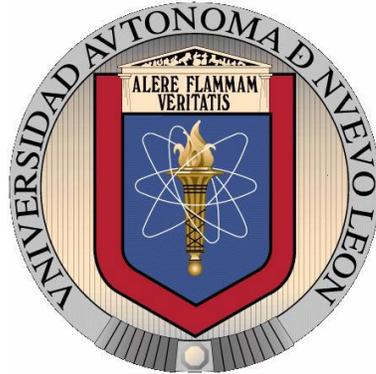


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO EN LA EXPRESIÓN DE UN TRANSGÉN MEDIADO POR UN
NANOCOMPLEJO FORMADO POR ADENOVIRUS RECOMBINANTE
Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS BAJO INFLUENCIA DE UN
CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO**

Por

M.C. HUMBERTO ANTONIO SALAZAR SESATTY

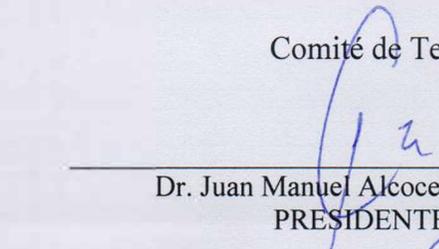
Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

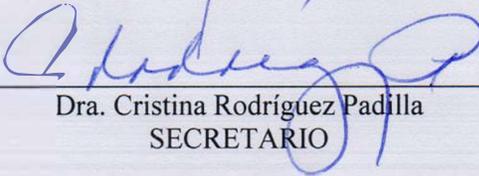
Octubre 2020

**EFFECTO EN LA EXPRESIÓN DE UN TRANSGÉN MEDIADO POR UN
NANOCOMPLEJO FORMADO POR ADENOVIRUS RECOMBINANTE
Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS BAJO INFLUENCIA DE UN
CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO**

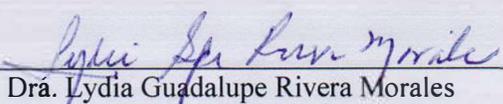
Comité de Tesis



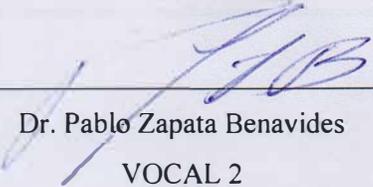
Dr. Juan Manuel Alcocer González
PRESIDENTE



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
SECRETARIO



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
VOCAL 1



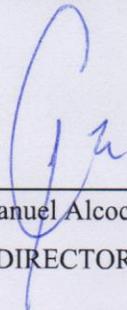
Dr. Pablo Zapata Benavides
VOCAL 2



Dr. Ricardo Gómez Flores
VOCAL 3

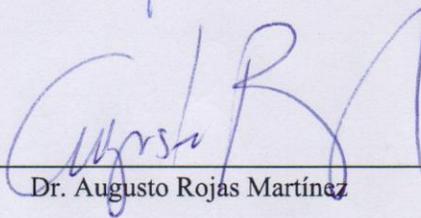
**EFFECTO EN LA EXPRESIÓN DE UN TRANSGÉN MEDIADO POR UN
NANOCOMPLEJO FORMADO POR ADENOVIRUS RECOMBINANTE
Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS BAJO INFLUENCIA DE UN
CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO**

Dirección de Tesis



Dr. Juan Manuel Alcocer González

DIRECTOR



Dr. Augusto Rojas Martínez

CO-DIRECTOR

LUGAR DE TRABAJO

El presente proyecto de investigación de tesis fue elaborado en la Unidad de Inmunología Molecular, perteneciente al Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas y en la Unidad de Terapias Experimentales del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, ambas dependencias de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del laboratorio de Inmunología y Virología y del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios de quien procede toda inteligencia, ciencia y sabiduría, a Él la gloria.

Mis padres y hermanas también de un agradecimiento especial porque siempre estuvieron ahí para darme su tiempo, consejo y amor incondicional, este logro también es suyo.

A mi familia, en especial a mi esposa e hijos que fueron el motor para este logro académico, gracias por estar siempre a mi lado.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Manuel Alcocer González y al Dr. Augusto Rojas Martínez quienes en conjunto dirigieron este trabajo. A los equipos de la Unidad de Terapias Experimentales del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL, en especial al Dr. Iván Marino Martínez, a la Dra. Gissela Borrego, a la Ing. Fátima Alvarado y a la LBG Paamón Rojo quienes siempre recibí apoyo y consejo. Así como a los compañeros del CIDICS de las diferentes Unidades destacando al MVZ José Herrera líder de la Unidad de Modelos Biológicos y a la Química Patricia Villarreal y el equipo de trabajo de la Unidad de Genómica.

También quiero agradecer a la Dra. Itza Luna y a la Dra. Cynthia Alvizo ambas del Laboratorio de Inmunología Molecular el Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por su valiosa asesoría, así mismo al Dr. Pérez y al Dr. Jorge Menchaca de la Facultad de Físico Matemáticas también de la UANL por su apoyo en la toma de imágenes de microscopía electrónica de transmisión y fuerza atómica.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis hijos Humberto Arturo y Rafael Antonio, quienes durante en este proceso llegaron a nuestras vidas por obra y gracia de Dios para complementar nuestra familia, esperando que les sirva como ejemplo de que a través del esfuerzo, la persistencia y la voluntad, siempre tomados de la mano de Dios y de la familia, se puede lograr cualquier objetivo que se propongan en la vida y que no hay obstáculo que no puedan superar.

También le dedico este trabajo a mi esposa Samantha Flores, un paso más, unidos en el amor, que nos hace más fuertes.

ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO	I
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
INDICE	V
INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Terapia Génica	2
2.2. Vectores no virales	2
2.3. Vectores virales	3
2.4. Adenovirus como adenovectores	3
2.5. Magnetofección	4
2.6. Efectos biológicos del campo electromagnético	6
2.7. Efectos de los CEM sobre la expresión génica	7
2.8. Promotor genético controlado por CEM	9
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVO DEL TRABAJO	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1. Células competentes y líneas celulares	14
6.2. Vector adenoviral	14
6.3. Producción adenoviral	15
6.4. Purificación del vector	15
6.5. Titulación en placa del AdCEM-Luc	16
6.6. Determinación óptica de partículas virales.	16

6.7. Generación de los nanocomplejos (Ad-nanopartículas)	17
6.8. Caracterización de los nanocomplejos por microscopia electrónica	18
6.9. Caracterización de la carga superficial y tamaño de los nanocomplejos	18
6.10. Evaluación de la luminiscencia de los nanocomplejos en líneas celulares no permisiva	19
6.11. Evaluación de la luminiscencia de los nanocomplejos en modelos murinos	20
6.12. Procesamiento de los tejidos extraídos	21
6.13. Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS	23
8. DISCUSIÓN	33
9. CONCLUSIONES	37
10. PERSPECTIVAS	38
11. BIBLIOGRAFÍA	39
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Diluciones para la determinación de la concentración adenoviral en PV.	17
2. Volúmenes recomendados de AdenoMag, dependiendo del número de partículas virales infecciosas a utilizar.	17
3. Volúmenes recomendados de partículas infectivas e <i>in vivo</i> ViroMag, por ratón.	18
4. Grupos experimentales <i>in vitro</i> inoculados con AdCEM-Luc y condiciones de transducción.	19
5. Grupos experimentales <i>in vivo</i> inoculados con AdCEM-Luc, tipo de inoculación y condiciones de transducción.	20
6. Concentración de AdCEM de las producciones adenovirales.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de ejemplos de complejos no virales y virales formados con nanopartículas magnéticas.	4
2. Diagrama sencillo del método de magnetofección.	5
3. Mapa con sitios de restricción del vector pCEM	9
4. Esquema de la estrategia general de la metodología.	14
5. Purificación del AdCEM-Luc por ultracentrifugación en gradientes de CsCl.	23
6. Titulación del AdCEM-Luc.	24
7. Imágenes obtenidas por MFA.	25
8. Imágenes obtenidas por MET.	25
9. Potencial Z de los nanocomplejos AdCEM-Luc-NPM.	26
10. Medición de la luminiscencia de las células B16-F10 transducidas con los nanocomplejos y los adenovirus desnudos, con exposición y sin exposición a un CME.	27
11. Medición de la luminiscencia de las células TC-1 transducidas con los nanocomplejos y los adenovirus desnudos, con exposición y sin exposición a un CME.	27
12. Ratones C57BL/6 que desarrollaron tumor en el muslo post inoculación de células B16-F10, tratamiento y exposición al CME.	28
13. Luminiscencia obtenida por las transducciones de los nanocomplejos en modelos murinos C57BL/6 que desarrollaron tumor en el muslo.	29
14. Medición de luminiscencia del control positivo posterior al tratamiento del Tissuelyser.	29
15. Medición de luminiscencia de los tumores macerados con micropistilos.	30

16. Medición de luminiscencia del control positivo ante diferentes tratamientos.	31
17. Ratones C57BL/6 sin tumor.	31
18. Luminiscencia obtenida de los tratamientos en ratones sin tumor.	32
19. Luminiscencia obtenida de las transducciones de ratones con tumor B16-10 inoculado por vía intratumoral.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CEM	Campo electromagnético
CME	Campo magnético externo
CT	Choque térmico
DO	Densidad óptica
ECP	Efecto citopático
Hz	Hertz
Kpb	Kilo pares de bases
Luc	Luciferasa
MET	Microscopio electrónico de transmisión
MFA	Microscopio de fuerza atómica
MOI	Multiplicidad de infección
NPM	Nanopartículas magnéticas
PCT	Proteína de choque térmico
PV	Partícula viral
RCA	Receptor coxsackie y adenovirus
TCID	Dosis infectiva de cultivo tisular
UFC	Unidades formadoras de placa

RESUMEN

Los complejos de nanopartículas magnéticas (NPM) y vectores virales potencian la transferencia genética en células tumorales cuando se someten a un campo magnético externo (CEM). El objetivo fue construir y evaluar la capacidad de expresión del conformado por un adenovector recombinante con un promotor inducible por CEM asociado a nanopartículas (AdCEM-Luc-NPM) *in vitro* en las líneas celulares B16-F10 y TC-1, así como *in vivo*, usando el modelo murino C57BL/6, para determinar la eficiencia de transducción y expresión del gen reportero. La construcción adenoviral se generó a través de la recombinación homóloga entre el pShuttle pCEM-Luc y el plásmido poseedor del genoma adenoviral pAdeasy. Las partículas adenovirales iniciales fueron generadas a través de la transfección de células HEK-293 con el pAdCEM-Luc y se corroboró exitosamente su capacidad de transducción en la misma línea celular. La visualización de los nanocomplejos se realizó por microscopía de fuerza atómica y microscopía de electrónica de transmisión. La capacidad de transducción de un nanodispositivo AdCEM-Luc-NPM presenta niveles de transducción más altos a los detectados por la aplicación del adenovector desnudo en presencia de un CME en la línea celular de melanoma B16-F10 ($p \leq 0.05$), pero no en la línea celular de cáncer cervicouterino TC-1. Se obtuvieron tumores con una tasa de éxito del 80% en un modelo murino posterior 10 a 15 días de inoculación intradérmica de células B16-F10. La capacidad de transducción de los nanocomplejos *in vivo* no pudo ser comprobada en su totalidad, ya que los resultados no son concluyentes, puesto que la luminiscencia fue inhibida por factores presentes en el procesamiento de los tumores murinos. Este estudio muestra que el promotor del AdCEM-Luc-NPM puede usarse para manipular la expresión génica en las células de tumor B16-F10. El nanocomplejo de AdCEM-Luc-NPM controlado por CEM puede tener aplicaciones para la activación de la expresión de genes terapéuticos en un tejido específico de tumor.

ABSTRACT

Magnetic nanoparticles (MNP) complexed to viral vectors enhance gene transfer into tumor cells when subjected to an external magnetic field. This study aimed to construct a nanocomplex consisting of a recombinant adenoviral vector with an electromagnetic field (EMF)-inducible promoter coupled with MNP (AdCEM-Luc-MNP) and determine its potential therapeutic activity *in vitro* in the tumor cell lines B16-F10 and TC-1 and in C57BL/6 mice. The AdCEM-Luc-MNP nanocomplexes were successfully constructed using the Adeasy and AdenoMag kit. Cytopathic effect and luciferase expression, as proof of adenovector viability, were evaluated in HEK-293 cells before AdCEM-Luc-MNP transfection. Visualization of nanocomplexes was performed by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. Mice were injected with B16-F10 transduced cells. Results showed that the AdCEM-Luc-MNP promoter was activated after EMF exposure in B16-F10 cells, showing increased luciferase gene expression levels in comparison with cells without exposure ($p \leq 0.05$). Although TC-1 cells showed luciferase expression after AdCEM-Luc-MNP transfection, the promoter was activated without EMF exposure. Tumor-tissue was obtained from mice 10 to 15 days after B16-F10 transduced cells injection. The transduction potential of the nanocomplexes was not confirmed due to potential luminescence inhibitor factors present in the tumor processing. This study showed that the AdCEM-Luc-MNP promoter may be used to manipulate gene expression in cancer B16-F10 cells. The magnetic fields-controlled AdCEM-Luc-MNP nanocomplex system may have applications in the delivery and activation of the expression of therapeutic genes in a specific tumor-tissues.

1. INTRODUCCIÓN

La terapia génica consiste en introducir material genético foráneo en la célula para modificar su función de forma que pueda realizar o hacer más eficiente procesos que normalmente no lleva a cabo de forma satisfactoria (Giannoukakis et al. 1999a). La viro nano terapia combina la nanotecnología y los vectores adenovirales para el tratamiento de enfermedades, siendo un área activa en la investigación biomédica con potencial para proveer tratamientos novedosos y más efectivos para enfermedades como el cáncer, al utilizarse en su conjunto con quimio, inmuno y radioterapias (Woappi et al. 2014).

Por otro lado, el estudio de los campos electromagnéticos (CEM) en los sistemas biológicos a nivel celular, ha propiciado su uso como factor para la activación de elementos de expresión génica extrínseca a través de los resultados obtenidos del uso de un promotor de respuesta a CEM para activar el gene reportero de luciferasa en vacunas de ADN desnudo en estudios *in vitro* e *in vivo* (Rodriguez de la Fuente et al. 2009).

La necesidad de generar nuevos agentes terapéuticos que utilicen las novedosas técnicas de terapia génica que existen hoy en día, impulsan a la innovación de los típicos agentes terapéuticos. El efecto observado sobre los sistemas biológicos de los campos electromagnéticos, aunado a los avances de la terapia génica en el uso de la nanovirología promueve al desarrollo de nanodispositivos que conjunten todos estos componentes para su posterior uso como potenciales agentes terapéuticos.

En el presente trabajo se pretendió construir un nanodispositivo conformado por un adenovector recombinante con un promotor inducible por campos electromagnéticos asociado a nanopartículas para determinar el efecto de expresión potenciado en las líneas celulares B16-F10 y TC-1, así como en modelos murinos C57BL/6 implantados con tumores intradérmicos con las líneas B16-F10 y TC-1.

2. ANTECEDENTES

2.1 Terapia Génica

La terapia génica es una modalidad terapéutica en la que el material genético es introducido en la célula para modificar su función. La combinación de tres elementos clave es crítico en la terapia génica: el material genético a transferir, el método de transferencia y el tipo celular que incorporará dicho material genético (Giannoukakis et al. 1999a).

La transferencia de material genético puede realizarse empleando diferentes métodos, pero en la mayoría de los casos es necesario la utilización de un vehículo o vector que facilite la introducción de dicho material. Las propiedades de un vector ideal pueden variar en función de las necesidades concretas y condicionan el éxito del proceso de transferencia genética en cualquiera de sus etapas: 1) alcanzar la célula diana, 2) introducir y liberar el material genético en el interior de la célula y 3) conseguir la expresión del transgén (Mountain 2000).

