de los nanocomplejos

Tras la síntesis de los nanocomplejos utilizando diferentes radios proporcionales de ADN: Quitosán (1:20,1:30,1:40 y 1:60) y su posterior corrimiento en el gel, en éste se puede apreciar bandas de ADN en cada uno de los radios proporcionales indicando una pobre retención para los radios 1:20, 1:30 y 1:40 el ADN, mientras que para el carril correspondiente al radio 1:60 se observó una banda de baja intensidad en comparación al control (Figura 11).

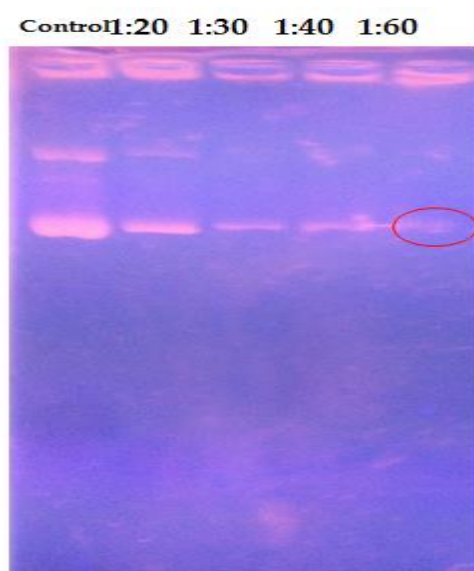


Figura 11. Prueba de retención del plásmido. Gel de electroforesis al 1% que muestra nanopartículas a los radios proporcionales ADN/Quitosan 1:20, 1:30, 1:40, 1:60 y el control correspondiente a plásmido no acomplexado.

Posterior a la selección del radio proporcional 1:60, se sintetizaron las micropartículas y fueron caracterizadas por tamaño. En la gráfica observada en la Figura 12 se pueden apreciar 3 picos principales los cuales corresponden al tamaño de la partícula detectado por el equipo, resultando en que los tamaños obtenidos tienen en promedio aproximado de 320.9 nm.

Además se puede apreciar que se obtuvo una Polidispersidad (PDI) aproximada de 0.342, por lo que se utilizaron estas nanopartículas para los posteriores experimentos.

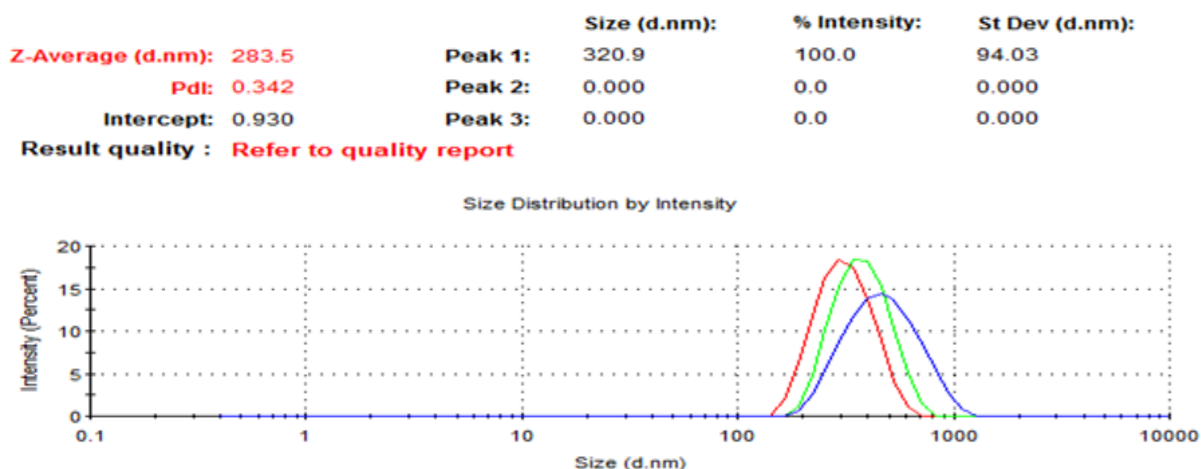


Figura 12. Curvas de tamaño y polidispersidad de las micropartículas. La intensidad de señal reconocida por el equipo indica el tamaño de la partícula para cada una de las mediciones durante las 3 repeticiones.

c).-Perfil de liberación de las micropartículas

La cuantificación de plásmido liberado por las micropartículas a distintos tiempos fue determinada por nanodrop y los resultados se presentan en porcentaje en la siguiente gráfica (Figura 13) donde se puede apreciar una liberación al tiempo 0 del 0.6% inmediato a su síntesis. Hasta las 2 horas es cuando se puede observar el primer pico donde se obtiene un 16.2% de liberación, y el 50% puede ser observado a las 24 horas después de su síntesis. El 100% de liberación se pudo observar hasta después de 120 horas después de la síntesis de las micropartículas

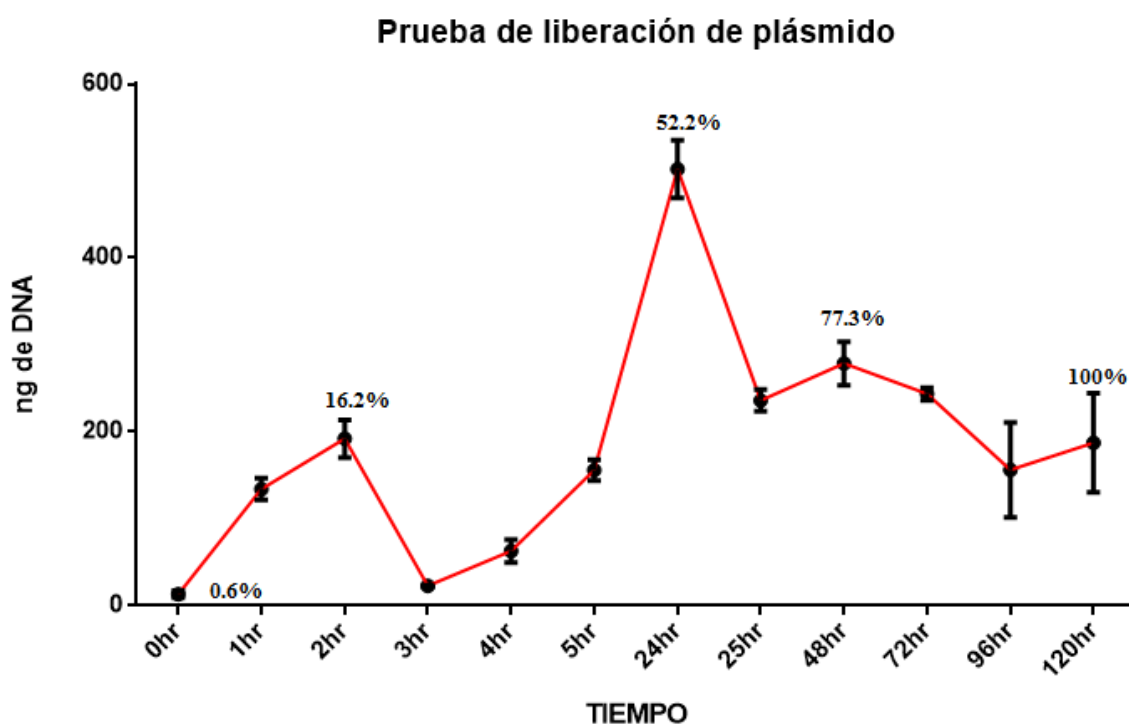


Figura 13. Ensayo de liberación del plásmido. Patrón de liberación de plásmido, los picos representativos muestran el porcentaje de DNA liberado a las 0, 2, 24, 48 y 120 hrs.

2.- Determinación de la CC50 de las micropartículas

La viabilidad celular una vez aplicados los nanocomplejos, se muestra en la siguiente grafica (Figura 14) encontrando que al aplicar de 10 a 20 μl de micropartículas obtenemos de un 80 a 90% de viabilidad y un 50% de viabilidad al aplicar cantidades cercanas a los 60 μl . Y se calcula una CC50 en el volumen de 60.14 μl de micropartículas, por lo que para posteriores ensayos se utilizaron cantidades desde 10 hasta 50 μl de micropartículas.

