

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO DE BACTERIOBOTS BASADOS EN *BIFIDOBACTERIAS* Y  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FLUORESCENTES  
BIOCOMPATIBLES PARA EL ENVÍO DE GENES A  
TUMOR REGULADOS POR HIPOXIA.

Por

M.C LUIS DANIEL TERRAZAS ARMENDÁRIZ

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Julio, 2019

DESARROLLO DE BACTERIOBOTS BASADOS EN *BIFIDOBACTERIAS* Y  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FLUORESCENTES BIOCOMPATIBLES  
PARA EL ENVÍO DE GENES A TUMOR REGULADOS POR HIPOXIA.

Comité de Tesis

Dr. Juan Manuel Alcocer González  
PRESIDENTE

Dra. Itza Eloisa Luna Cruz  
SECRETARIO

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales  
VOCAL

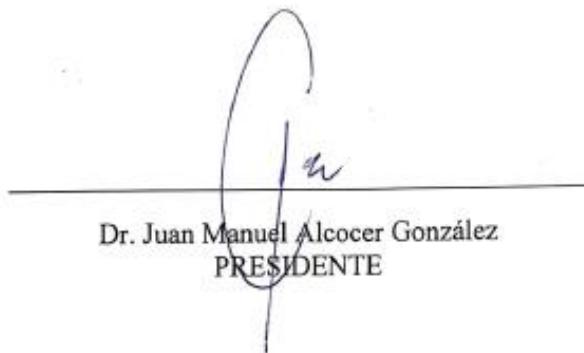
Dr. Pablo Zapata Benavides  
VOCAL

Ricardo Alberto Gómez Flores  
VOCAL

DESARROLLO DE BACTERIOBOTS BASADOS EN *BIFIDOBACTERIAS* Y  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FLUORESCENTES BIOCOMPATIBLES  
PARA EL ENVÍO DE GENES A TUMOR REGULADOS POR HIPOXIA.

Dirección de Tesis

---



Dr. Juan Manuel Alcocer González  
PRESIDENTE

## **LUGAR DE TRABAJO.**

El presente proyecto de investigación se realizó en la unidad de Inmunología Molecular perteneciente al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## **1. AGRADECIMIENTOS.**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Manuel Alcocer González asesor de mi tesis, así como también a la Dra. Itza Eloísa Luna Cruz, a la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales, al Dr. Pablo Zapata Benavides y al Dr. Ricardo Gómez Flores por formar parte del comité de tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) por su apoyo económico, por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda de este trabajo.

A mis padres por el apoyo económico y moral, siempre estuvieron ahí cuando los necesite.

A mis hermanos Carlos, Edgar y Dulce por su apoyo incondicional.

A mi esposa Adriana Martha por aguantarme en mis peores y mejores momentos.

A mis compañeros de laboratorio Cynthia, Carolina, Azael, Mónica, Rafael, Andrea, Samantha, Cecilia, Arnulfo, Alberto, Silvia por siempre poder contar con ustedes en lo académico y lo personal.

## **2. DEDICATORIA.**

El presente trabajo es dedicado a las siguientes personas:

A mis hermanos: Edgar, Carlos y Dulce ya que fueron una de mis inspiraciones y fortaleza se para terminar este trabajo, quiero ser un buen ejemplo para ustedes.

A mis padres: Luis Terrazas y Alicia Armendáriz que siempre han creído en mí, me han inculcado buenos valores, me han apoyado siempre y a la misma vez me dieron lecciones de vida, dejando que aprenda a levantarme cuando tropiezo y cuando no pude levantarme, me dieron una mano. Gracias por enseñarme que todo lo que te propones lo puedes lograr no importa cuánto tengas y quien seas. Son un ejemplo de perseverancia.

A mi esposa: Adriana Martha quien siempre me ha apoyado, quien creyó en mí cuando muchos no, con quien puedo entablar una buena platica sobre ciencia, quien estuvo conmigo en mis peores momentos cuando todo era gris, ella me hizo ver una luz, ella quien me ha regalado muchos de los mejores momentos en mi vida.