Los vectores empleados en terapia génica se clasifican en dos grandes grupos debido a su naturaleza: a) vectores no virales, los cuales se basan en métodos físicos y b) vectores virales que están basados en virus modificados genéticamente.

2.2 Vectores no virales

Dentro de las propiedades de los vectores no virales están su simplicidad y facilidad de preparación, su habilidad para transferir moléculas de gran tamaño, escasa inmunogenicidad, baja toxicidad y alta seguridad. Sin embargo, la eficacia de la transferencia génica alcanzada con los vectores no virales suele ser baja al igual que su especificidad. Los medios físicos más empleados son los liposomas, la pistola génica, los polímeros catiónicos (policomplejos), complejos DNA-proteína, la electroporación e incluso el DNA desnudo inyectado. A pesar de la baja eficiencia de la transferencia génica que ofrecen los procedimientos físicos y vectores no virales, éstos han dado buenos resultados en ensayos de vacunación y se están desarrollando nuevos vectores y procesos que auguran un futuro prometedor para estos enfoques (Akhtar 2006).

2.3 Vectores virales

Los métodos virales usan virus o sus derivados para la introducción de material genético hacia el interior de la célula. Distintos tipos de virus han sido modificados para construir vectores de transferencia y terapia génicas, cada uno de ellos con sus propias ventajas y desventajas (Kay et al. 2001).

El número de vectores virales disponibles es amplio y la elección de este depende del objetivo del procedimiento. Los retrovirus son los vectores más eficaces para la transferencia génica *ex vivo* y presentan la expresión más prolongada del transgén. Los lentivirus permiten modificar células madre hematopoyéticas o leucocitos. Los virus asociados a adenovirus o esqueletos de adenovirus permiten la expresión prolongada del transgén *in vivo*. Los adenovirus de primera generación son los vectores virales más apropiados para protocolos de terapia génica en cáncer, donde se requieren altos niveles de expresión del transgén deseado y no se necesita la expresión prolongada del mismo (Giannoukakis et al. 1999b; Hunt and Vorburger 2002).

Adenovirus como vectores

Los adenovirus del serotipo 5 han sido ampliamente utilizados en ensayos clínicos debido a su capacidad para producir títulos altos, su alta eficacia de transducción en células quiescentes o en cualquier fase del ciclo celular, su versatilidad para ser inducidos como replicativos o no replicativos, el gran tamaño del transgén (hasta 10 kb), la ausencia de mutagénesis por su integración al genoma del hospedero y por último, un amplio tropismo celular exceptuando las células hematopoyéticas (Smith et al. 1998; Suzuki et al. 2008; Thomas et al. 2003).

El principal inconveniente para el uso de los adenovirus es la respuesta inmunológica que desenlazan, caracterizada por una intensa reacción inflamatoria, así como la activación de linfocitos T citotóxicos (Smith et al. 1998; Suzuki et al. 2008; Thomas et al. 2003). Esta respuesta inmune se puede deber a que el virus forma un complejo de alta afinidad con las proteínas receptoras de las células hospederas llamadas receptores de coxsackie y adenovirus (RCA). La eficiencia de la transducción es altamente dependiente de los niveles de expresión de los RCA en la superficie de las células blanco (Leopold and Crystal 2007; Bergelson et al. 1997); bajos niveles de expresión de RCA disminuyen los

niveles de absorción de los adenovirus en la superficie celular, lo cual disminuye su eficiencia de transfección. Además, otra limitante es que se reduce la versatilidad de los vectores adenovirales como vectores terapéuticos ya que solo infectan aquellos linajes que expresan RCA en su superficie (Fields 1996).

Por lo anterior, es necesario buscar métodos alternativos que disminuyan el tiempo de la infección e incrementen la versatilidad de los vectores adenovirales (Bhattarai et al. 2008b).

2.3 Magnetofección

Las nanopartículas magnéticas (NPM) han atraído considerablemente la atención de investigación básica debido a sus diversas aplicaciones, entre las cuales se incluye la separación celular, la purificación de DNA, inmunoensayos, marcaje tumoral, imagen de resonancia magnética y terapia antitumoral hipertérmica (Hoshino et al. 2007; Saiyed et al. 2006; Tsai et al. 2007; Martina et al. 2007; Harisinghani et al. 2003; Johannsen et al. 2006).

Por lo general, las biomoléculas como los anticuerpos, el los DNA plasmídico, ARN pequeños de interferencia, entre otras, son fusionadas con la superficie de las NPM (Figura 1) para aplicaciones terapéuticas (Ito et al. 2004; Cao et al. 2006). Sin embargo, debido a sus propiedades, el método requerido para la modificación de la superficie para cada biomolécula es diferente. Por ello, el mejoramiento a la accesibilidad de la superficie de las nanopartículas puede expandir su uso potencial y efectividad.

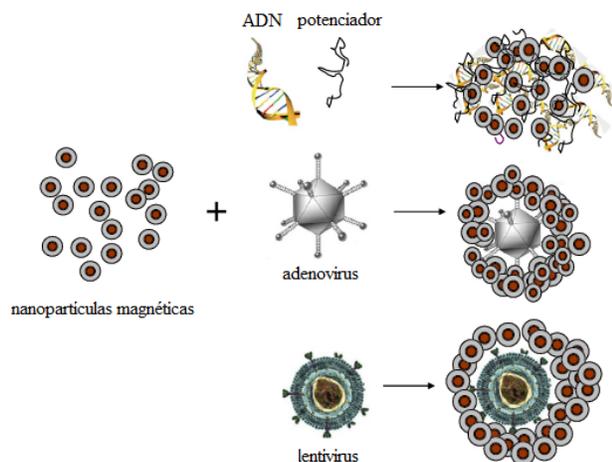


Figura 1. Esquema de ejemplos de complejos no virales y virales formados con nanopartículas magnéticas (Plank et al. 2011b).

La magnetofección (Figura 2) se lleva a cabo cuando se forman complejos de DNA plasmídico con nanopartículas de óxido de hierro super-paramagnético u oro (Huth et al. 2004; Kamei et al. 2009).

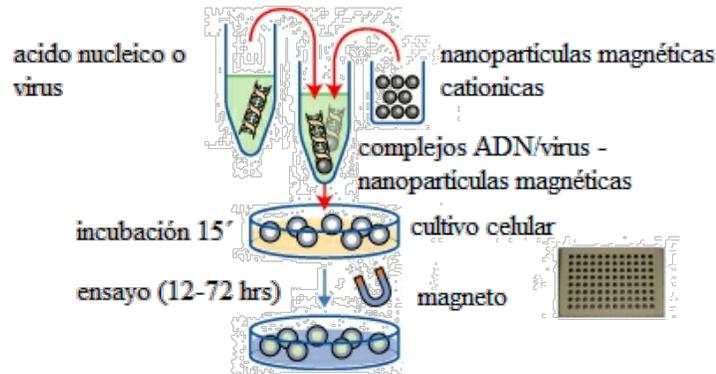


Figura 2. Diagrama sencillo del método de magnetofección. Los nanocomplejos se forman con la incubación del material genético recombinante (ADN/ARN-Virus) con las NPM en presencia del magneto (Plank et al. 2003).

Durante la última década, se han implementado y optimizando diferentes métodos para mejorar la eficiencia de la magnetofección sitio específica de vectores híbridos a través de gradientes y NPM para fines terapéuticos (Park et al. 2012; Ma et al. 2011; Robertson et al. 2007; Plank et al. 2011b; Plank et al. 2011a). Esto ha permitido potenciar la eficiencia en la expresión más de 100 veces (Luo and Saltzman 2000), reducir los tiempos a minutos (Scherer et al. 2002), y acelerar la acumulación del vector en tejidos específicos cuando se hace uso de una exposición directa a un magneto (Haim et al. 2005a; Mykhaylyk et al. 2009; Plank et al. 2011b), tanto en transfecciones virales como en otros métodos no virales.

Para la estabilización del nanocomplejo se han utilizado polímeros catiónicos como la polietilnamina (Boussif et al. 1995), biomoléculas como la estreptavidina-biotina (Kim et al. 2011), así como quitosano y sus derivados (Bhattacharai et al. 2008b; Bhattacharai et al. 2008a), en los cuales se alcanzando la expresión del transgén al aplicarse un CME (Huth et al. 2004; Alvizo Báez C.A. 2014; Alvizo-Baez et al. 2016).

Actualmente se han explorado vectores híbridos que combinan las ventajas de los sistemas virales y no virales (Choi et al. 2012; Kasala et al. 2014). Una de las estrategias

para superar las limitaciones de la dependencia de los adenovirus a los CAR es la modificación de la superficie adenoviral con un polímero que evita la necesidad de dichos receptores para su endocitosis (Jung et al. 2015; Lee et al. 2014; Fernandez and Rice 2009). Al modificar los adenovirus con polímeros catiónicos (Lee et al. 2014; Meunier-Durmort et al. 1997; Fernandez and Rice 2009) o lípidos se ha potenciado su capacidad de transducción (Wan et al. 2013; Chillon et al. 1998; Fasbender et al. 1997).

Sin embargo, estas estrategias no han logrado una transducción tumor específica porque estos complejos de adenovirus y polímeros catiónicos o lipídicos rápidamente se diseminan en tejidos no blancos (Haim et al. 2005b; Mykhaylyk et al. 2009). Por lo anterior, se han formulado nanocomplejos integrados por adenovirus, polietilenimida/polietilenglicol y nanopartículas de óxido de hierro súper-paramagnéticas para mejorar la eficiencia de transducción cuando estos vectores son expuestos directamente a un CME (Scherer et al. 2002; Chorny et al. 2006), reduciendo la dosis requerida del complejo adenovirus/polímero, proveyendo una plataforma eficiente y segura para su aplicación en terapia génica (Choi et al. 2015; Almstatter et al. 2015). Además, se ha observado que estos nanocomplejos minimizan la interacción con los componentes sanguíneos y células debido a un efecto protector de las nanopartículas (Mykhaylyk et al. 2012; Sapet et al. 2012; Tresilwised et al. 2010; Tresilwised et al. 2012).

2.4 Efectos biológicos del campo electromagnético

La respuesta de un sistema biológico a un campo electromagnético (CEM) depende de las propiedades intrínsecas del sistema, de las características del campo externo incidente (especialmente de su potencia radiante y su frecuencia) y del medio en el cual se produce el fenómeno (Lin et al. 1994). Los animales son complejos electroquímicos muy sensibles, que también se comunican con su medio a través de impulsos eléctricos. En ellos existen corrientes iónicas y diferencias de potencial eléctrico a través de las membranas celulares y de los fluidos corporales que general campos electromagnéticos (Heredia-Rojas 2003).

Una variedad de organismos muestra magneto-sensibilidad a la orientación en el campo magnético de la tierra. Entre éstos se encuentran las magnetobacterias, los

paramecios, las planarias, los caracoles, las abejas, las salamandras, los tritones, los salmones, y el humano (Azanza and del Moral 1994).

Los CEM generados en las estructuras biológicas están caracterizados por determinadas frecuencias específicas, que pueden ser interferidas por la radiación electromagnética incidente, provocando una inducción y modificando su respuesta (Smith and Best 1989; Hyland 2000).

En el campo de investigación del bioelectromagnetismo, los experimentos se realizan con animales o tejidos vivos, que se someten a las radiaciones emitidas por fuentes de radiación de microondas durante un cierto tiempo, tomando nota de los posibles efectos. Hay controversia en los reportes de los efectos observables en los seres vivos, desde su nulo efecto, hasta la interferencia del sistema nervioso y alteración de numerosos procesos biológicos. Existen estudios que muestran cómo los animales expuestos padecen un deterioro de su salud en la vecindad de las antenas emisoras y algunos de los efectos no térmicos de las microondas sobre las aves se conocen desde hace más de 35 años (Tanner 1966).

Los reportes del efecto de los campos magnéticos sobre reacciones enzimáticas *in vivo* han dado resultados cualitativa y cuantitativamente diferentes dependiendo de la reacción que se trate y de las características del campo. Se ha reportado que provocan efectos en las biomoléculas (Barteri et al. 2005; Weisbrot et al. 2003), en la proliferación celular (Velizarov et al. 1999), interfieren con los procesos inmunes (Novoselova and Fesenko 1998), afectan la capacidad reproductiva (Dasdag et al. 1999), tienen efectos genotóxicos (Garaj-Vrhovac 1991; Lai and Singh 1995; Balode 1996), sobre el sistema nervioso (Beason and Semm 2002; Kolodynski and Kolodynska 1996; Kramarenko and Tan 2003; Marino et al. 2003; Salford et al. 2003), el sistema circulatorio (Szmigielski et al. 1998) y provocan un descenso en el número de nacimientos (Magras and Xenos 1997; Balmori 2003). Además, se ha demostrado la modulación del flujo del calcio y otros iones a través de las membranas.

2.5 Efectos de los CEM sobre la expresión génica

A pesar de que en la actualidad es tema de debate (Robertson et al. 2007), se ha reportado que los CEM de extremada baja frecuencia tienen efectos sobre procesos

bioquímicos importantes en el humano, como la síntesis del ADN, ARN y proteínas, cambios en la producción de hormonas, modificación de la respuesta inmune celular y cambios en el grado de crecimiento y diferenciación celular (Blank and Goodman 2009). Actualmente el enfoque es identificar marcadores sensibles de estrés inducido por CEM (Robertson et al. 2007).

Las proteínas de estrés o proteínas de choque térmico (PCT) son un grupo de proteínas que se han visto afectadas por las emisiones electromagnéticas (Tokalov and Gutzeit 2004). Esto se observó en estudios en los cuales se expusieron moscas de la fruta a la emisión de un teléfono móvil, causando elevación de los niveles de las proteínas del estrés *pct70*, así como un incremento de la fosforilación de la transcripción nuclear (Weisbrot et al. 2003).

Las PCT son una familia de proteínas chaperonas que se encuentran en todos los linajes celulares, son altamente conservadas y de abundante expresión debido a sus múltiples funciones (respuesta al frío, calor y otros cambios ambientales) de manera constitutiva. Las PCT incrementan la tolerancia al calor y llevan a cabo funciones esenciales para la sobrevivencia de la célula bajo condiciones de estrés al estabilizar proteínas en configuraciones anormales y jugar un rol en el plegamiento y desdoblamiento de las proteínas. Así mismo también participan como inmunógenos en muchas infecciones y enfermedades (Morimoto 1998).

La transcripción inducida por estrés de las PCT requiere la activación de factores de choque térmico (Lis and Wu 1993; Morimoto 1993), que se unen con el promotor y activan su actividad transcripcional. Debido a que estos factores pueden ser inducidos por una gran variedad de factores de estrés, las PCT son propuestas como biomarcadores de respuesta a la exposición de campos magnéticos (McNamee and Chauhan 2009). La síntesis de estas proteínas de respuesta a estrés es un mecanismo de protección celular inducido por una variedad de estímulos nocivos, por lo que la inducción de estas proteínas ante los campos magnéticos implica que son percibidos por los sistemas biológicos como un potencial peligro (Latchman 2001).