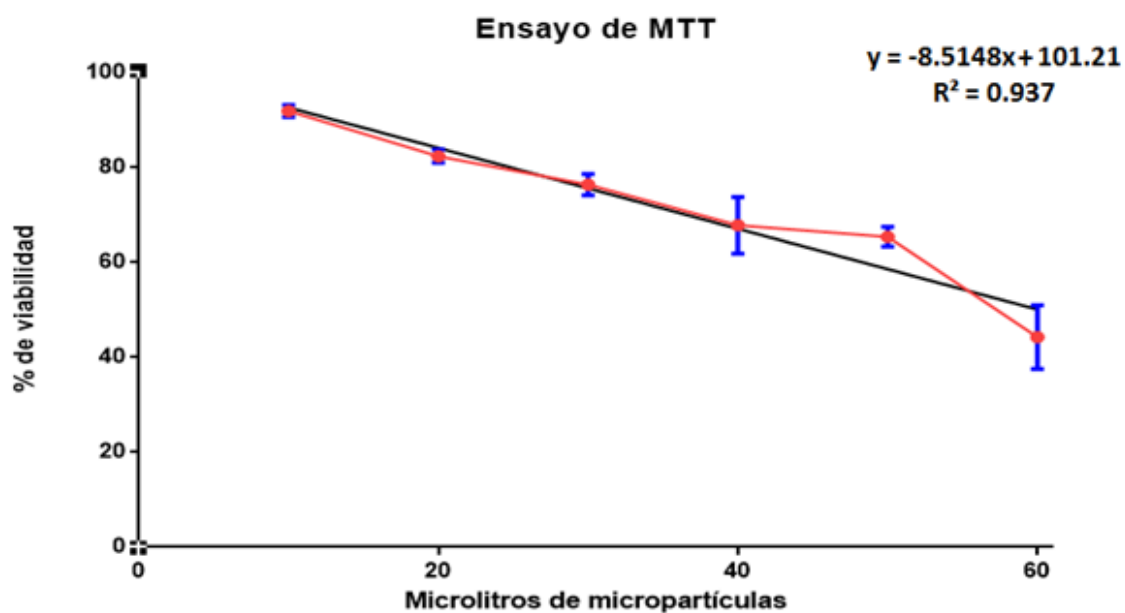


Figura 14. Ensayo de viabilidad por MTT. La grafica presenta la viabilidad de las células B16F10 tras la aplicación de diferentes volúmenes de 10 a 60 μL de micropartículas.

3.- Determinación de la concentración de Fe incorporado por las células y el tiempo óptimo de expresión del gen luciferasa posterior a la administración de las micropartículas magnéticas *in vitro*

a).-Estandarización del volumen de transfección de las micropartículas

En la transfección de células con micropartículas acompañadas con plásmido pEGFP-N3, se obtuvo fluorescencia emitida de las células solo a las 24 hrs utilizando diferentes volúmenes de nanocomplejos, en los tratamientos con 10 μ l, 20 μ l, 40 μ l, y 50 μ l se observa una baja detección de la proteína verde fluorescente, indicando una pobre transfección. Solo en el tratamiento con 30 μ l se muestra una transfección del 50% aproximadamente en comparación con el control o transfección con PEI (Figura 15)

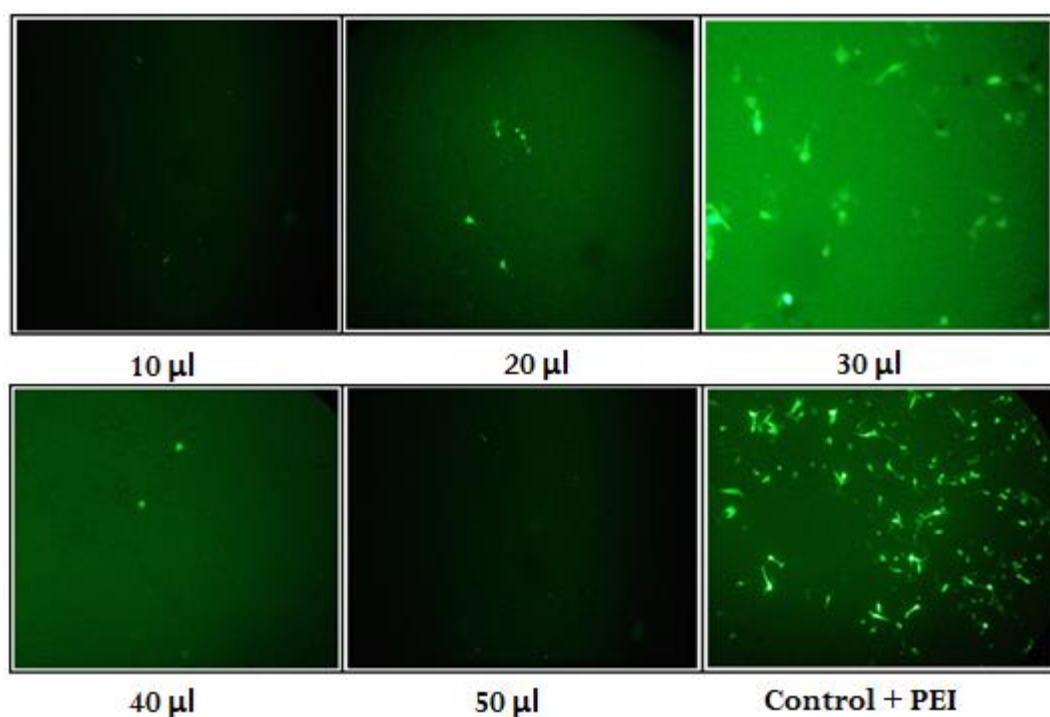


Figura 15. Ensayo de transfección. Fluorescencia emitida por las células B16F10 al ser transfectadas utilizando 10, 20, 30, 40 y 50 μ L de micropartículas acompañadas DNA/Quitósán o PEI como control positivo.

b).- Curva estandar de la técnica de Azul de Prusia y determinación de Hierro de las micropartículas

Para la estandarización de la técnica Azul de Prusia se obtuvo una curva con medidas de hierro estándar la cual se puede observar en la siguiente gráfica, donde se muestra la absorbancia de las diferentes concentraciones conocidas de Hierro de 10 a 70 µg (esquematizada de color azul), posteriormente la técnica se realizó con micropartículas a diferentes volúmenes de 10 a 40 µl (color rojo) con el fin de determinar el hierro contenido en estas últimas. La comparación nos muestra una cantidad de hierro de 10 µg de hierro en 10 µl de micropartículas, teniendo así aproximadamente 1 µg de hierro por cada microlitro de micropartículas (Figura 16).

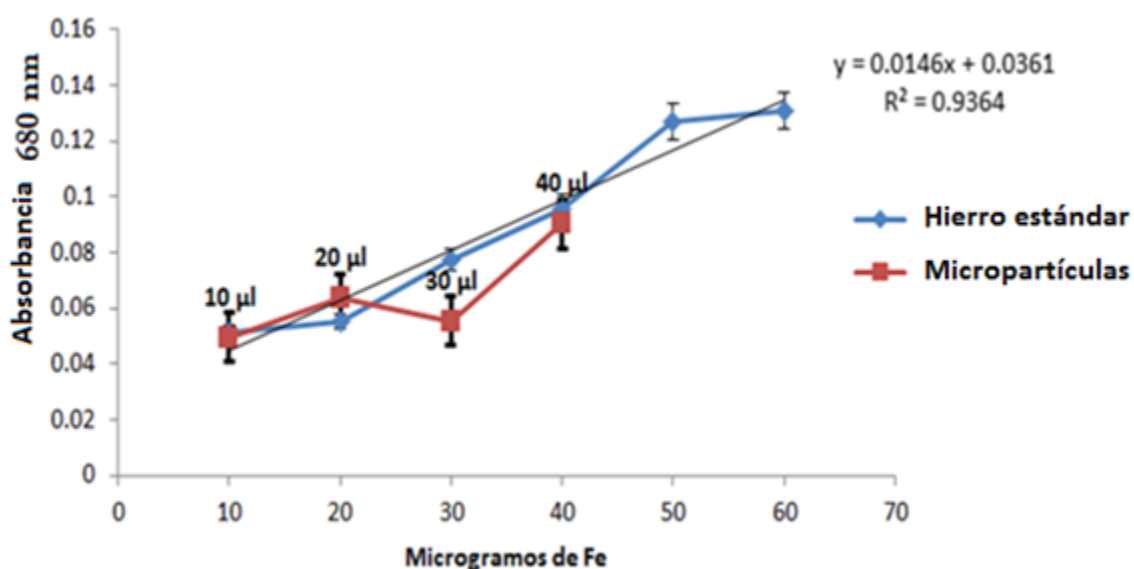


Figura 16. Ensayo de azul de Prusia de las micropartículas. Curva comparativa entre la la curva estándar de Fe contra los diferentes volúmenes de micropartículas.

c).-Determinación de Fe en las células, posterior a la administración de micropartículas ensayo de Azul de Prussia.