A pesar de que el mecanismo de interacción entre los CEM y los sistemas biológicos aún no está elucidado, el estudio de la inducción de la expresión de los genes de estrés *pct70* por la exposición a campos magnéticos puede proveer claridad en como los CEM

interactúan con las células y los tejidos, así mismo ofrece un modelo para el estudio y comparación de respuesta a estrés inducido por los CEM. Aun así, diferentes estudios muestran que los CEM interactúan a través del flujo de carga en el transporte de electrones con los electrones del ADN para estimular la biosíntesis (Goodman and Blank 2002). También se ha propuesto que los CEM puedan ser detonar la transducción de señales de la membrana al núcleo a través de cascadas enzimáticas causando cambios en el ADN (Heredia-Rojas et al. 2010).8130972802

2.6 Promotor genético controlado por CEM

En 1999 Lin y colaboradores identificaron secuencias en el promotor de PTC70 sensibles al estrés generado por CME en un rango de 50-60 Hz con una densidad de flujo de microTesla a miliTesla (Lin et al. 1999). Por su parte Heredia y colaboradores investigaron el efecto de un campo magnético sinusoidal de 60 Hz a 8 y 80 μ T sobre la expresión del gen de luciferasa contenido en un plásmido etiquetado como pCEM (Figura 3). Esta construcción génica contenía las secuencias específicas descritas anteriormente para la inducción de la expresión de *pst70* por campos magnéticos (Lin et al. 2001), así como el gen reportero de la luciferasa. El vector pCEM fue transfectado en las líneas celulares INER-37 y RMA E7 y posteriormente expuestas a un CME o a un choque térmico (CT), observando un aumento de la expresión del gen de luciferasa en las células INER-37 expuestas a CME y CT en comparación con los controles ($p < 0,05$), pero la exposición a MF no tuvo ningún efecto sobre la línea celular RMA E7 (Heredia-Rojas et al. 2010).

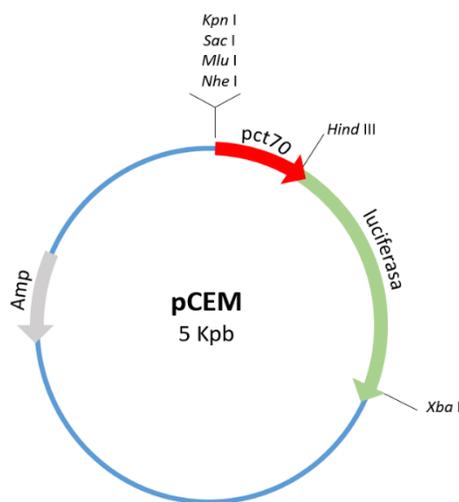


Figura 3. Mapa con sitios de restricción del vector pCEM. (Rodríguez de la Fuente 2008)

Posteriormente, el vector pCEM se electrotransfirió en los músculos cuádriceps de ratones BALB / c que más tarde se expusieron a un CME, observando un aumento de la expresión de luciferasa en ratones expuestos a CME 2 horas al día durante 7 días en comparación con los controles ($P < 0,05$), concluyendo que los campos electromagnéticos pueden tener efectos de gran alcance en el genoma (Rodríguez-De la Fuente et al. 2012).

Albizo y colaboradores en 2014, formaron nanocomplejos integrados por el pCEM, quitosano y nanopartículas magnéticas (NPM) con el objetivo de crear un sistema de distribución selectivo de plásmidos dirigido a los pulmones de ratones Balb/c, a través de la exposición a un CME. Se observó que el CME aumentó la expresión del gen reportero de luciferasa tanto en células B16-F10 transfectadas con los nanocomplejos magnéticos y en la región apical izquierda de los pulmones del modelo, demostrando que estos nanocomplejos pueden ser un sistema de suministro eficiente para la transfección in vitro de células y tejido pulmonar.(Alvizo Báez C.A. 2014). En el 2016, Albizo y colaboradores, generaron un nanocomplejo integrado por un plásmido que contenía el promotor de respuesta a CME y el gen del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (FNT) o TRAIL por sus siglas en inglés (pCEM-TRAIL), quitosano y NPM en el modelo murino C57BL/6, obteniendo una inducción de la apoptosis de manera eficiente así como la inhibición del crecimiento de melanoma B17-F10 en pulmones de ratón (Alvizo-Baez et al. 2016).

El presente trabajo pretende responder si el uso de los nanocomplejo AdCEM-Luc y nanopartículas presenta mayor eficiencia en la expresión de luminiscencia en comparación con el uso del adenovector desnudo, tanto en líneas B16-F10 y TC-1 como melanomas implantados en el modelo murino C57BL/6 al exponerse a un campo magnético.

3. JUSTIFICACIÓN

La necesidad de mejores vectores terapéuticos de alta eficiencia de transfección, baja inmunogenicidad en el hospedero y amplio tropismo celular, promueve la generación de vectores híbridos. El uso de nanocomplejos puede potenciar la capacidad de transducción de los adenovectores y ser controlado espacio-temporalmente a través de un campo magnético externo, lo que puede ser una opción innovadora con alcances prometedores en terapia génica.

4. HIPÓTESIS

La capacidad de transducción de un nanodispositivo formado por adenovirus recombinante con el promotor sintético de respuesta a campos electromagnéticos asociados a nanopartículas, presenta niveles de transducción más altos a los detectados por la aplicación del adenovector desnudo en las líneas celulares TC-1 y B16-10, como en los melanomas murinos en presencia de un CME.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto en la expresión de un transgén mediado por un nanocomplejo formado por adenovirus recombinante y nanopartículas magnéticas bajo influencia de un campo magnético externo en las líneas celulares TC-1 y B16-10, como en los melanomas murinos C57BL/6.

5.2 Objetivos particulares

1. Generar el vector adenoviral recombinante (AdCEM-Luc) con el promotor de respuesta a un campo magnético (CEM) y al gen reportero luciferasa.
2. Construir y caracterizar los nanocomplejos AdCEM-Luc-NPM.
3. Determinar el efecto en la expresión del gen de luciferasa mediado por AdCEM-Luc-NPM bajo influencia de un campo magnético externo *in vitro e in vivo*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Células competentes y líneas celulares

Se emplearon las líneas celulares HEK-293, TC-1 y B16-F10 (ATCC, Manassas VA), así como el modelo murino C57BL/6 el cual fue donado por la Unidad de Neurometabolismo del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

6.2 Vector adenoviral

Para los estudios de transducción se utilizó el vector AdCEM-Luc, cuya construcción fue producto de la colaboración entre el Laboratorio de Inmunología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Unidad de Terapias Experimentales del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), ambas dependencias de la UANL. Este es un adenovirus recombinante del tipo 5 que contiene el promotor sintético de respuesta a CEM y el gen de la enzima luciferasa como gen marcador, la estrategia general se observa en la Figura 4.

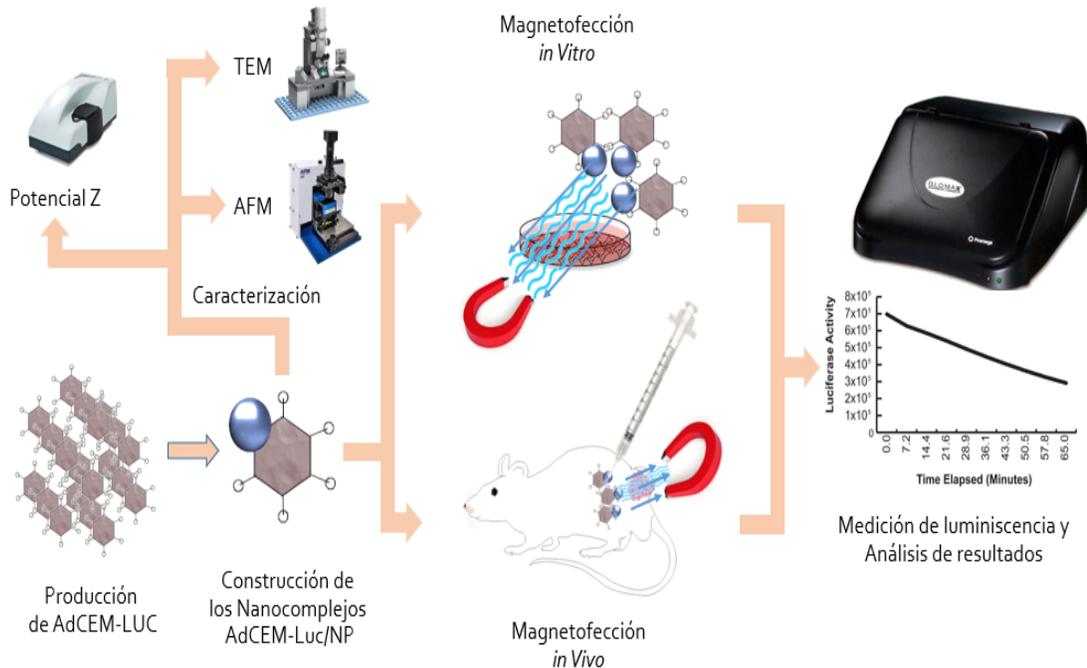


Figura 4. Esquema de la estrategia general de la metodología. Una vez producido el AdCEM-Luc, se caracterizó por microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía de fuerza atómica (MFA), para posteriormente se realizaron los bioensayos de magnetofección *in vitro* e *in vivo* para determinar los niveles de luminiscencia expresados en presencia y ausencia de un CME.

6.3 Producción adenoviral

Para la producción adenoviral se utilizó el medio de cultivo Advanced Dulbecco's Modified Eagle (Invitrogen, Carlsbad CA, cat. no. 11960), suero fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad CA, no. cat. 26140), tripsina 0.25% (Invitrogen, Carlsbad CA, no. cat. 15400054), penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad CA, no.cat.15070063), Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad CA, no.cat. 11668019). Entre los materiales a utilizar para cultivo celular se emplearon jeringas de 10 mL estériles desechables, tubos de 15 mL y 50 mL (Corning, Costar City NY, cat. no. 430052 y 430290), pipetas serológicas desechables de 5 mL y 10 mL (Corning, Costar City NY, cat. No. C4487, C4488), botellas de cultivo celular de 25 cm², 75 cm², 150 cm² (Corning, Costar City NY, cat. No. 3055, 3276, 3291) y cajas Petri de 100 mm (Corning, Costar City NY, cat. No. CLS3295).

Para iniciar la producción se realizó una transducción con el AdCEM-Luc de una producción previa con títulos de 6.6×10^8 unidades formadoras de placa (UFP)/mL siguiendo las recomendaciones del sistema AdEasy comercial (Agilent Technologies, CA, no. cat 240009), y se dejó incubando hasta que se observó efecto citopático (ECP) en la línea HEK-293. Posteriormente, por acción mecánica las células fueron resuspendidas y lisadas con ciclos de congelación y descongelación de -70 °C y 37 °C, respectivamente, para posteriormente centrifugarse a 4,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se utilizó para transducir las células HEK-293 en 3 botellas de cultivo T-25. Luego de observar el ECP, se transdujeron 5 botellas de cultivo T-75 utilizando el método antes mencionado, para posteriormente repetir el procedimiento y transducir 5 botellas de cultivo T-150. Este proceso se repitió hasta alcanzar 25 cajas T-150. Las partículas adenovirales fueron purificadas a partir de este sobrenadante.

6.4 Purificación del vector

Para la purificación del vector AdCEM-Luc se usó cloruro de cesio (Merck, EUA, no. cat. 102038), tubos de polialómero (Beckman, Palo Alto CA), Slide-A-Lyzer 10K (Invitrogen, Carlsbad CA, no. cat. 66380), glicerina (Merck, EUA, no. cat. 104094), tris (Amresco, EUA), cloruro de sodio (Merck, EUA, no. cat. 102406), y cloruro de magnesio (Merck, EUA, no. cat. 105833).

A partir de los lisados obtenidos, se separó el exceso de restos celulares centrifugando a 12,000 rpm. durante 5 min. Se recolectó el sobrenadante y se procedió a ultracentrifugar a 35,000 g en un gradiente discontinuo de cloruro de cesio con densidades de 1.4 y 1.2 g/mL durante 60 min a 4 °C. Luego, se recuperó la banda correspondiente a la fase adenoviral, realizando un segundo centrifugado en un gradiente continuo de 1.35 g/mL de cloruro de cesio bajo las mismas condiciones por 18 h, y se recuperó la banda correspondiente a los adenovirus infectivos. Posteriormente, se dializó en un casete Slide-A-Lyzer 10K en una solución amortiguadora de diálisis. Se cambió la solución amortiguadora cada hora por 3 h, teniendo glicerina al 10% en la última solución de diálisis. Finalmente, se recuperó el volumen dializado y se hicieron alícuotas de 100 µL y 50 µL las cuales fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso.

6.5 Titulación en placa del AdCEM-Luc

Se sembraron por triplicado 2×10^3 células de la línea celular permisiva para la replicación adenoviral, HEK-293, en placas de 96 pozos, incubándose hasta alcanzar una confluencia del 40-50%. A continuación, 10 pozos fueron transducidos con las siguientes diluciones: 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , contemplando pozos sin transducir como controles negativos. Al cabo de 10 días de incubación se determinó el título adenoviral observando el ECP en los pozos de las diferentes diluciones. La conversión a *Tissue Culture Infective Dose* (TCID)₅₀/mL a UFP/mL se realizó a través de utilizando el método estadístico de Kärber con la formula $T = 10^{1+d(S-0.5)}$, donde d: Log10 de la dilución y S: sumatoria de los radios (Hamilton 1977). La conversión de TCID₅₀ a UFP fue a raves de la formula $T = 1 \times 10^{\text{TCID}_{50} - 0.7}$ UFP/mL (Q-BIOgene).

6.6 Determinación óptica de partículas virales

Se cuantificaron las partículas de ADN en solución incluyendo las partículas infecciosas y no infecciosas. Se descongeló un vial del adenovirus purificado y se prepararon diluciones 1:2 y 1:5 en un buffer de lisis viral (VLB) el cual contenía SDS 0.1% (Merck, EUA, no. cat. 71726), TRIS-HCl 10 Mm pH:7.4 (Merck, EUA, no. cat. 93362) y EDTA 1 Mm (Merck, EUA, no. cat. EDS-100G), con la cual se prepararon las diluciones mostradas en la tabla 1.

Tabla 1. Diluciones para la determinación de la concentración adenoviral en PV

VLB (μL)	Virus (μL)	Dilución
52	52	1:2 (dilución no.1)
168	42	1:5 (dilución no.2)

Se incubó por 10 min a 56°C en movimiento y luego se preparó 1 mL de solución blanco (VLB mezclado con el amortiguador de diálisis en lugar del volumen de adenovirus). Se determinó la densidad óptica (DO) a 260 nm por triplicado.

6.7 Generación de los nanocomplejos (Ad-nanopartículas)

La formulación del nanocomplejo AdCEM-Luc-NPM para los bioensayos en líneas celulares se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit comercial para magnetofección Magnetofection: AdenoMag (Ozbioscience, San Diego, CA, EUA). Para ello, se tomó en cuenta el rango de cantidad sugerida de AdenoMag, dependiendo del número de partículas virales infecciosas a utilizar, tal y como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Volúmenes recomendados de AdenoMag, dependiendo del número de partículas virales infecciosas a utilizar.

Partículas Infecciosas	Rangos de cantidad sugerida
10^3	0.01 μL – 0.04 μL
10^4	0.1 μL – 0.4 μL
10^5	1 μL – 4 μL

Los nanocomplejos para los bioensayos en los modelos murinos fueron generados siguiendo el protocolo del kit comercial *In Vivo* Viromag (Ozbioscience, San Diego EUA). Los volúmenes recomendados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Volúmenes recomendados de partículas infectivas e *In vivo* ViroMag, por ratón.

Tipo de virus	Titulación de partículas viales (PFU)	<i>In Vivo</i> Viromag (μL)
Adenovirus	1×10^6 a 5×10^8	10-20
AAV	1×10^6 a 5×10^{10}	10-20
Lentivirus	1×10^6 a 5×10^8	10-20

6.8 Caracterización de los Nanocomplejos por microscopía electrónica.

La distribución del tamaño de las partículas se determinó por medio de un analizador de difracción de rayos láser. La morfología superficial fue evaluada por microscopía electrónica de transmisión (TEM, JEOL, 2011), así mismo la altura, magnitud y la imagen de fase fueron analizadas a través de microscopía de fuerza atómica (MFA, NT-MDT NTEGRA, EUA).

Para la visualización de los complejos por MET se utilizó un volumen de 10 μL de AdenoMag y una concentración de adenovirus de 1×10^8 UFP/ mL. Se colocó una gota de 10 μl del complejo en la rejilla de cobre cubierta de carbono de 400 *mesh* (Ted Pella, EUA, cat. no. 01885-F) y se incubó durante 10 min. Las muestras se enjuagaron cuidadosamente con dos gotas de agua bidestilada para eliminar las sales del buffer. Posteriormente se tiñeron con 10 μL de solución acuosa de ácido fosfotúngstico (Merck, EUA, no. cat.455970-10G) al 1% durante 3 minutos. Posteriormente, todas las muestras se secaron al aire antes de la obtención de imágenes a un voltaje de aceleración de 80 kV utilizando MET para una magnificación x 160, 000 (Stilwell et al. 2003).

La preparación de las muestras para su visualización por MFA fue de la siguiente forma: se formaron los nanocomplejos de manera similar al MET, depositando 10 μl del complejo en una mica recientemente cortada y se dejó secar a temperatura ambiente.

6.9 Caracterización de la carga superficial y tamaño de los Nanocomplejos.

El potencial de las partículas de los nanocomplejos fue determinado mediante dispersión de luz electroforética, empleando el equipo Zetasizer ZS90 (Malvern, EUA). Para la medición, los nanocomplejos fueron aforados a 1 ml con agua destilada filtrada y estéril, posteriormente fueron cargados con la ayuda de una jeringa de insulina en una celda capilar plegada (DTS1070, Malvern, EUA).

6.10 Evaluación de la luminiscencia de los Nanocomplejos en líneas celulares no permisivas

La transducción de las células se realizó según el protocolo AdenoMag de la siguiente forma: se cultivaron 1×10^5 células en placas de 96 pozos en 100 μL de DMEM de manera convencional, una vez alcanzado una confluencia del 70-80%, se descartó el medio. La solución A contenía 2 μL nanopartículas magnéticas (NPM) en 50 μL de DMEM libre de suero, mientras que la solución B y C fueron generadas al diluir en 50 μL de DMEM libre de suero 10^6 y 10^7 UFP de AdCEM-Luc para obtener una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y 100, respectivamente. Después se añadió la solución A con la B y A con la C, y se incubaron por 25 min a temperatura ambiente. Finalmente, el volumen final con los nanocomplejos se añadió a las células cultivadas desprovistas del DMEM inicialmente. La exposición al CME se llevó a cabo de manera inmediata a la transducción al colocar la placa de 96 pozos por 25 min en la base magnética (Ozbioscience, San Diego EUA) para después incubarlas en condiciones convencionales (37 °C, 5% CO₂). La medición de luminiscencia se realizó entre 24 h posterior a la transducción. Los grupos experimentales tanto para la línea celular B16-F10 como TC-1, se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Grupos Experimentales *in vitro* inoculados con AdCEM-Luc y condiciones de transducción.

Grupo	NPM	CME
1	No	Si
2	No	No
3	Si	Si
4	Si	No
Negativo	Sin tratamiento	

Para medir la capacidad de expresión del vector AdCEM-Luc en las células B16-F10 y TC-1 no permisivas se utilizó el protocolo del kit *One Glo Luciferase Assay System* (Promega, Madison, Wisconsin EUA, no.cat. E6130) de la siguiente manera: una vez cumplidos los tiempos de incubación de las células en placas de cultivo de 96 pozos, se agregó a cada pozo 100 μL de reactivo de lisis/luciferina para obtener un volumen de 200 μL incubándolas por 10 min. Una vez lisadas las células transducidas se tomaron 100 μL por pozo de una placa de 96 pozos especial de fondo blanco para su medición en el luminómetro Veritas™ Microplate Luminometer (Promega, EUA). Los niveles de

luminiscencia se obtuvieron al comparar las lecturas de los cultivos celulares transducidos con los nanocomplejos AdCEM-Luc-NPM y los controles negativos sin tratamiento.

6.11 Evaluación de los Nanocomplejos en modelos murinos

Para evaluar el efecto de los nanocomplejos *in vivo* se utilizaron ratones a C57BL/6 de 8 semanas de edad, con pesos comprendidos entre 25-30 g por grupo. A los ratones se les inoculó subcutáneamente 1×10^5 células B16-F10 en el área del muslo. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 100-200 mm³ los ratones fueron divididos en grupos experimentales ($n = 3$), contemplando el método de inoculación de manera sistémica por punción intravenosa (vena caudal), como de manera intratumoral por punción directa en el sitio del tumor. Los grupos experimentales se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Grupos Experimentales *in vivo* inoculados con AdCEM-Luc, tipo de inoculación y condiciones de transducción

Inoculación	Grupo	NPM	CME
Intratumoral	1	No	Si
	2	No	No
	3	Si	Si
	4	Si	No
	Negativo	Sin tratamiento	
Sistémica	1	Si	No
	2	No	No
	3	Si	Si
	4	No	Si
	Negativo	Sin tratamiento	

La generación de los nanocomplejos AdCEM-Luc-NPM fue realizada según las indicaciones del protocolo comercial *In vivo* Viromag (Ozbioscience, San Diego EUA) de la siguiente forma: 2×10^8 UFP de AdCEM-Luc y se mezclaron con 10 μ L del reactivo *In vivo* VirMag y se incubaron 20 min a temperatura ambiente. Posterior a la inoculación, los ratones fueron anestesiados con Zoletil 100 (Tiletamina y Zolazepam, 100 mg/kg) y se les colocó un magneto de neodimio directamente sobre el tumor por 30 min. Después de 24 h de la exposición al magneto, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, extrayendo los tumores para la determinación del efecto del tratamiento, así como órganos de interés (corazón, pulmones, hígado, bazo y riñones) para corroborar la

biodistribución de los nanocomplejos y los adenovirus en los modelos. Los tumores y órganos fueron sumergidos en una solución de PBS para eliminar restos de sangre y tejido y almacenados a -80°C hasta su procesamiento y medición.

6.12 Procesamiento de los tejidos extraídos

Las muestras congeladas fueron seccionadas en trozos pequeños ($< 0.5\text{ cm}$) con un bisturí e inmediatamente colocadas en $500\ \mu\text{L}$ de Buffer RIPA frío (TIRS-HCl 25 mM pH:7.6 (Merck, EUA, no. cat. 93362), NaCl 150 Mm (Merck, EUA, no. cat. S9888), EDTA 5 Mm (Merck, EUA, no. cat. EDS-100G), Triton X 100 al 1% (Merck, EUA, no. cat. X100PC), Desoxicolato de sodio 1% (Merck, EUA, no. cat. D6750, SDS 0.1%) y $10\ \mu\text{L}$ de PMSF 100 mM (Merck, EUA, no. cat. PMSF-RO) como inhibidor de proteasas. Posteriormente, las muestras se procesaron en el equipo TissueLyser (Qiagen, EUA) según las indicaciones del protocolo de extracción de proteínas de tejidos humanos o animales. Para ello, se colocaron tubos de microcentrifuga de 2 ml que contenían 1 esfera de acero inoxidable (diámetro medio de 5 mm) en hielo seco durante al menos 15 min , así como el inserto del adaptador del TissueLyser. Después se transfirieron trozos pequeños de los tejidos congelados a los tubos pre-enfriados y se incubó durante otros 15 min en hielo seco. Posteriormente se colocaron los tubos en el inserto del adaptador TissueLyser y se incubó a temperatura ambiente durante un máximo 2 min , de tal modo que el tejido no se descongelara, resultando en potencial degradación de proteínas. Al terminar la incubación se le agregó inmediatamente $500\ \mu\text{L}$ del buffer RIPA a cada tubo, se colocaron en el adaptador y se operó durante 5 min a 50 Hz .

Como alternativa al procesamiento por TissueLyser, los cultivos celulares cortaron en trozos pequeños, se maceraron las muestras con micropistilos para posteriormente homogenizarlos por vortex 15 min . Después de centrifugarlos 15 min a $14,000\text{ rpm}$ se recuperó el sobrenadante y se agregaron $250\ \mu\text{L}$ del buffer de lisis al pellet repitiendo los pasos anteriores para obtener nuevamente el sobrenadante y agregarlo al inicialmente obtenido. Se utilizó como alternativa el Buffer de lisis (HEPES 70 mM (Merck, EUA, no. cat. 54457), MgSO_4 7 mM (Merck, EUA, no. cat. 208094, DTT 3 mM (Merck, EUA, no. cat. D0632), BSA al 1% (Merck, EUA, no. cat. A8531) y un coctel de inhibidores de proteasas (Merck, EUA, no. cat. P1860-1M). Para el ajuste de pH de los

extractos se utilizó HCl (Merck, EUA, no. cat.320331) al 0.1 M o NaOH al 0.1 M (Merck, EUA, no. cat. S8045).

Para la medición de luminiscencia de extractos de tejidos, se tomaron 100 μ L del sobrenadante de los extractos de los tejidos y se les dio el tratamiento anteriormente mencionado en la medición de luminiscencia en líneas celulares.

6.13 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la evaluación de las transfecciones se determinó si hay diferencia entre los grupos mediante la prueba de ANOVA seguida por la prueba de Tukey no paramétrico para la comparación múltiple de medias utilizando el programa SPSS versión 17.0. La n utilizada en los grupos experimentales de los bioensayos *in vivo* fue determinada utilizando la ley de Rendimientos decrecientes (*Law of diminishing return*) concretamente el método de la ecuación de recurso (*resource equation method*) (Charan and Kantharia 2013; Arifin and Zahiruddin 2017).

7. RESULTADOS

El adenovector AdCEM-Luc fue generado en trabajos previos (Sesatty 2015) utilizando el sistema AdEasy Adenoviral Vector System. El promotor CEM de respuesta a campos electromagnéticos y el gen reportero de luciferasa fue obtenido del pCEM (Rodríguez de la Fuente et al. 2009), posteriormente la construcción adenoviral se generó a través de la recombinación homóloga entre el pShuttle pCEM-Luc y el plásmido poseedor del genoma adenoviral pAdeasy. Las partículas adenovirales iniciales fueron generadas a través de la transfección de células HEK-293 con el pAdCEM-Luc, corroborando la capacidad de transducción del gen reportero de las partículas adenovirales resultantes haciendo uso de esta misma línea celular.

Producción y purificación adenoviral

La purificación de los adenovirus se realizó exitosamente por ultracentrifugación, dando como resultado las bandas correspondientes a las partículas virales defectuosas (menos pesadas) e infectivas en el gradiente discontinuo (Figura 5A) y finalmente la banda de las partículas infectivas presentes del gradiente continuo (Figura 5B).

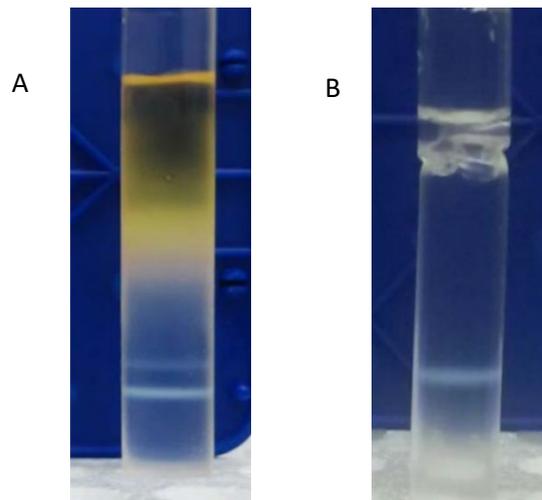


Figura 5. Resultados de la ultracentrifugación. A) Bandas formadas en el gradiente discontinuo; la fase superior está compuesta por partículas defectuosas y en la inferior se encuentran las partículas infectivas. B) Banda formada por el gradiente continuo mostrando la banda de las partículas infectivas.

Titulación en placa del AdCEM-Luc

El resultado de la titulación en placa del AdCEM-Luc se presentó a través de la detección del ECP, el cual es un cambio en la morfología celular correlacionado directamente a la replicación del adenovirus en las células permisivas HEK-293 (Figura 6).

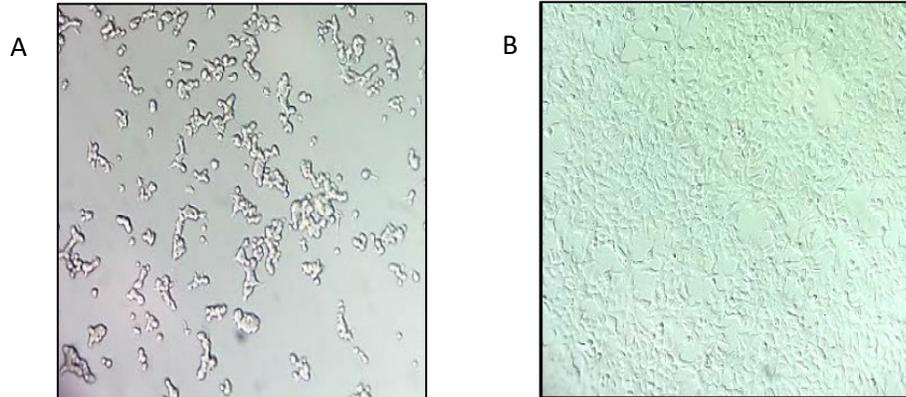


Figura 6. Titulación del AdCEM-Luc. Se realizó la titulación en placas de 96 a través de diluciones del de 10^{-3} a 10^{-10} del concentrado de AdCEM-Luc en células HEK-293 para detectar ECP (A). Control negativo sin transducir (B).

La concentración de ambas producciones se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Concentración de AdCEM de las producciones adenovirales

Titulación	Primera producción	Segunda producción
Radio	8.3	9.3
TCID ₅₀ /mL	10^{10}	$10^{10.8}$
UFP/mL	1×10^{10}	6×10^{10}
PV/mL (260nm)	2.7×10^{13}	2.8×10^{13}

Caracterización Ad-nanopartículas magnéticas por MFA y MET

Las nanopartículas y los adenovirus se visualizaron mediante MFA y MET. Las imágenes de las nanopartículas comerciales AdenoMag observadas por MFA mostraron estructuras pseudo piramidales en su mayoría, de tamaños oscilantes de entre 100 a 400 nm. Las muestras de adenovirus mostraron estructuras con los tamaños reportados de 90-110 nm. Las imágenes obtenidas se observan en la Figura 7.

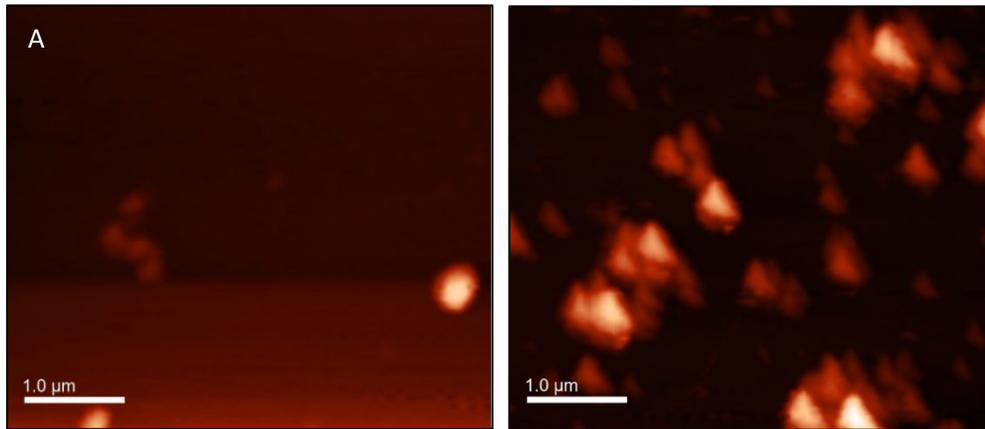


Figura 7. Imágenes obtenidas por MFA. Se observan artefactos con tamaños correspondientes a partículas adenovirales (A) y estructuras con tamaños variables correspondientes a las nanopartículas (B).