Mediante la técnica de Azul de Prussia se determinaron de 25 microgramos de hierro en las células control, y una cantidad de 40 microgramos en las células transfectadas con 30 μ l de micropartículas, por lo que se puede estimar que se incorporaron a las células 15 microgramos de hierro, posteriores al tratamiento bajo estimulación magnética de 30 min. (Figura 17).

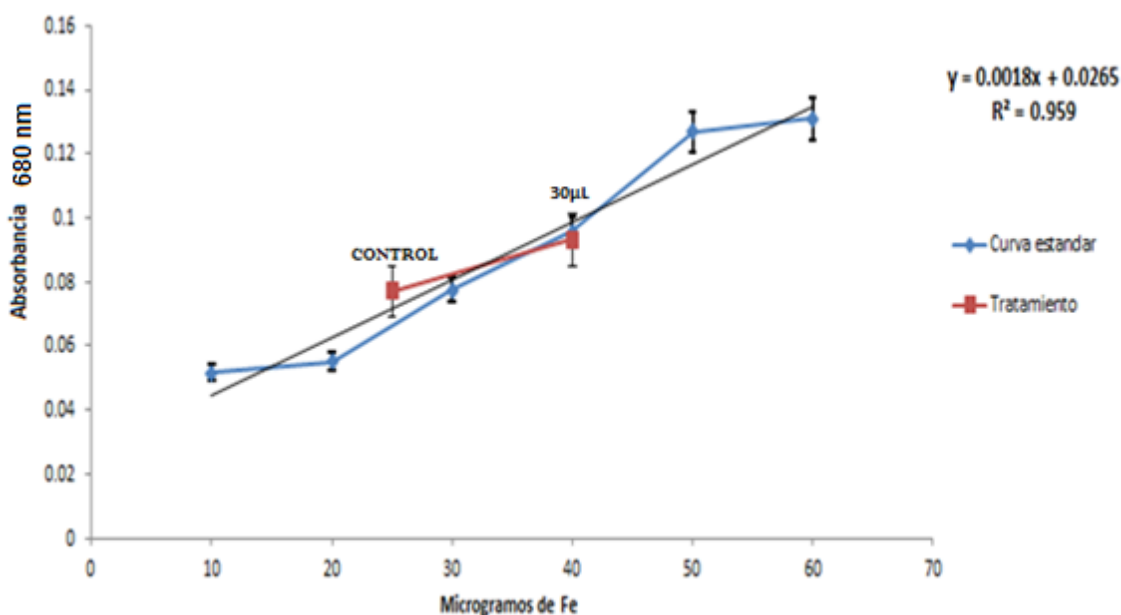


Figura 17. Ensayo azul de Prussia en células transfectadas. Curva de azul de Prussia done se comparan la curva de hierro estándar y concentración de Fe de celulas transfectadas con 30 μ l micropartículas y celulas sin tratar (control).

d).- Determinar el tiempo óptimo de expresión del gen reportero luciferasa acomplejado a las nanopartículas *in vitro*.

La expresión de luciferasa posterior a la transfección con micropartículas magnéticas muestra una baja expresión del gen desde las 36 hrs en los tres volúmenes de micropartículas empleados, sin embargo éste se incrementó a niveles considerables a las 48 hrs, alcanzando su pico máximo a las 60 hrs y decreciendo posteriormente. El tiempo determinado para la óptima expresión del gen fue de 60 hrs con un volumen de 50 μ l (Figura 18). El análisis estadístico de los resultados se presenta en la Tabla 3 y 4 (ANOVA de 2 vías y prueba de Tukey).

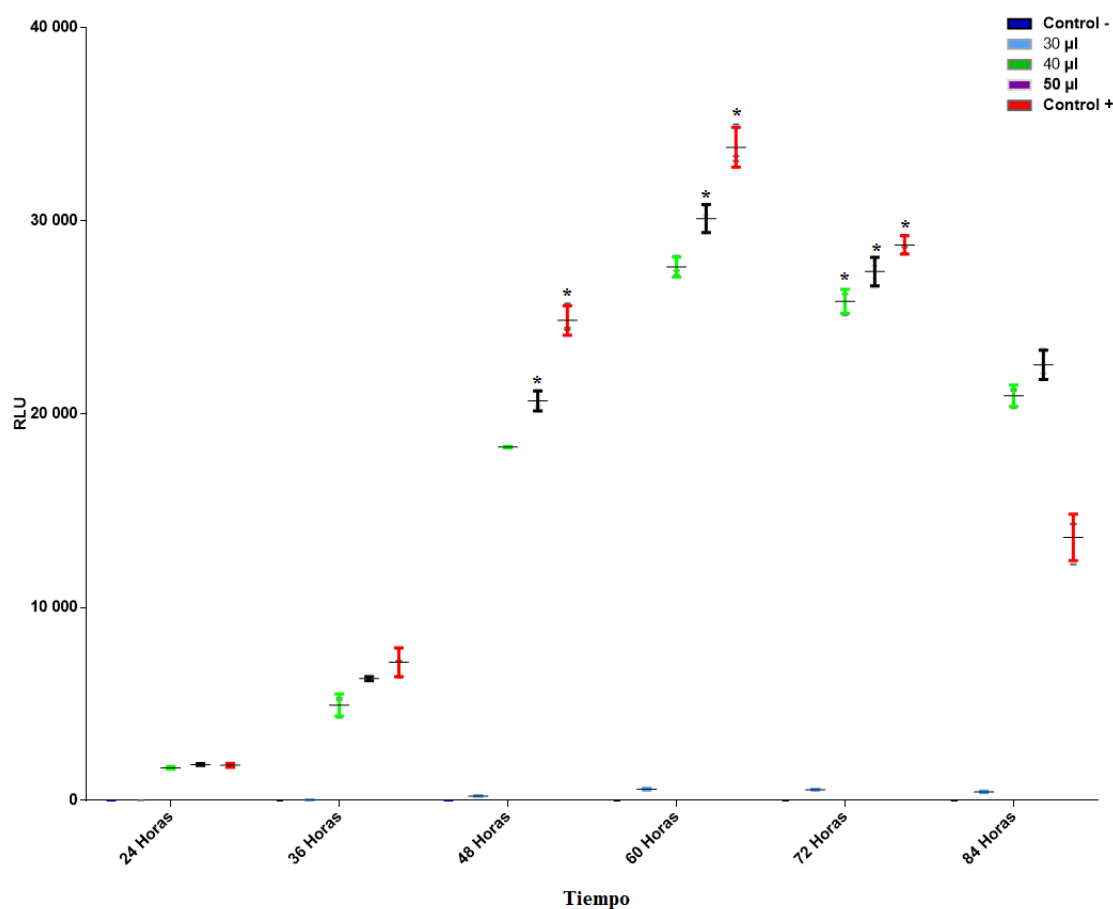


Figura 18. Análisis de la expresión génica de las micropartículas *in vitro*. Expresión del plásmido de pCEMLuc posterior a su transfección de 24hrs a 84hrs en intervalos de 12 horas. El control negativo y el tratamiento con 30 μ l son apenas apreciables en la gráfica.