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión mostraron la presencia de los adenovirus en la tinción negativa (Figura 8A), así mismo se observaron estructuras de magnetita presentes en las preparaciones para las NPM (Figura 8B) y de los nanocomplejos (Figura 8C).

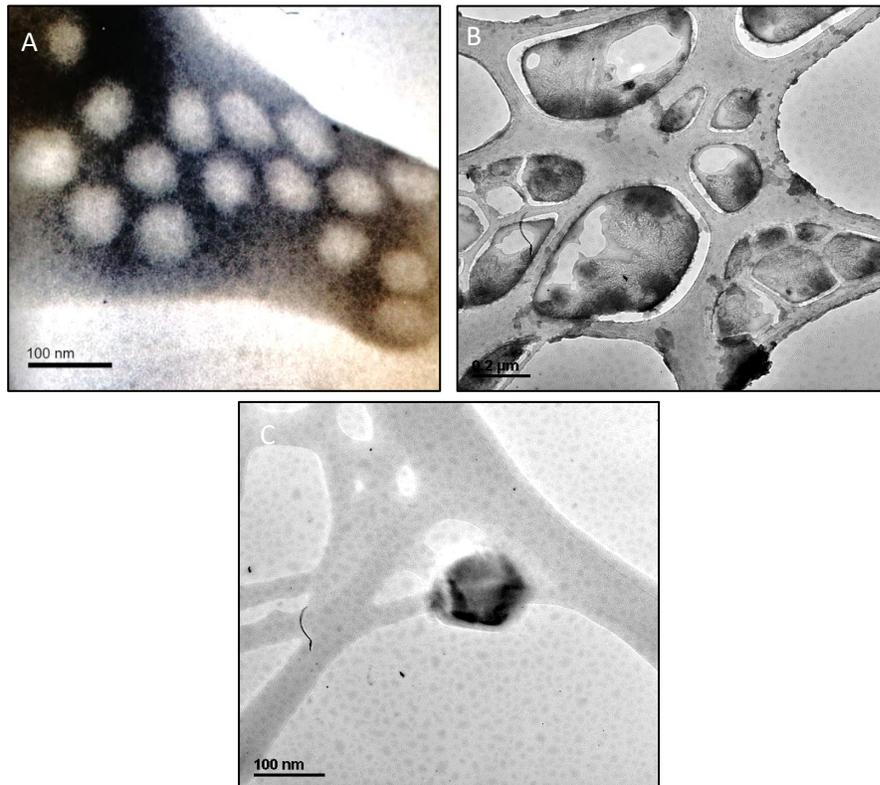


Figura 8. Imágenes obtenidas por MET. Se observan las partículas AdCEM-Luc (A), las NPM (B) y los nanocomplejos AdCEM-Luc-NPM (C).

Determinación del potencial Z

El potencial Z fue utilizado para evaluar la estabilidad de la suspensión y la adhesión de partículas a los sistemas biológicos, específicamente, la interacción de los nanocomplejos con la membrana celular. Los resultados de los nanocomplejos arrojaron un potencial Z ligeramente positivo de 6.55 mV (Figura 9).

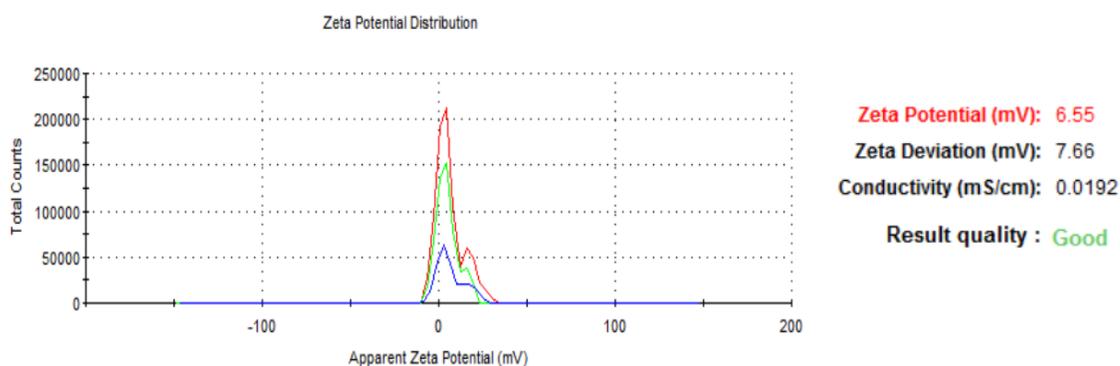


Figura 9. Resultados del potencial Z de los nanocomplejos.

Evaluación de los nanocomplejos en líneas celulares

Para medir la capacidad de modulación del promotor CEM ante la exposición a un CME se utilizaron células murinas de melanoma B16-F10 y cáncer cervicouterino TC-1 no permisivas para la replicación adenoviral, las cuales fueron transducidas tanto con los nanocomplejos como con los adenovirus desnudos.

Acorde a la hipótesis planteada las células B16-F10 transducidas con los nanocomplejos AdCEM-Luc-NPM mostraron una expresión de la luminiscencia altamente significativa al ser expuestos al CME en comparación a los nanocomplejos, a los adenovirus desnudos y el control negativo sin exposición (Figura 10).

Por otro lado, los resultados obtenidos en las células TC-1 transducidas con los nanocomplejos y los adenovirus desnudos mostraron niveles de expresión altamente significativos tanto en presencia y ausencia de un campo electromagnético externo (Figura 11).

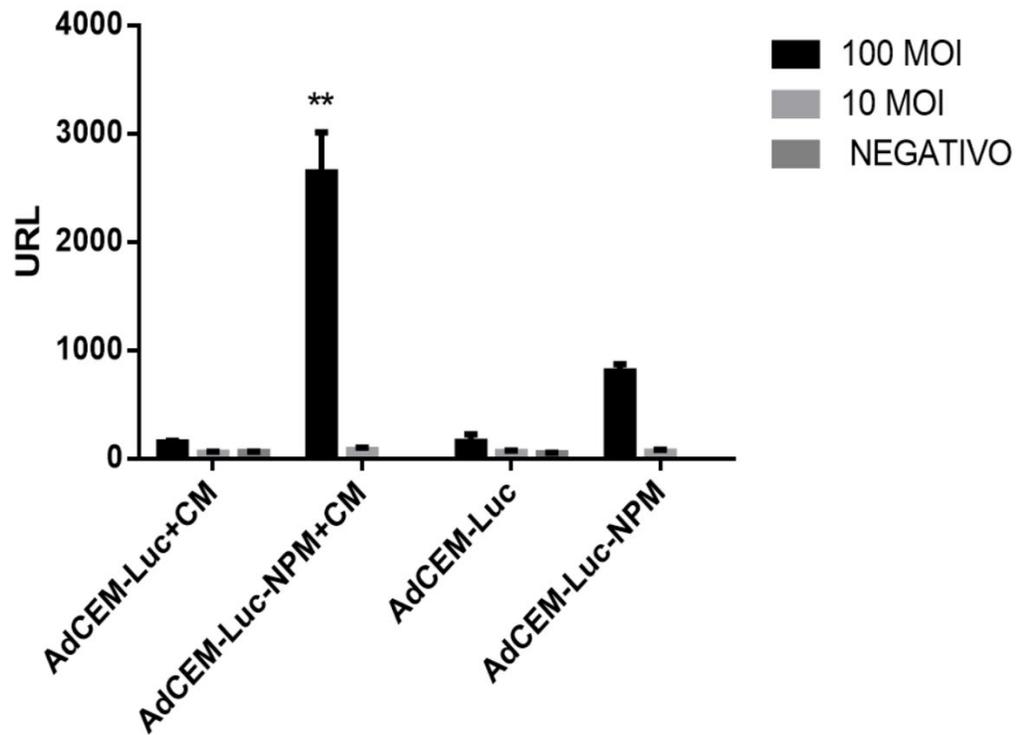


Figura 10. Medición de la luminiscencia de las células B16-F10 transducidas con los nanocomplejos y los adenovirus desnudos, con exposición y sin exposición a un CME.

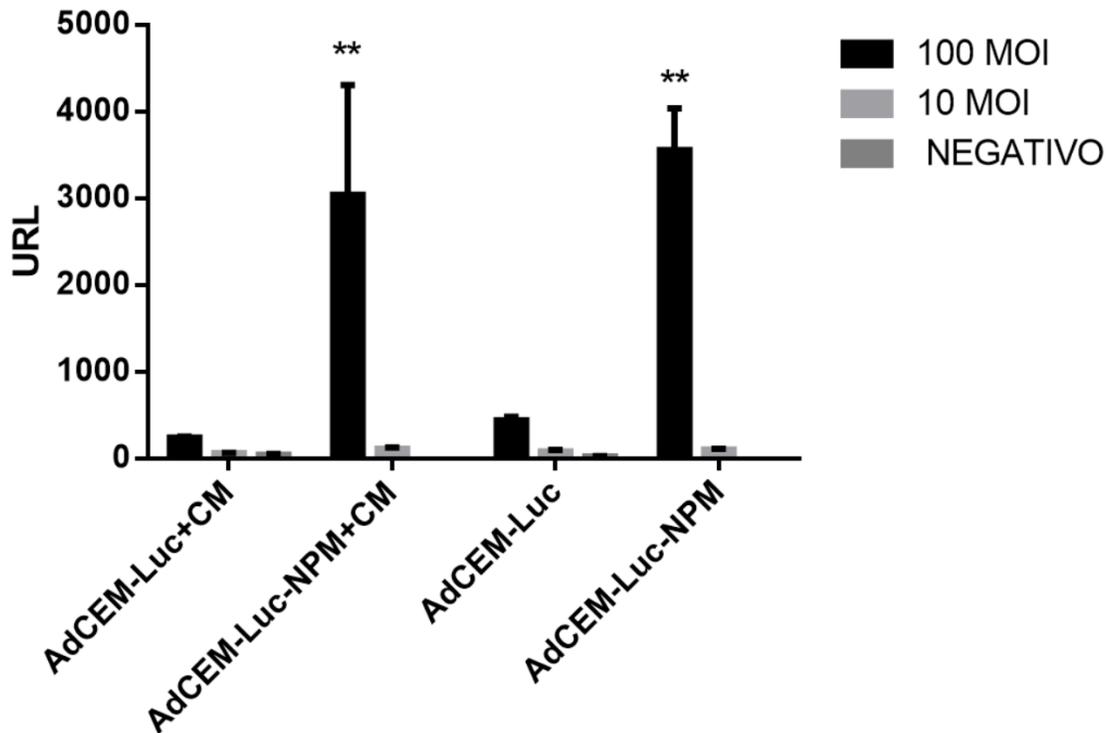


Figura 11. Medición de la luminiscencia de las células TC-1 transducidas con los nanocomplejos y los adenovirus desnudos, con exposición y sin exposición a un CME.

Evaluación de los nanocomplejos en modelos animales

En un periodo de 10 a 15 días posterior a la inoculación intradérmica de 1×10^5 células B16-F10 en el muslo derecho de los ratones C57BL/6, se obtuvieron tumores de 1 cm^3 con una tasa de éxito del 80%. Posterior al tratamiento intratumoral o sistémico y exposición al magneto, se analizaron el tumor, como el corazón, pulmones, hígado, riñones y bazo. El tumor presentó una distribución esferoide con coloración oscura de consistencia gelatinosa fácilmente disgregable una vez comprometida la cápsula tumoral o membrana de contención. Los órganos presentaron morfología normal en la mayoría de los casos tomando en cuenta el tamaño, la consistencia y el color (Figura 12).

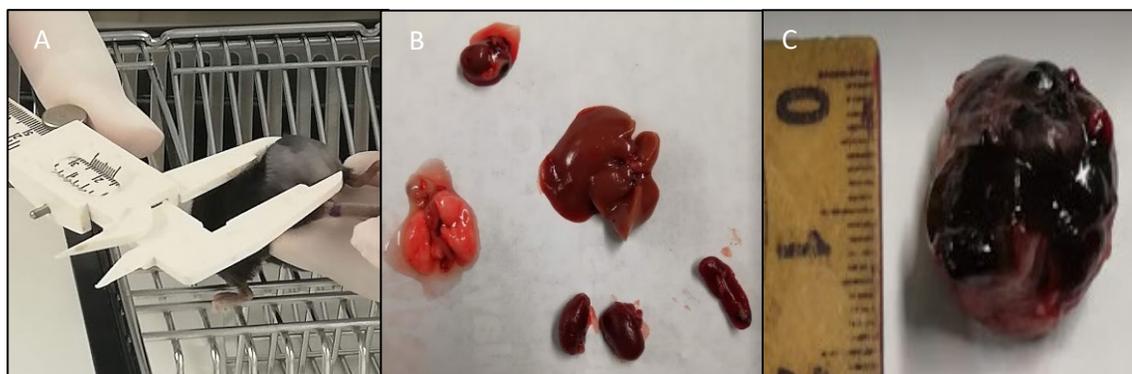


Figura 12. Ratones C57BL/6 que desarrollaron tumor en el muslo post inoculación de células B16-F10, tratamiento y exposición al CME. A) Los ratones fueron aptos para la inoculación del tratamiento una vez que alcanzó aproximadamente 1.5 cm^3 . B) Los órganos extraídos para su análisis morfológico fueron el corazón (superior), hígado (parte central), bazo (extremo inferior derecho), riñones (inferior) y pulmones (izquierdo). C) Melanoma B16-F10 encapsulado.

Se procesó la totalidad de tumores y órganos obtenidos tanto de la inoculación sistémica como la intratumoral. Los resultados de los tumores disgregados en el *Tissuelyser* fueron similares a los controles negativos (Figura 13). Para evaluar si el método de disgregación mecánica estuviera interfiriendo en la producción de luminiscencia se repitió el protocolo de disgregación únicamente al control positivo (sobrenadante de células HEK-293 transducidas con AdCEM-Luc posterior a ciclos de congelación y descongelación). Los resultados muestran que la muestra positiva procesada en el *Tissuelyser* disminuyó significativamente sus niveles de luminiscencia en comparación con el control sin procesar (Figura 14).

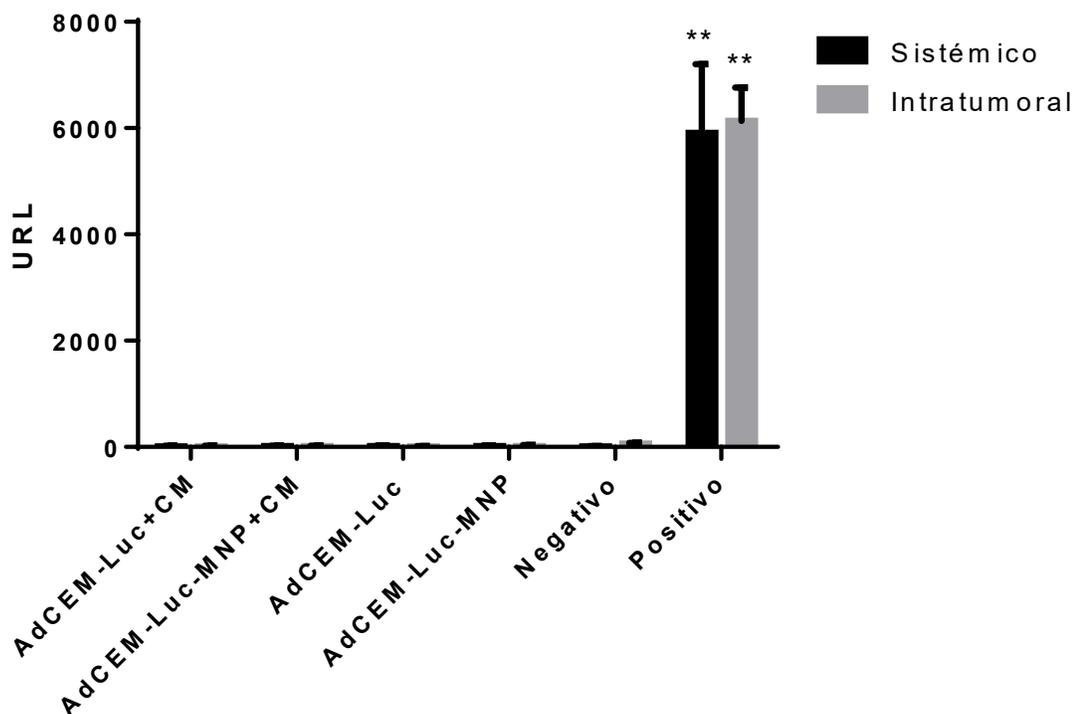


Figura 13. Luminiscencia obtenida por las transducciones de los nanocomplejos en modelos murinos C57BL/6 que desarrollaron tumor en el muslo.

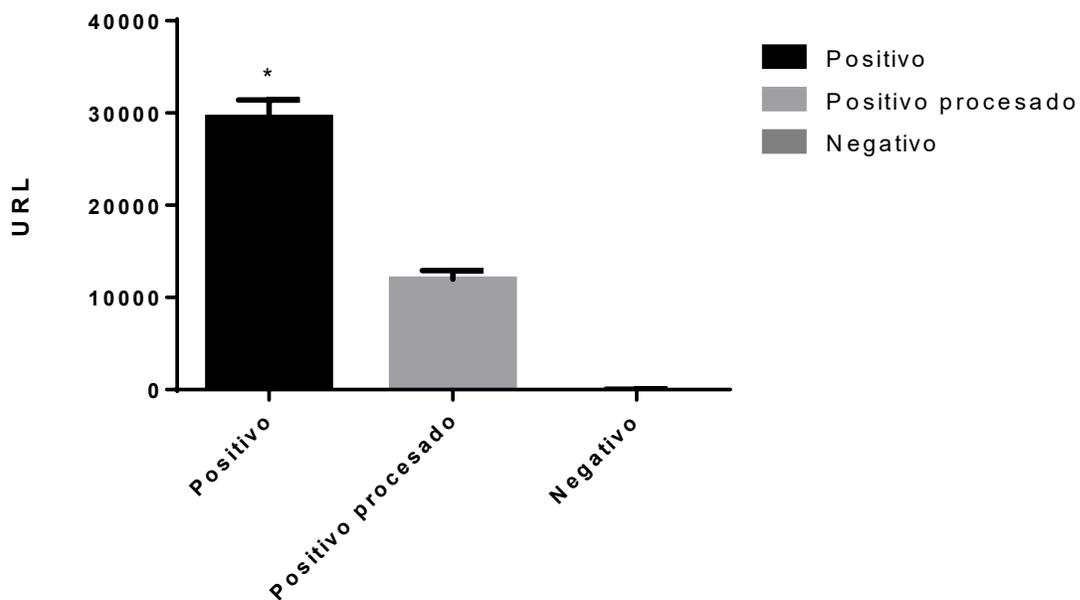


Figura 14. Medición de luminiscencia del control positivo posterior al tratamiento del Tissuelyser.

Al descartar la disgregación de los tumores por el Tissuelizer, fragmentos de los tumores fueron macerados manualmente con micropistilos y disgregados con el Buffer RIPA. A pesar de dicha medida, los resultados obtenidos de los tumores procesados fueron similares al control negativo (Figura 15).

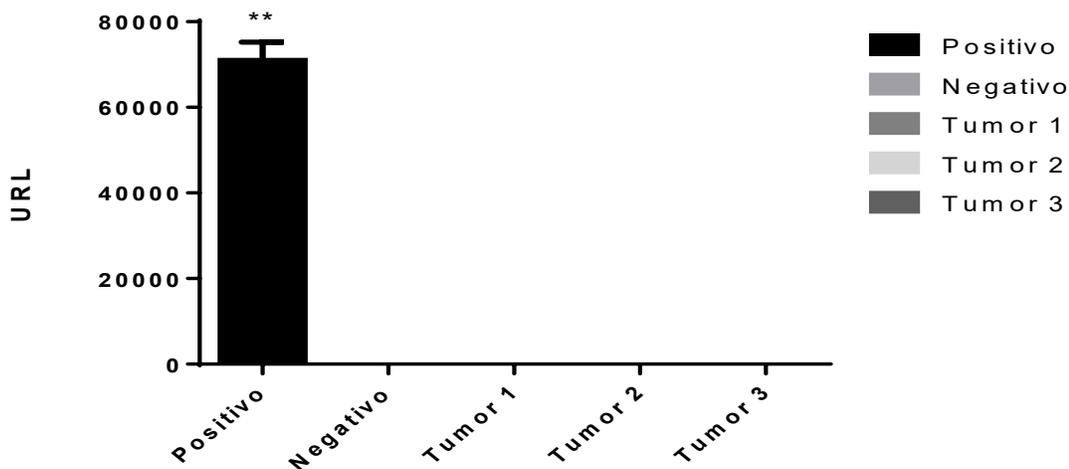


Figura 15. Medición de luminiscencia de los tumores macerados con micropistilos.

Una vez descartado el procesamiento mecánico de las muestras, se evaluaron los reactivos utilizados para la lisis celular haciendo uso del control positivo en una proporción 1:1. Los resultados muestran que el uso de buffer RIPA inhibe la generación de luminiscencia en comparación con la mezcla del control positivo mezclado con PBS, el control positivo mezclado el coctel de inhibidores de proteasas y el control positivo mezclado con un buffer de lisis alternativo (HEPES), los cuales generaron niveles de luminiscencia similares al control positivo (Figura 16). Así mismo se evaluó la luminiscencia de los tumores procesadas con buffer HEPES (Figura 16, barra 7), sin embargo, los resultados en cuanto a la emisión de luminiscencia fueron similares al control negativo.

Para corroborar que las características bioquímicas inherentes al tumor fueran la causa de la inhibición de la luminiscencia, se inocularon ratones con el AdCEM-Luc desnudo y los nanocomplejos AdCEM-Luc respectivamente en el muslo de ratones C57BL/6 sin tumor, lo cuales fueron expuestos al CME por 30 minutos, sacrificados y tomada su biopsia muscular (Figura 17).

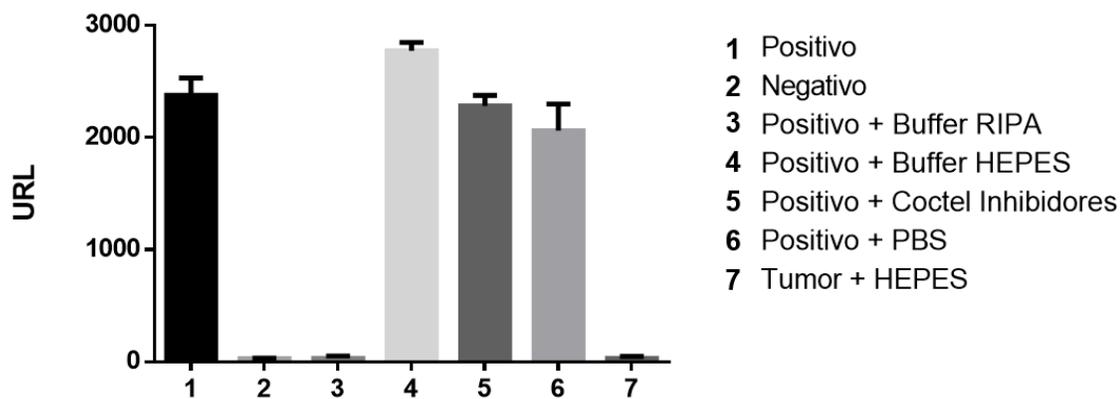


Figura 16. Medición de luminiscencia de los tumores macerados con micropistilos y haciendo uso del buffer RIPA sin el agente quelante (EDTA).

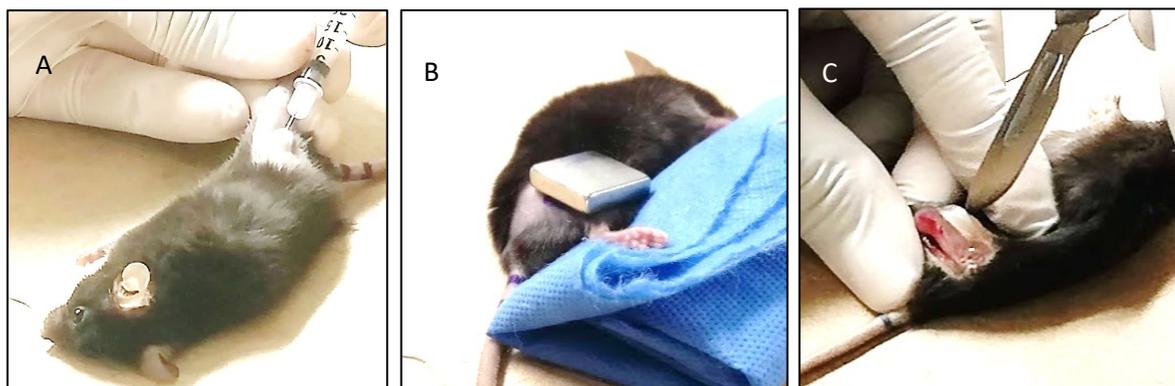


Figura 17. Ratones C57BL/6 sin tumor. A) inoculación intradérmicamente de los tratamientos, con generación de ampulla; B) exposición al CME por 30 minutos y C) toma de biopsia posterior al sacrificio.

Los resultados de las biopsias inoculadas con el AdCEM-Luc desnudo y el nanocomplejo AdCEM-Luc-NPM fueron similares al control negativo, sin embargo, los extractos de estas biopsias no inhibieron la producción de luminiscencia al mezclarlas en una proporción 1:1 a diferencia del uso de los extractos de los tumores (Figura 18).

Finalmente, los tumores de los ratones en los que se les administraron por vía intratumoral los tratamientos con AdCEM-Luc y los nanocomplejos AdCEM-Luc fueron procesados, dando como resultados niveles de luminiscencia similares al control negativo (Figura 19).

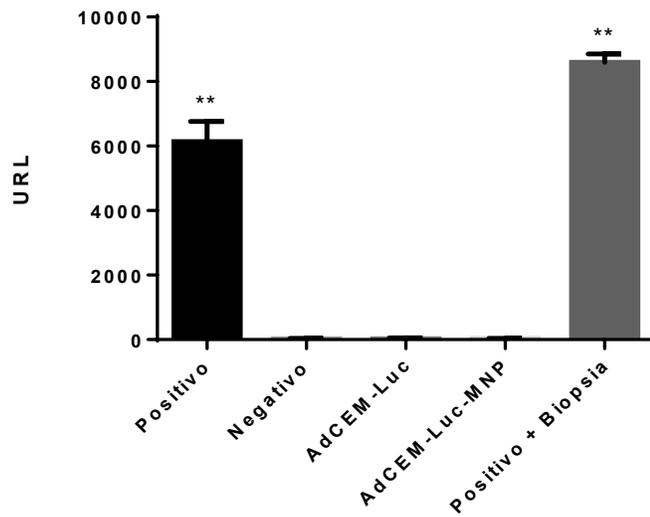


Figura 18. Luminiscencia obtenida de los tratamientos en ratones sin tumor. Positivo sobrenadante de células HEK-293 transducidas con AdCEM-Luc.

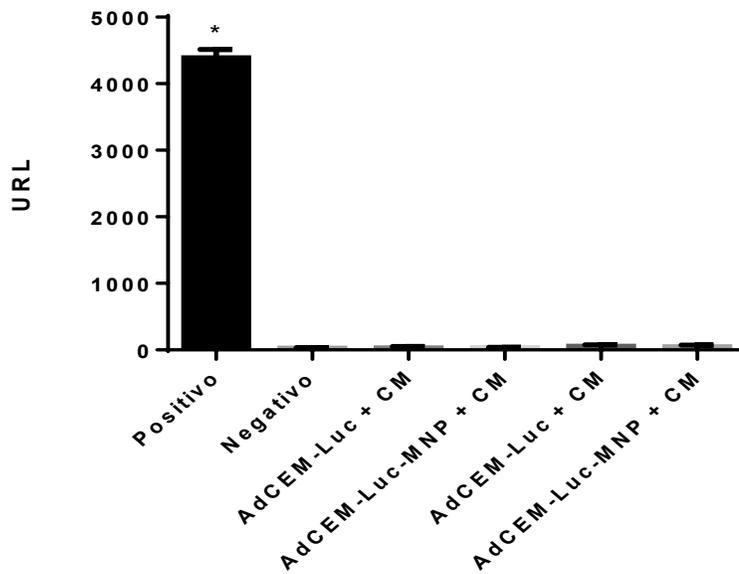


Figura 19. Luminiscencia obtenida de las transducciones de ratones con tumor B16-10 inoculado por vía intratumoral. Positivo sobrenadante de células HEK-293 transducidas con AdCEM-Luc.

8. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto de la expresión del gen de luciferasa mediado por un nanocomplejo formado por adenovirus recombinante y nanopartículas magnéticas bajo la influencia de un CME. La producción se hizo escalonando la producción del AdCEM-Luc en células empaquetadoras HEK-293 y posteriormente mediante la purificación en gradientes de CsCl, como se ha reportado anteriormente (Zeng et al. 2001).

El ECP observado en las células HEK-293 corresponde a los cambios morfológicos generados por la producción de cuerpos vacuolares, turgencia celular e islas de lisis atribuidos a la replicación adenoviral, como se ha reportado previamente (Rowe et al. 1953). Así mismo, los títulos de UFP y de partículas virales son los esperados al hacer uso de este sistema de producción adenoviral comercial AdEasy (Q-BIOgene).

La caracterización de los nanocomplejos AdCEM-Luc-NPM a través de la microscopia electrónica MET y MFA mostró variabilidad en cuanto a tamaño por parte de las nanopartículas. Esta variabilidad pudo deberse tanto a la aglomeración de las NPM generada por el periodo de almacenamiento como las características propias de las tinciones utilizadas de manera independiente para cada método, así como el no generar una disgregación adecuada.

Los adenovirus pudieron ser observados en los tamaños reportados en la literatura (Baron 1996). Los nanocomplejos fueron identificados solo a través el MET, presentando el tamaño y estructura propia de los adenovirus, cubiertos con formaciones de magnetita correspondiente a las nanopartículas comerciales. Es conveniente mencionar que el proveedor (*Oz Bioscience*) no proporciona imágenes de microscopía electrónica de sus productos comerciales, de tal modo que no es posible realizar comparaciones con las imágenes obtenidas.

Los valores de potencial z obtenidos para el AdCEM-Luc-NPM fueron inferiores a los reportados en otros trabajos (Tresilwised et al. 2010; Bhattarai et al. 2008b; Choi et al. 2015), sin embargo son ligeramente positivos, lo cual favorece a la interacción con la membrana celular (Bondar et al. 2012).

La transducción de AdCEM-Luc-NPM en células no permisivas como la B16-F10 produjo mayor expresión con diferencia estadísticamente significativa del gen de luciferasa después de la exposición a CEM en comparación con las células sin exposición. Además, el MOI que presentó mejores resultados fue de 100 en comparación con una MOI de 10. Estos resultados indican que la activación del promotor del nanocomplejo AdCEM-Luc-NPM ocurre cuando se expone a un CME, permitiendo superar las incapacidad del adenovector desnudo de infectar este linaje celular que no posee receptores CAR, acorde a lo reportado en otros trabajos (Tresilwised et al. 2010; Sharma et al. 2012; Ganly et al. 2000).