Tabla 3. Anova de 2 vías para la expresión *invitro* del gen reportero

ANOVA de 2 Vías			
	% total de variación	Valor de P	Significancia
Volumen	19.97	< 0.0001	Si
Horas	28.05	< 0.0001	Si
Interacción	51.88	< 0.0001	Si

Tabla 4. Prueba de Tukey para la expresión *invitro* del gen reportero

Prueba de Tukey para comparaciones múltiples			
	Diferencia de medias	q	Diferencia Significativa
Control - vs. 30 µl	-307	4	No
Control - vs. 40 µl	-16549	225	Si
Control - vs. 50 µl	-18147	246	Si
Control - vs. Control +	-18333	249	Si
30 µl vs. 40 µl	-16242	221	Si
30 µl vs. 50 µl	-17840	242	Si
30 µl vs. Control +	-18026	245	Si
40 µl vs. 50 µl	-1598	22	Si
40 µl vs. Control +	-1784	24	Si
50 µl vs. Control +	-186	3	No

4.-Analizar la biodistribución y expresión de las micropartículas magnéticas ADN/Quitosán *in vivo*.

a).- Inducción de tumor en ratones C57BL6/J

La determinación de la expresión génica y biodistribución de las micropartículas se analizó en un modelo tumoral utilizando ratones de la cepa C57BL6/J, en los cuales posterior a la inoculación con células de melanoma murino B16F10, se pudo observar el crecimiento del tumor aproximadamente a los 15 días (Figura 19). Posterior al sacrificio de los ratones dichos tumores fueron extraídos y pesados, los resultados se muestran en la tabla 5.

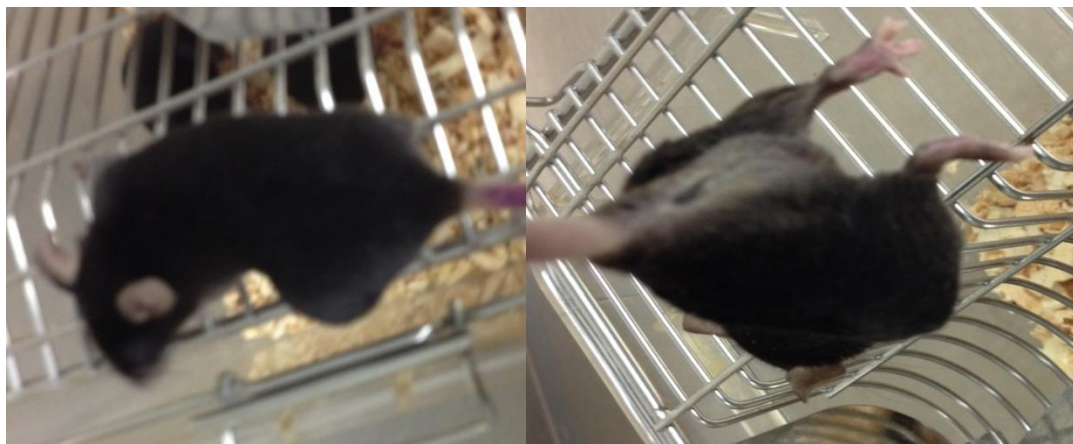
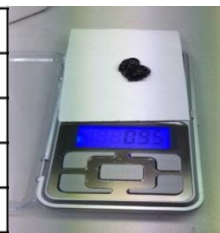


Figura 19. Fotografías del tumor inducido en ratones B16F10

Tabla 5. Pesos obtenidos de los tumores para cada ratón. Peso del tumor en gramos.

Peso Tumor	Raton 1	Raton 2	Raton 3
Grupo 1	0.95	0.94	1.02
Grupo 2	0.81	0.67	0.64
Grupo 3	1.05	0.79	0.93
Grupo 4	1.08	1.39	0.59



b).- Biodistribución de micropartículas *in vivo*

La cuantificación de micropartículas *in vivo* se determinó mediante el ensayo de azul de Prussia, las absorbancias obtenidas de cada órgano se muestran en la siguiente figura donde se puede observar un incremento significativo en la absorbancia en órganos como hígado y bazo, a demás del tumor (Figura 19).

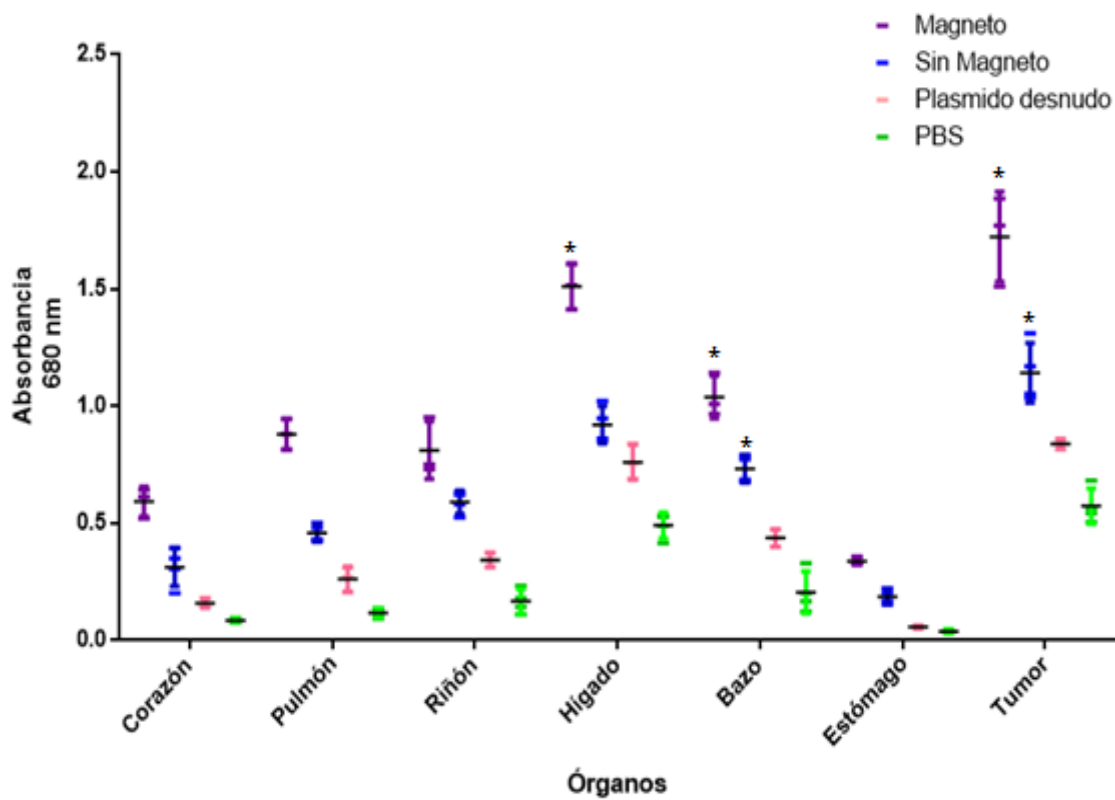


Figura 20. Ensayo de Azul de Prussia *in vivo*. Absorbancias mostradas en diferentes órganos posterior a la administración de micropartículas.

Tabla 6. Anova de 2 vías para la prueba de Azul de Prussia en órganos

Anova de 2 Vías			
	% total de variación	Valor de P	Significancia
Volumen	5.71	< 0.0001	Si
Horas	51.98	< 0.0001	Si
Interacción	41.93	< 0.0001	Si

Tabla 7. Prueba de Tukey para la prueba de Azul de Prussia *in vivo*

Prueba de Tukey para comparaciones múltiples			
	Diferencia de Medias	q	Diferencia Significativa
Magneto vs. Sin Magneto	0.4	20	Si
Magneto vs. Plasmido desnudo	0.6	30	Si
Magneto vs. PBS	0.7	41	Si
Sin Magneto vs. Plasmido desnudo	0.2	12	Si
Sin Magneto vs. PBS	0.4	23	Si
Plasmido desnudo vs. PBS	0.2	9	Si

Las absorbancias obtenidas para cada uno de los órganos se compararon y extrapolaron con la curva de estandarización de esta técnica para obtener las concentraciones de hierro expresadas en μg de Fe incorporado en cada órgano, y por lo tanto la biodistribución de éstas. En los resultados se puede observar una diferencia significativa entre los tratamientos en los que fueron utilizados los microcomplejos comparado con tratamientos donde no fueron utilizados como plasmido solo y PBS. También se puede observar una incremento de 10 a 40 μg de Fe de diferencia en la acumulación de micropartículas en los tratamientos donde se aplicó una estimulación magnética. Los órganos que demostraron una mayor concentración de hierro en todos los casos fueron el hígado y bazo quedando por debajo del tumor el cual fue el sitio que concentró la mayor cantidad de hierro en todos los tratamientos con valores de 69 μg . Los órganos como el corazón y el estómago que muestran concentraciones inferiores en la mayoría de los tratamientos, muestran una concentración máxima de 24 μg y 12 μg respectivamente (Figura 20).