Sin embargo, a pesar de obtener niveles de luminiscencia elevados y altamente significativos al transducir la línea TC-1 con los nanocomplejos AdCEM-Luc-NPM en comparación con los controles, estas mediciones fueron obtenidas tanto en presencia como en ausencia a la exposición a CME. Por ello, no se le puede atribuir en primer instancia a la activación del promotor CEM, lo que puede ser contradictorio con los resultados anteriores (Alvizo Báez C.A. 2014; Heredia-Rojas et al. 2010; Rodriguez de la Fuente et al. 2009). Esta situación puede explicarse debido a las características inherentes de la línea celular que expresa las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma las cuales actúan de manera homóloga a las deletadas en los adenovirus (E1A y E1B) dificultando la detección de una diferencia en la expresión del nivel de luciferasa (Lin et al. 1996; Yim and Park 2005; Steinwaerder et al. 2001; Smahel et al. 2005). Por otro lado, la falta de luminiscencia al hacer uso de los adenovectores desnudos puede deberse a que la incapacidad de los Ad5 para infectar líneas de origen murino reportadas en otros trabajos (Blair et al. 1989; Ganly et al. 2000).

Mientras que las NPM se han utilizado ampliamente con resultados prometedores en la expresión génica (Chorny et al. 2006; Sun et al. 2009), el uso de AdCEM-Luc-NPM activado por CEM provoca una expresión génica significativamente mayor. Se ha reportado que la exposición a los CEM provoca cambios biológicos, incluida la modificación de la expresión génica (Zeni et al. 2017). Un vector pCEM previamente construido se transfectó en líneas celulares INER-37 y RMA E7, que luego se expusieron a CEM. Las células INER-37 expuestas a CEM mostraron una mayor expresión del gen

de luciferasa, mientras que las células RMA E7 expuestas a CEM no mostraron diferencias en la expresión de luciferasa (Heredia-Rojas et al. 2010).

Los ratones C57BL/6 presentaron indicios de tumor en un periodo de 4 – 7 días después de ser inoculados intradérmicamente con B16-F10. El tamaño de los tumores alcanzó la medida necesaria entre los 10 y 15 días post inoculación acorde al protocolo reportado previamente (Overwijk and Restifo 2001). Los órganos extraídos de los ratones en los cuales se les inoculó células y AdCEM-Luc desnudos o AdCEM-Luc-NPM de manera sistémica e intratumoral no mostraron cambios relevantes en la morfología, color o tamaño en la mayoría de los ratones. Los resultados obtenidos en el procesamiento de los tumores son contradictorios con otros trabajos (Zhong et al. 2011), en donde se generó un adenovector con el gen reportero de luciferasa conjugado con quitosano y NaHCO₃ inoculando tumores intratumorales B16-F10 en el modelo C57BL/6. Una ventaja de este estudio es que la luminiscencia fue detectada por bioimagen en los modelos murinos vivos inoculados con luciferina, sin realizar el procesamiento mecánico o químico que generara estrés celular de los tumores con una posible acción proteolítica.

Estos resultados contrastan también con los resultados obtenidos en trabajos previos en donde el plásmido pCEM-Luc fue inoculado intradérmicamente en ratones BALB/c y expuestos a un CEM, encontrando una diferencia significativa en la expresión del gen de luciferasa en comparación con el grupo control (Rodríguez de la Fuente et al. 2009). De igual forma, los resultados del presente estudio contrastan con los reportados previamente, en donde también hubo diferencia significativa en los niveles de luminiscencia obtenidos al administrar por vía intratraqueal el pCEM-Luc acompañado con quitosano y nanopartículas magnéticas en los pulmones de ratones BALB/c previamente inoculados con células B16-F10 y expuestos al CEM (Alvizo Báez C.A. 2014). Estos resultados posteriormente fueron corroborados al usarse como un sistema de administración al inducir la apoptosis y la inhibición del crecimiento de melanoma después de la inducción del gen selectivo TRAIL (Alvizo-Baez et al. 2016).

Sin embargo, en estudios anteriores no se procesaron los tumores intradérmicos encapsulados, como en el presente trabajo. A pesar de generar diferentes modificaciones al protocolo de procesamiento de los tumores, los extractos obtenidos inhibieron la emisión de luminiscencia del control positivo, con excepción de los extractos de las

biopsias de tejido sano de los ratones no inoculados. Por lo tanto, las condiciones intrínsecas propias del tumor y su microambiente una vez sometidos a la lisis celular, probablemente generan condiciones no propicias para la detección de la luminiscencia, lo cual pudiera estar enmascarando la transducción exitosa de los nanocomplejos AdCEM-Luc-NPM en este modelo.

9. CONCLUSIONES

- Se construyó un nanodispositivo conformado por un adenovector recombinante con un promotor inducible por campos electromagnéticos asociado a nanopartículas (AdCEM-Luc-NPM) para determinar el efecto de expresión potenciado en las líneas celulares, así como en modelos murinos.
- Las partículas adenovirales fueron generadas a través de la transfección de células HEK-293 y se corroboró su capacidad de transducción.
- Se determinó que la concentración de AdCEM en dos producciones fue de 1×10^{10} y 6×10^{10} UFP/mL, respectivamente.
- Se observó la presencia de los adenovirus y nanopartículas por separado por MFA y MET, y estructuras de magnetita presentes en las preparaciones para las NPM y de los nanocomplejos.
- El potencial Z de los nanocomplejos fue ligeramente positivo de 6.55 mV.
- La capacidad de transducción de un nanodispositivo AdCEM-Luc-NPM presenta niveles de transducción más altos a los detectados por la aplicación del adenovector desnudo en presencia de un CME en las líneas celulares de melanoma B16-F10 y TC-1, pero en ésta última la modulación del promotor está enmascarada por la permisividad replicativa adenoviral.
- Se obtuvieron tumores con una tasa de éxito del 80% en un modelo murino posterior 10 a 15 días de inoculación intradérmica de células B16-F10.
- La transducción de los nanocomplejos *in vivo* determinó que la luminiscencia fue inhibida por factores inherentes al tumor.
- Esto representa el primer estudio de un nanocomplejo AdCEM-Luc-NPM controlado por un CME que permite la manipulación de la expresión génica en células tumorales, lo cual puede aplicarse en terapia génica dirigida sitio-temporalmente a un tejido tumoral.

10.PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo motivan a continuar con experimentos que evalúen la capacidad de transducción del AdCEM-Luc, haciendo uso de otras nanopartículas magnéticas en suficiencia para encontrar la mejor proporción AdCEM-Luc/ NPM para la transducción de su gen reportero, explorar el uso de otros modelos murinos como el BALB/c y la inoculación de otros tumores sólidos diferentes a melanoma.

Así mismo, explorar la incorporar polímeros catiónicos como el quitosano o el PEG a los nanocomplejos, así como el uso del Ibox para la visualización y biodisposición de la luminiscencia en el modelo *in vivo* son alternativas interesantes para continuar con esta línea de investigación.

Otro punto importante para mejorar estos resultados es buscar alternativas comerciales los buffers de lisis para el procesamiento de tejidos, así como el uso de inhibidores de proteasas específicos para cultivo de tejidos eucarióticos.

Por último, estos resultados promueven la generación de otros adenovectores recombinantes que posean el promotor de respuesta a campos magnéticos (CEM) pero con la capacidad de transducir otros genes reporteros como la *Green Florescent Protein* (GFP) con el objetivo de facilitar la evaluación de la capacidad de transducción *in vitro* e *in vivo*, así como de genes terapéuticos como la timidina quinasa (TK) para evaluar la acción antitumoral de estos vectores controlados por un CME para su futura aplicación en tratamientos experimentales de terapia génica para combatir problemáticas de salud pública como es el cáncer.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agilent Technologies, I 2016. AdEasy Adenoviral Vector System. Instruction Manual.
<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/240009.pdf>.
- Akhtar, S 2006. Non-viral cancer gene therapy: beyond delivery. *Gene Ther*, 13: 739-40.
- Almstatter, I, Mykhaylyk, O, Settles, M, Altomonte, J, Aichler, M, Walch, A, Rummeny, EJ, Ebert, O, Plank, C & Braren, R 2015. Characterization of magnetic viral complexes for targeted delivery in oncology. *Theranostics*, 5: 667-85.
- Alvizo-Baez, CA, Luna-Cruz, IE, Vilches-Cisneros, N, Rodriguez-Padilla, C & Alcocer-Gonzalez, JM 2016. Systemic delivery and activation of the TRAIL gene in lungs, with magnetic nanoparticles of chitosan controlled by an external magnetic field. *Int J Nanomedicine*, 11: 6449-6458.
- Alvizo Báez C.A., LCIE, Rodríguez Padilla M.C., and Alcocer González J.M. 2014. Magnetic Nanoparticles of Chitosan for Targeted Delivery System of Plasmids to the Lungs. *Journal of Nanotechnology*, Volume 2014,: 5 pages.
- Arifin, WN & Zahiruddin, WM 2017. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *Malays J Med Sci*, 24: 101-105.
- Azanza, MJ & Del Moral, A 1994. Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Prog Neurobiol*, 44: 517-601.
- Balmori, A 2003. Aves y telefonía móvil. Resultados preliminares de los efectos de las ondas electromagnéticas sobre la fauna urbana. *El Ecologista*, 36: 40-42.
- Balode, S 1996. Assessment of radio-frequency electromagnetic radiation by the micronucleus test in bovine peripheral erythrocytes. *Science of the Total Environment*, 180: 81-85.
- Baron, S 1996. *Medical microbiology : general concepts study guide*, Galveston, Tex., University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Barteri, M, Pala, A & Rotella, S 2005. Structural and kinetic effects of mobile phone microwaves on acetylcholinesterase activity. *Biophys Chem*, 113: 245-53.
- Beason, RC & Semm, P 2002. Responses of neurons to an amplitude modulated microwave stimulus. *Neurosci Lett*, 333: 175-8.

- Bergelson, JM, Cunningham, JA, Droguett, G, Kurt-Jones, EA, Krithivas, A, Hong, JS, Horwitz, MS, Crowell, RL & Finberg, RW 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275: 1320-3.
- Bhattarai, SR, Kc, RB, Kim, SY, Sharma, M, Khil, MS, Hwang, PH, Chung, GH & Kim, HY 2008a. N-hexanoyl chitosan stabilized magnetic nanoparticles: Implication for cellular labeling and magnetic resonance imaging. *J Nanobiotechnology*, 6: 1.
- Bhattarai, SR, Kim, SY, Jang, KY, Lee, KC, Yi, HK, Lee, DY, Kim, HY & Hwang, PH 2008b. Laboratory formulated magnetic nanoparticles for enhancement of viral gene expression in suspension cell line. *J Virol Methods*, 147: 213-8.
- Blair, GE, Dixon, SC, Griffiths, SA & Zajdel, ME 1989. Restricted replication of human adenovirus type 5 in mouse cell lines. *Virus Res*, 14: 339-46.
- Blank, M & Goodman, R 2009. Electromagnetic fields stress living cells. *Pathophysiology*, 16: 71-8.
- Bondar, OV, Saifullina, DV, Shakhmaeva, Ii, Mavlyutova, Ii & Abdullin, TI 2012. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta Naturae*, 4: 78-81.
- Boussif, O, Lezoualc'h, F, Zanta, MA, Mergny, MD, Scherman, D, Demeneix, B & Behr, JP 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 7297-301.
- Cao, ZG, Zhu, YP, Zhou, SW, Liu, JH, Qi, L, Zhu, M & Ye, ZQ 2006. [Effects of small interfering RNA magnetic nanoparticles combination with external magnetic fields on survivin gene expression of bladder cancer cells and apoptosis]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 44: 1248-51.
- Charan, J & Kantharia, ND 2013. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*, 4: 303-6.
- Chillon, M, Lee, JH, Fasbender, A & Welsh, MJ 1998. Adenovirus complexed with polyethylene glycol and cationic lipid is shielded from neutralizing antibodies in vitro. *Gene Ther*, 5: 995-1002.

- Choi, JW, Lee, JS, Kim, SW & Yun, CO 2012. Evolution of oncolytic adenovirus for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*, 64: 720-9.
- Choi, JW, Park, JW, Na, Y, Jung, SJ, Hwang, JK, Choi, D, Lee, KG & Yun, CO 2015. Using a magnetic field to redirect an oncolytic adenovirus complexed with iron oxide augments gene therapy efficacy. *Biomaterials*, 65: 163-174.
- Chorny, M, Fishbein, I, Alferiev, IS, Nyanguile, O, Gaster, R & Levy, RJ 2006. Adenoviral gene vector tethering to nanoparticle surfaces results in receptor-independent cell entry and increased transgene expression. *Mol Ther*, 14: 382-91.
- Dasdag, S, Ketani, MA, Akdag, Z, Ersay, AR, Sari, I, Demirtas, OC & Celik, MS 1999. Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats. *Urol Res*, 27: 219-23.
- Fasbender, A, Zabner, J, Chillon, M, Moninger, TO, Puga, AP, Davidson, BL & Welsh, MJ 1997. Complexes of adenovirus with polycationic polymers and cationic lipids increase the efficiency of gene transfer in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 272: 6479-89.
- Fernandez, CA & Rice, KG 2009. Engineered nanoscaled polyplex gene delivery systems. *Mol Pharm*, 6: 1277-89.
- Fields, BN 1996. *Adeno Viruses: the viruses and their replication*, Philadelphia, Lippincott-Raven
- Ganly, I, Mautner, V & Balmain, A 2000. Productive replication of human adenoviruses in mouse epidermal cells. *J Virol*, 74: 2895-9.
- Garaj-Vrhovac, V, Horvat, D. And Koren, Z. 1991. The relationship between colony-forming ability, chromosome aberrations and incidence of micronuclei in V79 Chinese hamster cells exposed to microwave radiation *Mutation Research*, 263: 143-149.
- Giannoukakis, N, Rudert, WA, Robbins, PD & Trucco, M 1999a. Targeting autoimmune diabetes with gene therapy. *Diabetes*, 48: 2107-21.
- Giannoukakis, N, Thomson, A & Robbins, P 1999b. Gene therapy in transplantation. *Gene Ther*, 6: 1499-511.

- Goodman, R & Blank, M 2002. Insights into electromagnetic interaction mechanisms. *J Cell Physiol*, 192: 16-22.
- Haim, H, Steiner, I & Panet, A 2005a. Synchronized infection of cell cultures by magnetically controlled virus. *Journal of Virology*, 79: 622-625.
- Haim, H, Steiner, I & Panet, A 2005b. Synchronized infection of cell cultures by magnetically controlled virus. *J Virol*, 79: 622-5.
- Hamilton, MA, Russo, R.C., Thurston R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environmental Sciences Technology*: 714-719.
- Harisinghani, MG, Barentsz, J, Hahn, PF, Deserno, WM, Tabatabaei, S, Van De Kaa, CH, De La Rosette, J & Weissleder, R 2003. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N Engl J Med*, 348: 2491-9.
- Heredia-Rojas, JA, Rodríguez De La Fuente, AO, Alcocer Gonzalez, JM, Rodríguez-Flores, LE, Rodríguez-Padilla, C, Santoyo-Stephano, MA, Castaneda-Garza, E & Tamez-Guerra, RS 2010. Effect of 60 Hz magnetic fields on the activation of hsp70 promoter in cultured INER-37 and RMA E7 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 46: 758-63.
- Heredia-Rojas, L, Rodríguez-Flores, M., Santoyo-Stephano, E., Castañeda-Garza, A. Y Rodríguez-De La Fuente, A. 2003. Los campos electromagnéticos: ¿Un problema de salud pública?., *Respyn*, 4: 1-10.
- Hoshino, A, Ohnishi, N, Yasuhara, M, Yamamoto, K & Kondo, A 2007. Separation of murine neutrophils and macrophages by thermoresponsive magnetic nanoparticles. *Biotechnol Prog*, 23: 1513-6.
- Hunt, KK & Vorburger, SA 2002. Tech.Sight. Gene therapy. Hurdles and hopes for cancer treatment. *Science*, 297: 415-6.
- Huth, S, Lausier, J, Gersting, SW, Rudolph, C, Plank, C, Welsch, U & Rosenecker, J 2004. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med*, 6: 923-36.
- Hyland, GJ 2000. Physics and biology of mobile telephony. *Lancet*, 356: 1833-6.