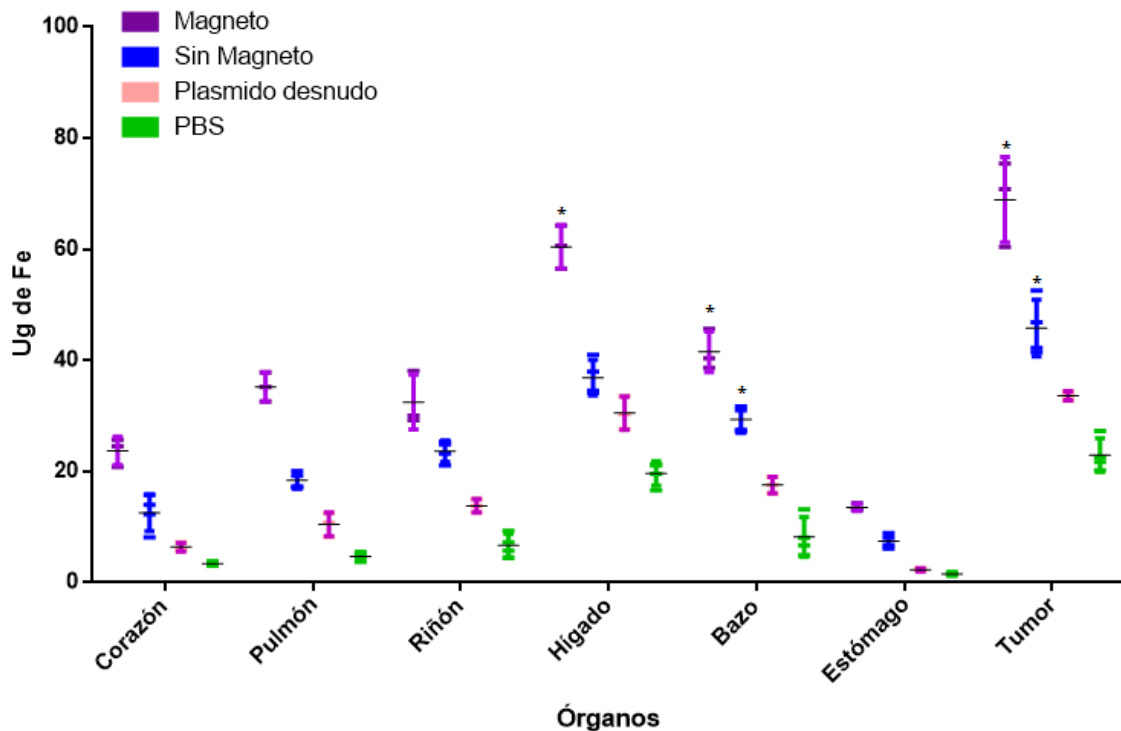


Figura 21. Biodistribución de micropartículas en órganos. Concentración de Fe encontrada mediante el ensayo de azul de Prussia en diferentes órganos.

c).- Ensayo de expresión génica *in vivo*

La expresión del gen pCEM-Luc para cada uno de los órganos, se puede observar que existe una expresión incrementada de aproximadamente 4 veces del gen de luciferasa en los órganos cuando fue utilizado la influencia del campo magnético comparados con aquellos en los que no fue utilizado, siendo estos valores menores a la expresión obtenida cuando se utiliza el plasmido desnudo. La mayor expresión génica se encontró en el tumor con valores arriba de los 20,000 URL (Figura 21).

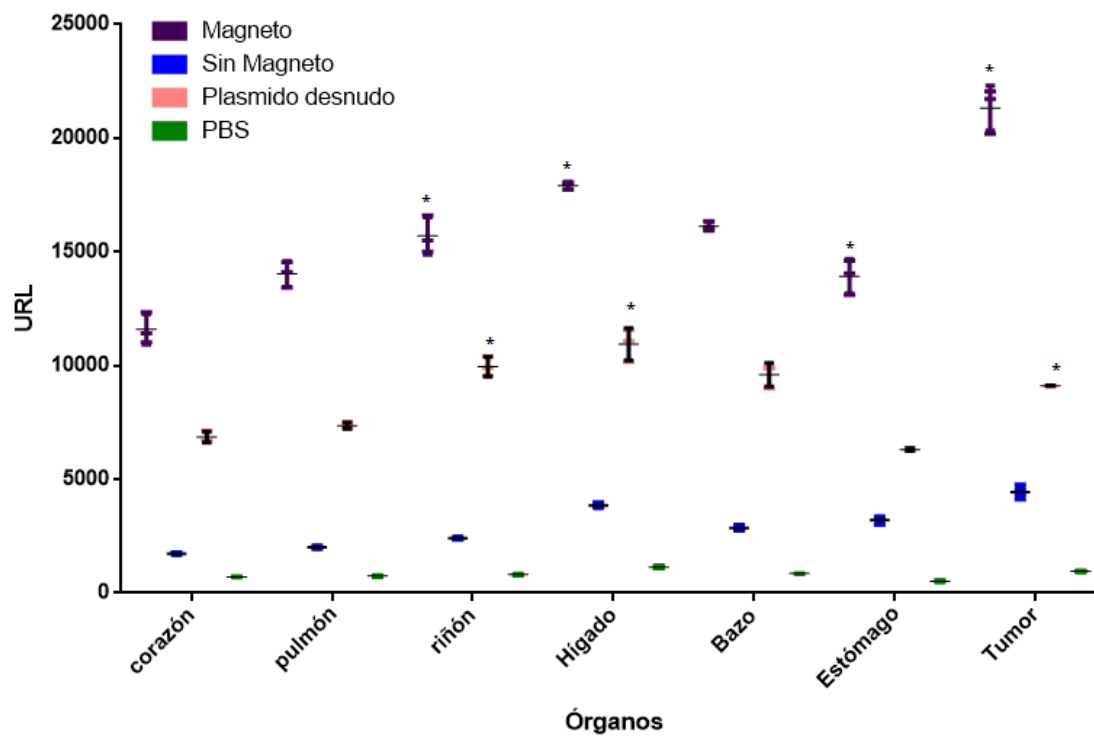


Figura 22. Ensayo de expresión del génica de las micropartículas in vivo.
 Expresión del plásmido pCEMLuc en diferentes órganos posterior a la administración de micropartículas.

Tabla 8. Anova de 2 vías para la prueba de expresión de luciferasa en órganos

Anova de 2 Vías			
	% total de variación	Valor de P	Significancia
Órganos	3.695	< 0.0001	Si
Tratamientos	4.484	< 0.0001	Si
Interacción	92.27	< 0.0001	Si

Tabla 9. Prueba de Tukey para la prueba de expresion de luciferasa *in vivo*. La tabla muestra si hay o no diferencia significativa entre cada órgano para cada tratamiento

	Magneto	Sin Magneto	Plasmido desnudo	PBS
Corazón vs. pulmón	Si	No	No	No
Corazón vs. riñón	Si	No	Si	No
Corazón vs. Hígado	Si	Si	Si	No
Corazón vs. Bazo	Si	Si	Si	No
Corazón vs. Estómago	Si	Si	No	No
Corazón vs. Tumor	Si	Si	Si	No
Pulmón vs. riñón	Si	No	Si	No
Pulmón vs. Hígado	Si	Si	Si	No
Pulmón vs. Bazo	Si	Si	Si	No
Pulmón vs. Estómago	No	Si	Si	No
Pulmón vs. Tumor	Si	Si	Si	No
Riñón vs. Hígado	Si	Si	Si	No
Riñón vs. Bazo	No	No	No	No
Riñón vs. Estómago	Si	Si	Si	No
Riñón vs. Tumor	Si	Si	No	No
Hígado vs. Bazo	Si	Si	Si	No
Hígado vs. Estómago	Si	No	Si	No
Hígado vs. Tumor	Si	No	Si	No
Bazo vs. Estómago	Si	No	Si	No
Bazo vs. Tumor	Si	Si	No	No
Estómago vs. Tumor	Si	Si	Si	No

DISCUSIÓN

Debido a que la biodistribución de las nanopartículas depende de múltiples factores, uno de los primeros aspectos a revisar en estos sistemas es la retención del plásmido de ADN por parte de las nanopartículas, buscando que la liberación no sea inmediata y la nanopartícula pueda retener el plásmido hasta llegar a su sitio de interés. Para esto se sintetizaron nanopartículas a diferentes radios proporcionales de ADN/Quitósán.

Las nanopartículas a base de quitósán se forman de acuerdo a una aproximación debido a sus cargas, dando como resultado procesos de auto-asociación o entrecruzamiento. En esta reacción el quitósán es una molécula catiónica que presenta carga positiva el cual proporciona una carga neta final positiva a toda la partícula. Mientras que la molécula del plásmido presenta una carga negativa (Nelson DL y Cox MM 2001).

En estas nanopartículas o nanoesferas cargadas de manera positiva el plásmido de interés puede ser ligado o asociado a la matriz polimérica mediante atracción de cargas (Goycoolea *et al.* 2009). Por lo que una mayor concentración de quitósán conlleva a una mayor cantidad de grupos cargados en la superficie que pueden asociarse al ADN. Siendo este fenómeno lo observado en nuestros resultados, ya que los nanocomplejos que presentaron mejor capacidad de retención fue el del radio proporcional 1:60.

Otro de los parámetros importantes a evaluar fue la capacidad de liberación del plásmido, nuestros resultados muestran una capacidad de liberación de hasta el 50% a las 24 horas y el 100% hasta las 120 horas. Vila, A. *et al.* (2004) obtuvieron valores similares de un 50 al 60% de liberación a las 24 horas, en este trabajo realizado por Vila mencionan que la capacidad de carga y la estabilidad se ven principalmente afectadas por el peso molecular del quitósán, la solubilidad, el punto isoeléctrico de las moléculas y la carga teórica de éstas afectadas principalmente por el pH. Lo cual nos muestra una buena estabilidad de nuestro sistema dentro de sus primeras horas, así como de una liberación prolongada.

Un factor importante que este se encuentra altamente relacionado con la biodistribución de estos nanomateriales es el tamaño de las nanopartículas. Kim, B.G. y Kang, I.J. (2006) comentan que en general para el procedimiento de gelación iónica, el tamaño de

partícula en este sistema se ha observado varía en un rango de 100 a 350 nm; e invariablemente poseen una morfología esférica de acuerdo a evidencia de microscopía de transmisión electrónica y de fuerza atómica, concordando con el rango dentro del cual efectivamente entran nuestras partículas, las cuales presentaron un tamaño aproximado de 320 nm.

Muchos materiales utilizados en la producción de nanopartículas para el uso como vectores han sido reportados por tener una buena eficiencia pero una alta toxicidad, son debidos a esto que se ha utilizado el quitosán por sus numerosas cualidades para su biocompatibilidad. En nuestro ensayo se obtuvo una CC50 de 60.14 μ l en B16F10, Artursson, P. *et al.* (1994) ha reportado que a pesar de las características del quitosán como lo son mucoadhesividad, biocompatibilidad, inmunoestimulación, entre otras, este polisacárido presenta una “baja toxicidad” la cual puede verse reflejada en nuestro trabajo.

Una vez realizados todos estos ensayos de síntesis y caracterización de nuestras nanopartículas se procedió a las pruebas *in vitro*, en los resultados tras 24 horas de la transfección con el gen reportero para la GFP podemos observar que existió una pobre expresión de este gen cuando utilizamos volúmenes de 10, 20, 40 y 50 μ l, el volumen de transfección que fue más eficiente es el de 30 μ l de micropartículas comparado con el control. En relación a estos resultados Csaba *et al* (2009) realizaron un trabajo donde estudiaron el porcentaje de DNA asociado a nanopartículas de Quitosán/TPP, en este estudio se trabajaron con transfecciones *in vitro* en células HEK293 utilizando porcentajes de 5,10 y 20% de DNA en comparación con la concentración del quitosán utilizado en el sistema.

En este trabajo se reportó que existe una mayor transfección al utilizarse una mayor cantidad de DNA aun y cuando se mantiene la cantidad de quitosán utilizado. Además se reportan resultados de una mejor eficiencia en la transfección al aumentar el porcentaje del DNA y disminuir la concentración del Quitosán, atribuyendo esto a una mayor cantidad de DNA asociado a las nanopartículas de quitosán, el cual puede relacionarse con nuestros resultados de 10 μ l y 20 μ l al poseer una menor concentración de DNA comparado a los demás ensayos.

Complementario a esto Casagrande *et al.* 2014, trabajaron con ensayos para probar la estabilidad de las micropartículas Quitosán/TPP ante diversas situaciones, uno de los puntos más resaltables en este trabajo es el hecho de que se encontro que pueden formarse precipitaciones en los pocillos de las placas de ELISA posterior a unas horas de transfección. La autor explica que el comportamiento se debe a las cargas de superficie de las nanoparticulas que provoca la agregación de estas. El trabajo sugiere que el proceso de transfección se presenta durante las primeras horas previo al proceso de agregación de estos nanocomplejos y que dicho proceso dificulta los ensayos de transfección. Esto puede relacionarse con nuestros ensayos de 40µl y 50µl donde a mayor cantidad de quitosán, mayor y más rápido el proceso de agregación y en consecuencia una deficiente transfección.

En cuanto a los estudios concernientes a la incorporación de hierro a las células Paula J Foster *et al.*,(2008) realizaron estudios para determinar la cantidad de hierro incorporado en células tumorales de la línea B16F10 tras la exposición de diferentes volúmenes nanopartículas con núcleo de hierro, en este estudio se utilizó la técnica de Plasma inducido acoplado por sus siglas en ingles ICP para tener una mayor sensibilidad en la detección de hierro intracelular, determinando en promedio una concentración de 35 picogramos de hierro por célula posterior a 20 horas de su exposición, dando un total de 35µg de hierro para 1 millón de células. Estos valores se asemejan a los obtenidos en nuestros ensayos en los cuales se pudo determinar una cantidad de 15 µg de hierro en 3,000 células B16F10 expuestas a 30 µl de nanoparticulas, cabe mencionar que este volumen es el que nos dio mejores resultados en transfección.

Con respecto al tiempo óptimo de expresión *in vitro*, en tiempos menores a 24 horas posteriores a su transfección, no se detectó expresion del gen reportero EGFP. Casagrande *et al.* 2014 logro encontrar tiempos óptimos de transfección a partir de las 4 horas utilizando un sistema de Quitosán/TPP, Zheng *et al.* 2013 quien generó un sistema a partir de Quitosán y trimetil-arginina obtuvo tiempos óptimos de transfección de 12 horas, sin embargo en estos trabajos se comenta que este tiempo varía dependiendo de la estabilidad del sistema y depende directamente del tiempo en que el sistema se tarde en liberar la mayor cantidad de ADN.

La biodistribución de nanopartículas es influenciada por una variedad de factores, estos incluyen la ruta de administración, las propiedades de la nanopartícula y el ambiente fisiológico en el que las nanopartículas son introducidas. En una revisión realizada por Almeida M. *et al.* (2011), se estudia el efecto que tiene el tamaño de la nanopartícula en su distribución en órganos, siendo este uno de los factores más determinantes.

Esto es debido al endotelio vascular y la capacidad de impedir que las nanopartículas puedan atravesarlo, primeramente el endotelio del pulmón así como del tejido muscular posee una morfología continua que principalmente solo permite pequeñas moléculas de ser transportadas a través de la pared capilar (<3 nm), en el caso de nanopartículas de aproximadamente 60 nm se ven involucrados capilares fenestrados y endotelio discontinuo el cual está asociado con espacios de poro más grandes, siendo este tipo de capilares más abundantes en el tejido renal y para el bazo los espacios inter-endoteliales tienen un aproximado de 200 nm el cual permite una mayor entrada de nanopartículas. (Almeida M. *et al.* 2011).