- Ito, A, Kuga, Y, Honda, H, Kikkawa, H, Horiuchi, A, Watanabe, Y & Kobayashi, T 2004. Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. *Cancer Lett*, 212: 167-75.
- Johannsen, M, Thiesen, B, Gneveckow, U, Taymoorian, K, Waldofner, N, Scholz, R, Deger, S, Jung, K, Loening, SA & Jordan, A 2006. Thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external radiation in an orthotopic rat model of prostate cancer. *Prostate*, 66: 97-104.
- Jung, SJ, Kasala, D, Choi, JW, Lee, SH, Hwang, JK, Kim, SW & Yun, CO 2015. Safety profiles and antitumor efficacy of oncolytic adenovirus coated with bioreducible polymer in the treatment of a CAR negative tumor model. *Biomacromolecules*, 16: 87-96.
- Kamei, K, Mukai, Y, Kojima, H, Yoshikawa, T, Yoshikawa, M, Kiyohara, G, Yamamoto, TA, Yoshioka, Y, Okada, N, Seino, S & Nakagawa, S 2009. Direct cell entry of gold/iron-oxide magnetic nanoparticles in adenovirus mediated gene delivery. *Biomaterials*, 30: 1809-14.
- Kasala, D, Choi, JW, Kim, SW & Yun, CO 2014. Utilizing adenovirus vectors for gene delivery in cancer. *Expert Opin Drug Deliv*, 11: 379-92.
- Kay, MA, Glorioso, JC & Naldini, L 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, 7: 33-40.
- Kim, E, Oh, JS, Ahn, IS, Park, KI & Jang, JH 2011. Magnetically enhanced adeno-associated viral vector delivery for human neural stem cell infection. *Biomaterials*, 32: 8654-62.
- Kolodynski, AA & Kolodynska, VV 1996. Motor and psychological functions of school children living in the area of the Skrunda Radio Location Station in Latvia. *Sci Total Environ*, 180: 87-93.
- Kramarenko, AV & Tan, U 2003. Effects of high-frequency electromagnetic fields on human EEG: a brain mapping study. *Int J Neurosci*, 113: 1007-19.
- Lai, H & Singh, NP 1995. Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics*, 16: 207-10.
- Latchman, DS 2001. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res*, 51: 637-46.

- Lee, CH, Kasala, D, Na, Y, Lee, MS, Kim, SW, Jeong, JH & Yun, CO 2014. Enhanced therapeutic efficacy of an adenovirus-PEI-bile-acid complex in tumors with low coxsackie and adenovirus receptor expression. *Biomaterials*, 35: 5505-16.
- Leopold, PL & Crystal, RG 2007. Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv Drug Deliv Rev*, 59: 810-21.
- Lin, H, Blank, M & Goodman, R 1999. A magnetic field-responsive domain in the human HSP70 promoter. *J Cell Biochem*, 75: 170-6.
- Lin, H, Blank, M, Rossol-Haseroth, K & Goodman, R 2001. Regulating genes with electromagnetic response elements. *J Cell Biochem*, 81: 143-8.
- Lin, H, Goodman, R & Shirley-Henderson, A 1994. Specific region of the c-myc promoter is responsive to electric and magnetic fields. *J Cell Biochem*, 54: 281-8.
- Lin, KY, Guarnieri, FG, Staveley-O'carroll, KF, Levitsky, HI, August, JT, Pardoll, DM & Wu, TC 1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res*, 56: 21-6.
- Lis, J & Wu, C 1993. Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along. *Cell*, 74: 1-4.
- Luo, D & Saltzman, WM 2000. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat Biotechnol*, 18: 893-5.
- Ma, YJ, Zhang, ZJ, Wang, XL, Xia, WL & Gu, HC 2011. Insights into the mechanism of magnetofection using MNPs-PEI/pDNA/free PEI magnetofectins. *International Journal of Pharmaceutics*, 419: 247-254.
- Magras, IN & Xenos, TD 1997. RF radiation-induced changes in the prenatal development of mice. *Bioelectromagnetics*, 18: 455-61.
- Marino, AA, Nilsen, E & Frilot, C 2003. Nonlinear changes in brain electrical activity due to cell phone radiation. *Bioelectromagnetics*, 24: 339-46.
- Martina, MS, Fortin, JP, Fournier, L, Menager, C, Gazeau, F, Clement, O & Lesieur, S 2007. Magnetic targeting of rhodamine-labeled superparamagnetic liposomes to solid tumors: in vivo tracking by fibered confocal fluorescence microscopy. *Mol Imaging*, 6: 140-6.

- Mcnamee, JP & Chauhan, V 2009. Radiofrequency radiation and gene/protein expression: a review. *Radiat Res*, 172: 265-87.
- Meunier-Durmort, C, Grimal, H, Sachs, LM, Demeneix, BA & Forest, C 1997. Adenovirus enhancement of polyethylenimine-mediated transfer of regulated genes in differentiated cells. *Gene Ther*, 4: 808-14.
- Morimoto, RI 1993. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259: 1409-10.
- Morimoto, RI 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*, 12: 3788-96.
- Mountain, A 2000. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol*, 18: 119-28.
- Mykhaylyk, O, Sobisch, T, Almstatter, I, Sanchez-Antequera, Y, Brandt, S, Anton, M, Doblinger, M, Eberbeck, D, Settles, M, Braren, R, Lerche, D & Plank, C 2012. Silica-Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Modified for Gene Delivery: A Search for Optimum and Quantitative Criteria. *Pharmaceutical Research*, 29: 1344-1365.
- Mykhaylyk, O, Zelphati, O, Hammerschmid, E, Anton, M, Rosenecker, J & Plank, C 2009. Recent advances in magnetofection and its potential to deliver siRNAs in vitro. *Methods Mol Biol*, 487: 111-46.
- Novoselova, ET & Fesenko, EE 1998. [Stimulation of production of tumor necrosis factor by murine macrophages when exposed in vivo and in vitro to weak electromagnetic waves in the centimeter range]. *Biofizika*, 43: 1132-3.
- Overwijk, WW & Restifo, NP 2001. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 20: Unit 20 1.
- Park, HY, Noh, EH, Chung, HM, Kang, MJ, Kim, EY & Park, SP 2012. Efficient Generation of Virus-Free iPS Cells Using Liposomal Magnetofection. *Plos One*, 7.
- Plank, C, Schillinger, U, Scherer, F, Bergemann, C, Remy, JS, Krotz, F, Anton, M, Lausier, J & Rosenecker, J 2003. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem*, 384: 737-47.

- Plank, C, Zelphati, O & Mykhaylyk, O 2011a. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-Progress and prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63: 1300-1331.
- Plank, C, Zelphati, O & Mykhaylyk, O 2011b. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects. *Adv Drug Deliv Rev*, 63: 1300-31.
- Q-Biogene, I Adeasy Vector System. Application Manual. www.qbiogene.com. 1.4 ed.
- Robertson, JA, Thomas, AW, Bureau, Y & Prato, FS 2007. The influence of extremely low frequency magnetic fields on cytoprotection and repair. *Bioelectromagnetics*, 28: 16-30.
- Rodriguez-De La Fuente, AO, Alcocer-Gonzalez, JM, Heredia-Rojas, JA, Rodriguez-Padilla, C, Rodriguez-Flores, LE, Santoyo-Stephano, MA, Castaneda-Garza, E & Tamez-Guerra, RS 2012. Effect of 60 Hz electromagnetic fields on the activity of hsp70 promoter: an in vivo study. *Cell Biol Int Rep* (2010), 19: e00014.
- Rodriguez De La Fuente, AO. 2008. *Aplicación de un promotor indicible por campos electromagnéticos para manipular la expresión de luciferasa como gene reportero*. Doctorado en Ciencias con especialidad en Microbiología, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rodriguez De La Fuente, AO, Alcocer-Gonzalez, JM, Antonio Heredia-Rojas, J, Balderas-Candanosa, I, Rodriguez-Flores, LE, Rodriguez-Padilla, C & Tamez-Guerra, RS 2009. Effect of 60 Hz electromagnetic fields on the activity of hsp70 promoter: an in vitro study. *Cell Biol Int*, 33: 419-23.
- Rowe, WP, Huebner, RJ, Gilmore, LK, Parrott, RH & Ward, TG 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 84: 570-3.
- Saiyed, ZM, Bochiwal, C, Gorasia, H, Telang, SD & Ramchand, CN 2006. Application of magnetic particles (Fe₃O₄) for isolation of genomic DNA from mammalian cells. *Anal Biochem*, 356: 306-8.
- Salford, LG, Brun, AE, Eberhardt, JL, Malmgren, L & Persson, BR 2003. Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environ Health Perspect*, 111: 881-3; discussion A408.

- Sapet, C, Pellegrino, C, Laurent, N, Sicard, F & Zelphati, O 2012. Magnetic Nanoparticles Enhance Adenovirus Transduction In Vitro and In Vivo. *Pharmaceutical Research*, 29: 1203-1218.
- Scherer, F, Anton, M, Schillinger, U, Henke, J, Bergemann, C, Kruger, A, Gansbacher, B & Plank, C 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 9: 102-9.
- Sesatty, HaS. 2015. *DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL RECOMBINANTE CON UN PROMOTOR SINTÉTICO DE RESPUESTA A CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS*. Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Sharma, P, Kolawole, AO, Wiltshire, SM, Frondorf, K & Excoffon, KJ 2012. Accessibility of the coxsackievirus and adenovirus receptor and its importance in adenovirus gene transduction efficiency. *J Gen Virol*, 93: 155-8.
- Smahel, M, Smahelova, J, Tejklova, P, Tachezy, R & Marinov, I 2005. Characterization of cell lines derived from tumors induced by TC-1 cells in mice preimmunized against HPV16 E7 oncoprotein. *Int J Oncol*, 27: 731-42.
- Smith, CA, Woodruff, LS, Rooney, C & Kitchingman, GR 1998. Extensive cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T cells. *Hum Gene Ther*, 9: 1419-27.
- Smith, CW & Best, S 1989. *Electromagnetic man : health and hazard in the electrical environment*, New York, St. Martin's Press.
- Steinwaerder, DS, Carlson, CA & Lieber, A 2001. Human papilloma virus E6 and E7 proteins support DNA replication of adenoviruses deleted for the E1A and E1B genes. *Mol Ther*, 4: 211-6.
- Stilwell, JL, Mccarty, DM, Negishi, A, Superfine, R & Samulski, RJ 2003. Development and characterization of novel empty adenovirus capsids and their impact on cellular gene expression. *J Virol*, 77: 12881-5.
- Sun, Y, Chen, ZL, Yang, XX, Huang, P, Zhou, XP & Du, XX 2009. Magnetic chitosan nanoparticles as a drug delivery system for targeting photodynamic therapy. *Nanotechnology*, 20: 135102.
- Suzuki, K, Mitsui, K, Aizawa, E, Hasegawa, K, Kawase, E, Yamagishi, T, Shimizu, Y, Suemori, H, Nakatsuji, N & Mitani, K 2008. Highly efficient transient gene

- expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 13781-6.
- Szmigielski, S, Bortkiewicz, A, Gadzicka, E, Zmyslony, M & Kubacki, R 1998. Alteration of diurnal rhythms of blood pressure and heart rate to workers exposed to radiofrequency electromagnetic fields. *Blood Press Monit*, 3: 323-30.
- Tanner, JA 1966. Effect of microwave radiation on birds. *Nature*, 210: 636.
- Thomas, CE, Ehrhardt, A & Kay, MA 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 4: 346-58.
- Tokalov, SV & Gutzeit, HO 2004. Weak electromagnetic fields (50 Hz) elicit a stress response in human cells. *Environ Res*, 94: 145-51.
- Tresilwised, N, Pithayanukul, P, Holm, PS, Schillinger, U, Plank, C & Mykhaylyk, O 2012. Effects of nanoparticle coatings on the activity of oncolytic adenovirus-magnetic nanoparticle complexes. *Biomaterials*, 33: 256-269.
- Tresilwised, N, Pithayanukul, P, Mykhaylyk, O, Holm, PS, Holzmuller, R, Anton, M, Thalhammer, S, Adiguzel, D, Doblinger, M & Plank, C 2010. Boosting Oncolytic Adenovirus Potency with Magnetic Nanoparticles and Magnetic Force. *Molecular Pharmaceutics*, 7: 1069-1089.
- Tsai, HY, Hsu, CF, Chiu, IW & Fuh, CB 2007. Detection of C-reactive protein based on immunoassay using antibody-conjugated magnetic nanoparticles. *Anal Chem*, 79: 8416-9.
- Velizarov, S, Raskmark, P & Kwee, S 1999. The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal. *Bioelectrochem Bioenerg*, 48: 177-80.
- Wan, Y, Han, J, Fan, G, Zhang, Z, Gong, T & Sun, X 2013. Enzyme-responsive liposomes modified adenoviral vectors for enhanced tumor cell transduction and reduced immunogenicity. *Biomaterials*, 34: 3020-30.
- Weisbrot, D, Lin, H, Ye, L, Blank, M & Goodman, R 2003. Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biochem*, 89: 48-55.
- Woappi, YL, Jangiti, R & Singh, OV 2014. Synthetic immunosurveillance systems: nanodevices to monitor physiological events. *Biosens Bioelectron*, 61: 152-64.

- Yim, EK & Park, JS 2005. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat*, 37: 319-24.
- Zeng, M, Smith, SK, Siegel, F, Shi, Z, Van Kampen, KR, Elmets, CA & Tang, DC 2001. AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination. *Biotechniques*, 31: 260-2.
- Zeni, O, Simko, M, Scarfi, MR & Mattsson, MO 2017. Cellular Response to ELF-MF and Heat: Evidence for a Common Involvement of Heat Shock Proteins? *Front Public Health*, 5: 280.
- Zhong, H, Lei, X, Qin, L, Wang, J & Hung, T 2011. Augmentation of adenovirus 5 vector-mediated gene transduction under physiological pH conditions by a chitosan/NaHCO₃ solution. *Gene Ther*, 18: 232-9.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Humberto Antonio Salazar Sesatty

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con orientación en Microbiología

Tesis: EFECTO EN LA EXPRESIÓN DE UN TRANSGÉN MEDIADO POR UN NANOCOMPLEJO FORMADO POR ADENOVIRUS RECOMBINANTE Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS BAJO INFLUENCIA DE UN CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO

Datos personales: Nacido en Nueva Rosita Coahuila el 11 de agosto de 1985, hijo de Humberto Salazar Orihuela y Rosalba Sesatty de Hoyos

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con grado de Licenciado en Biotecnología Genómica en 2009 y Maestro en Ciencias con orientación en Microbiología en 2015 y egresado del Colegio de Bioética de Nuevo León con grado de Máster en Bioética en 2015.

Experiencia Profesional: Profesional de bioseguridad y asistente de investigación de tiempo completo en el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León del 2009 al 2020 y asistente de investigación en la Facultad de Ciencias Biológicas en el Departamento de Inmunología y Virología desde el 2020.