Un fenómeno que además debe ser considerado en el caso de moléculas de mayor tamaño es el de adsorción de proteínas en su superficie, el cual es importante para el destino de los nanomateriales. La adsorción de proteínas específicas que actúan como opsoninas, ayudan a células como los macrófagos a reconocer y rápidamente captar a estos materiales. Estas células fagocíticas se encuentran al rededor del cuerpo, pero principalmente forman parte del sistema retículo endotelial (RES), al ser el hígado uno de los mayores componentes del RES que tiene como consecuencia una acumulación de partículas mayores a 200 nm en este órgano (Longmire M. *et al.*, 2008).

Siendo el tamaño de nuestra nanopartícula de 320 nm, estos antecedentes pueden explicar primeramente los resultados obtenidos donde el hígado demuestra una mayor captación de hierro al ser uno de sus principales órganos involucrados en su metabolismo seguido del bazo y teniendo una menor biodistribución en corazón, pulmón, estómago y riñón.

Otra manera de explicar la manera en que entran algunas partículas a las células y alojarse en los diferentes órganos, es mediante los sistemas de transporte a través por los

cuales ingresan. La endocitosis es un proceso altamente regulado, Mayor S. *et al.* (2007) describe la captación por parte de las células de partículas < 500 nm es mediante el proceso conocido como pinocitosis utilizando mecanismos como la macropinocitosis, endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolina y endocitosis independiente de clatrina y caveolina. Mientras que de partículas de mayor tamaño (> 500 nm) son captados principalmente por fagocitosis.

Cabe señalar que el hierro introducido de manera intravenosa sigue la ruta metabólica que sigue el hierro de manera natural en el organismo (Hamed Arami *et al.* 2015), además que la distribución observada para los órganos control corresponde a los órganos involucrados en el metabolismo del hierro. Al inicio de esta ruta metabólica el hierro ingerido en la dieta es transportado inmediatamente hacia el intestino delgado, mientras que el hierro del musculo es acumulado en forma de mioglobina siendo estos los órganos con una menor concentración, siendo el hígado el principal órganos de almacén para estas rutas metabólicas, mostrando así una mayor concentración de hierro (C. Guitón *et al.* 2011)

En el trabajo realizado por Hamed Arami *et al.* (2015) se menciona que los tumores al tener un rápido crecimiento requieren nuevos vasos sanguíneos o redirigir los vasos existentes adyacentes al tumor, esto provoca endotelio anormal fenestrado al rededor del tumor y que son altamente permeables a las nanoparticulas. Además estos capilares carecen de drenaje linfático lo cual produce un proceso único conocido como aumento de la permeabilidad y retención, EFR por sus siglas en inglés, el cual es de gran utilidad para los sistemas de transporte de nanoparticulas.

Estos poros inter-endoteliales pueden ser tan largos como algunos micrómetros y pueden variar dependiendo del tipo de tumor (K. Cho *et al.* 2008), sin embargo, el tamaño deseado de nanopartícula puede ser variable, esto con el propósito de evitar al sistema fagocitico mononuclear (MPS) y la eliminación renal. R. Ranganathan *et al.* 2012, sugiere tamaños en un rango de 50 a 600 nm, donde un tamaño menor a 50 nm puede evadir eficientemente al MPS pero su duración sanguínea es menor debido a la eliminación renal, mientras que nanoparticulas de tamaños mayores a 200 nm a pesar de

que pueden retenerse adecuadamente en los tumores estos son blanco de células del sistema MPS.

Además, es importante comentar que la entrada a través de los diferentes tamaños de poro endotelial para las diferentes situaciones, se ve beneficiada la entrada de las nanopartículas gracias a la atracción magnética siendo los órganos con mayor poro en los que se observa una mayor entrada (Hamed Arami *et al.* 2015), S. D. Perrault *et al.* (2009) agrega que nanopartículas pequeñas (< 20 nm) pueden penetrar fácilmente en el área peri vascular de los órganos, pero tienen menor tiempo de retención debido a fuerzas hidráulicas que pueden "empujarlas" fuera del sitio de interés y nanopartículas mayores a 100 nm principalmente se quedan atrapadas en espacios extracelulares. Tomando en cuenta lo ya mencionado se puede comentar que los resultados obtenidos mediante la técnica de azul de Prussia siguen una distribución muy similar que podríamos considerar como "normal" en los diferentes órganos debido a sus propiedades vasculares y viéndose favorecida una vez que se vio expuesto a campos magnéticos. Esto además puede explicar su alojamiento aumentado en el tumor ya que este al poseer una capilaridad discontinua y un tamaño de poro mayor permite una mejor entrada y retención dentro del sitio.

Finalmente en el patrón de expresión del plásmido de pCEMLuc podemos observar que fue predominante en órganos como el hígado, bazo y tumor, ya que como ya se ha mencionado estos órganos participan principalmente en el almacén y la retención de las nanopartículas, mientras que órganos como el estómago, corazón y pulmón los cuales tienen una menor participación, mostrando su pico máximo de expresión en el tumor que puede explicarse debido a la mayor concentración de nanopartículas al tener mejor acceso gracias a sus capilares con mayor poro.

También puede observarse muy ligera expresión de luciferasa en el control con PBS y una expresión mínima en el plásmido que se encontraba encapsulado en la nanopartícula pero que en el cual no se utilizó el campo magnético, y que al no tener el apoyo del campo magnético, este gen del plásmido de pCEMLuc por poseer un promotor a campos magnéticos presenta mucho menor expresión (Alvizo Báez *et al.* 2014).

También podemos observar una mediana expresión en el plásmido desnudo el cual fue expuesto al campo magnético y que confirma su activación mediante este estímulo, mientras que la mejor expresión que fue observada se encontró, como se esperaba, en las nanopartículas bajo estimulación magnética. Cabe mencionar que además de su expresión aumentada debido al campo magnético y apoyado de la distribución ya mencionada, Hao Zheng *et al.* (2013) menciona que a diferencia de los plásmidos desnudos, los nanocomplejos que poseen estructuras más estables permiten una duración más prolongada de la expresión genética debido a la liberación persistente del plásmido, además de un incremento en la eficiencia de la transfección prolongándose hasta 96 horas posterior a su administración a diferencia de las 24 horas en un plásmido desnudo promedio.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron micropartículas estables con tamaños de aproximadamente 300 a 350 nm, con un radio de retención de 1:60 y una liberación estable con el 50% a las 24 horas, las cuales presentaron una baja toxicidad de CC50 de 60.14 μ l.

La biodistribución de micropartículas demostró una mayor concentración en el tumor gracias a la dirección magnética, además de una biodistribución en Hígado y Bazo los cuales son órganos involucrados en el metabolismo de las micropartículas gracias a su tamaño.

La expresión génica del plásmido reportero pCEMLuc mostró un incremento cuando ésta fue estimulada por un campo magnético externo, lo que confirma la funcionalidad del uso de micropartículas magnéticas para una sitio dirección e incremento de la expresión génica.

El presente trabajo aporta datos que pueden sustentar y apoyar algunos proyectos previamente realizados en el laboratorio, demostrando la biodistribución de los sistemas empleando micropartículas magnéticas a complejas a plásmidos para la dirección y expresión de genes estimulables por campos magnéticos.

PERSPECTIVAS

La biodistribución es uno de los puntos clave en la producción de cualquier sistema terapéutico hoy en día, siendo esto determinante tanto para la efectividad, la toxicidad y el futuro de dicho sistema. Es de suma importancia continuar la optimización del tamaño de la micropartícula ya que es uno de los factores fundamentales que determina el destino del sistema terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

A. C. Guyton and J. E. Hall, Textbook of Medical Physiology, Elsevier, PA, USA, 12th edn, 2011.

Alexiou, C.; Schmidt, A.; Klein, R.; Hulin, P.; Bergemann, C.; Arnold, W, (2002). Magnetic drug targeting: biodistribution and dependency on magnetic field strength. *J. Magn. Magn. Mater.*, 252, 363-366.

Almeida M. Joao Paulo, Chen L Allen, Foster Aaron y Drezek Rebekah, (2011). In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*, 6, 5, 815–835.

Andrade F, Antunes F, Nascimento AV, da Silva SB, das Neves J, Ferreira D, Sarmento B. (2011). Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. *Curr Drug Discov Technol*, 157-172.

Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S.S. & Illum, L. (1994) Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res*, 1358-1361.

A. Ruiz, Y. Hernández, C. Cabal, E. González, S. Veintemillas-Verdaguer, E. Martínez and M. P. Morales (2013). *Nanoscale*, 5, 11400-11408

Banu S. Zolnik, Africa Gonzalez-Fernandez, Nakissa Sadrieh, and Marina A. Dobrovolskaia, (2010). Minireview: Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology*, 151,458– 465.

Bowman K, Leong KW. 2006. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *Int J Nanomed*, 1, 117-128.

Brannon-Peppas Lisa & Blanchette James O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1649-1659.

Caroline Casagrande Sipoli a, Nathalia Santanaa, Andrea Arruda Martins Shimojoa, Adriano Azzonib, Lucimara Gaziola de la Torrea (2014). Scalable productionof highly

concentrated chitosan/TPP nanoparticles indifferent pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency Biochemical Engineering Journal 94 (2014) 65–73.

Chiellini F, Piras AM, Errico C, Chiellini E. (2008). Micro/nanostructured polymeric systems for biomedical and pharmaceutical applications. Nanomedicine, 3, 367-393.

Chow AY. (2010). Cell cycle control by oncogenes and tumor suppressors driving the transformation of normal cells into cancerous suppressors cells. Nature Education 3(9):7.

Cynthia Aracely Alvizo Báez, Itza Eloisa Luna Cruz, Maria Cristina Rodríguez Padilla, and Juan Manuel Alcocer González (2014) Magnetic Nanoparticles of Chitosan for Targeted Delivery System of Plasmids to the Lungs. Journal of Nanotechnology. Volume 2014 (2014), Article ID 313415, 5 pages.

Dan Peer, Jeffrey M. Karp, et al. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nature Nanotechnology 2, 751-760.

Du J, Sun R, Zhang S, Govender T, Zhang LF, Xiong CD, Peng YX. (2004). Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles for drug delivery. Macromol Rapid Commun, 25, 954-958.

Goycoolea, F.M., Lollo, G., Remuñán-López, C., Quaglia, F. & Alonso, M.J. (2009) Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for transmucosal delivery of macromolecules; Biomacromolecules 10(7):1736-43.

Giustini, R. Ivkov y P.J. Hoopes (2011). Magnetic nanoparticle biodistribution following intratumoral administration Nanotechnology, 22(34): 345101.

Hamed Arami, Amit Khandhar, Denny Liggitt and Kannan M. Krishnan (2015). In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. Chem. Soc. Rev., 2015, 44, 8576-8607.

Hao Zheng, Cui Tang, Chunhua Yin (2013). The effect of crosslinking agents on the transfection efficiency, cellular and intracellular processing of DNA/polymer nanocomplexes Biomaterials 34, 3479-3488.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2016) “Estadísticas a propósito de día mundial contra el cáncer” Datos nacionales. Artículo digital disponible en http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf

Jain K, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V., (2008). Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats. *Mol Pharm.*, 5, 2,316-27.

Janes KA, Calvo P, Alonso MJ. 2001. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev*, 47, 83-97.

Jun Wang, *et al.*, (2010). Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice. *Int. J. Nanomed*, 5, 861–866.

Katalin V. Korpany, Fatemah Habib, Muralee Murugesu, and Amy Szuchmacher Blum. (2013). *Materials Chemistry and Physics*, 138, 29.

Kim, B.G. & Kang, I.J. (2006) Chitosan nanoparticles for the effective vaccine delivery system. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech. Technical Proceedings. 2: 388-391.

K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen and D. M. Shin, *Clin. Cancer Res.*, (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cáncer, 14, 1310.

Silva GA, Coutinho OP, Ducheyne P, Shapiro I M, Reis RL. 2007. Starch-based microparticles as carriers for the release of active platelet-derived growth factor. *Tissue Eng*, 13, 1259-1268.

R. Ranganathan, S. Madanmohan, A. Kesavan, G. Baskar, Y. R. Krishnamoorthy, R. Santosham, D. Ponraju, S. K. Rayala and G. Venkatraman, (2007). Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications *Int. J. Nanomed.*, 7, 1043–1060.

Kozłowski, L. *et al.*, (2003). Concentration of interleukin-6 (Il-6), interleukin-8 (Il-8) and interleukin-10 (Il-10) in blood serum of breast cancer patients. Medical University of Białystok Poland, *Annales Academiae Medicae Bialostocensis*, 48, 84-86.

L. Brannon-Peppas & J.O. Blanchette (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56 (11), pp. 1649–1659

Li MG, Al-Jamal KT, Kostarelos K, Reineke J., (2010). Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles, *ACS Nano*, 4, 11, 6303–6317.

Liekens S, De Clercq E, Neyts J. (2001) Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:253-70.

Lin Yang, *et al.*, (2015). Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice, *Nanoscale*, 7,625.

Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H.(2008). Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond.)* 3(5), 703–717.

López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L. & Bastos-González, D. (2005) Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J. Colloid Interf. Sci.* 283: 344-351.

Mayor S, Pagano R E (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 603–612

N.Csaba, M.Köping-Höggård, M.J.Alonso (2008). Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery, *Int.J.Pharm.* 382 (2009) 205–214.

Nelson DL, Cox MM (2001): “Principios de Bioquímica”, 3ª ed. Editorial Omega (Barcelona, España), pp 1119-1128.

Paula J Foster, Elizabeth A Dunn, Kristina E Karl, Jonatan A Snir, Colleen M Nycz, Alfred J Harvey, and Ron J Pettis (2008) Cellular Magnetic Resonance Imaging: In Vivo

Imaging of Melanoma Cells in Lymph Nodes of Mice Neoplasia. 2008 Mar; 10(3): 207–216.

Ruirui Qiao, Chunhui Yang & Mingyuan Gao, (2009). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. J. Mater. Chem., 19, 6274–6293.

Saikia C, Gogoi P, Maji TK. (2015). Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications. J Mol Genet Med S4:006. doi:10.4172/1747-0862.S4-006

Schipper NGM, Vårum KM, Stenberg P, Ocklind G, Lennernäs H, Artursson P. (1999). Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs 3: influence of mucus on absorptionenhancement. Eur J Pharm Sci, 8, 335-343.

S. D. Perrault, C. Walkey, T. Jennings, H. C. Fischer and W. C. W. Chan (2009). Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. Nano Lett., 9, 1909–1915.

Seyda Bucak, Banu Yavuzturk and Ali Demir Sezer (2012). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Surface Modifications and Application in Drug Delivery, Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems, PhD. Ali Demir Sezer (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/52115.

S.S. Feng & S. Chien (2003). Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases Chemical Engineering Science, 58, pp. 4087–4114

Téllez López (2009). La eficacia de la hipnoterapia sobre el sistema inmunológico y la calidad de vida en mujeres con cáncer de mama. (Tesis inédita de doctorado) Universidad Autónoma de Nuevo León, pp. 2-15.

Tian XX, Groves MJ. 1999. Formulation and biological activity of antineoplastic proteoglycans derived from Mycobacterium vaccae in chitosan nanoparticles. J Pharm Pharmacol, 51, 151-157.

Trever Todd, Zipeng Zhen, Wei Tang, Hongmin Chen, Geoffrey Wang, Yen-Jun Chuang, Kayley Deaton, Zhengwei Panc and Jin Xie (2014). Iron oxide nanoparticle encapsulated diatoms for magnetic delivery of small molecules to tumors *Nanoscale*, 6, 2073.

Vila, A., Sánchez, A., Janes, K.A., Behrens, I., Kissel, T., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (2004). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57: 123-13.

Viswanadha V. (2015). An overview of targeted cancer therap. *BioMedicine* 4(1) 1-y.

Xu, Y. & Du, Y. (2003) Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 250: 215-226.