### **3. ÍNDICE.**

1 AGRADECIMIENTOS .....	I
2 DEDICATORIA .....	II
3 ÍNDICE .....	III
4 ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
5 ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
6 LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	IX
7 RESUMEN .....	X
8 ABSTRACT .....	XII
9 INTRODUCCIÓN .....	1
10 ANTECEDENTES.....	3
10.1 Cáncer .....	3
10.1.1 Hipoxia y su relación con el cáncer .....	4
10.2 Terapia génica. ....	6
10.3 Vectores para terapias génicas. ....	7
10.3.1 Vectores no virales.....	8
10.3.2 Vectores catiónicos. ....	9
10.3.3 Quitosán.....	11
10.3.4 Biocompatibilidad del quitosan.....	15
10.3.5 Biodegradabilidad del quitosan.....	16
10.3.6 Toxicidad del quitosan.....	18
10.4 Nanopartículas Magnéticas.....	19
10.5 Nanoparticulas magnéticas poliméricas.....	21
10.6 Bacterias como vectores.....	23

10.6.1 Bacterias como vehículos en terapia tumoral.....	23
10.6.2 Colonización bacteriana en tumores. ....	25
10.7 Bifidobacterium como vector.....	26
10.8 Microbots.....	27
11 JUSTIFICACIÓN. ....	34
12 HIPÓTESIS. ....	35
13 OBJETIVO GENERAL. ....	36
13.1 OBJETIVOS PARTICULARES. ....	36
14 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
14.1 Descripción, purificación y caracterización de los plásmidos a utilizar.....	39
14.2 Extracción de ADN plasmídico.....	41
14.3 Caracterización enzimática del vector pHRE-Luc. ....	41
14.4 Extracción de plásmido por el método maxiprep. ....	42
14.5 Preparación de reactivos para la formación de Nanocomplejos. ....	42
14.6 Formación y caracterización de Nanocomplejos formados por pDNA-Quitosán-NPMF. ....	43
14.7 Elaboración de Nanocomplejos.....	43
14.8 Determinación de homogeneidad y tamaño de Nanocomplejos. ....	44
14.9 Determinación de la caga superficial de Nanocomplejos. ....	44
14.10 Evaluación <i>in vivo</i> de Nanocomplejos. ....	44
14.11 Determinación de la localización de Nanocomplejos en un modelo murino....	46
14.12 Análisis de la expresión de luciferasa en un modelo murino.....	46
14.13 Determinación de la localización de Bifidobacterias en un modelo murino tras una inyección IV. ....	47
14.14 Evaluación de la actividad reguladora de citocinas por Bifidobacterias en un modelo murino. ....	48

14.15 Elaboración de Bacteriobots.....	49
14.16 Determinación de la caga superficial de Bacteriobots.....	50
14.17 Determinación de la viabilidad de Bacteriobots.....	50
14.18 Caracterización de Bacteriobots por el Microscopio de Barrido Electrónico (SEM). .....	51
14.19 Determinación de la localización de Bacteriobots en un modelo murino. ....	51
14.20 Análisis de la expresión de luciferasa de Bacteriobots en un modelo murino...	52
<b>15 RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
15.1 Caracterización de pHRE-Luc. .....	54
15.2 Formación y caracterización de Nanocomplejos de pDNA-Quitosan-NPMF....	54
15.3 Evaluación de la eficiencia de transporte específico de Nanocomplejos en un modelo in vivo. .....	57
15.4 Evaluación de la expresión génica de Nanocomplejos en un modelo in vivo. ....	58
15.5 Determinación de la localización de Bifidobacterias en un modelo murino tras una IV.....	59
15.6 Evaluación de la actividad reguladora de citocinas por Bifidobacterias en un modelo murino. .....	60
15.7 Caracterización de Bacteriobots.....	62
15.8 Evaluación de la eficiencia de transporte específico de los Bacteriobots en un modelo in vivo. .....	63
15.9 Evaluación de la expresión génica de los Bacteriobots como vector en un modelo in vivo. ....	64
15.10 Determinación de la localización de los Bacteriobots en un modelo murino tras una IV.....	66
<b>16 DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>17 CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>18 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>75</b>

19 BIBLIOGRAFÍA .....	76
20 RESUMEN BIBLIOGRÁFICO. ....	87

## **4. ÍNDICE DE TABLAS.**

**Tabla 1.** Reacción de la digestión del vector pHRE-Luc

## **5. ÍNDICE DE FIGURAS.**

**Figura 1.** Microambiente tumoral.

**Figura 2.** Vectores no virales para la terapia génica.

**Figura 3.** Estructura química de polímeros catiónicos.

**Figura 4.** Estructura del quitosano.

**Figura 5.** Orientación tumoral y localización de Bacteriobots.

**Figura 6.** Imágenes fluorescentes de cortes de tejido tumoral después la IV de Bifidobacterias con Quantum dots.

**Figura 7.** Capacidad de colonización tumoral de PFH/PGLA *B. longum*.

**Figura 8.** Mapa del vector pNFkB-Luc.

**Figura 9.** Mapa del vector pHRE-Luc.

**Figura 10.** Secuencia de los 6 HRE que componen el promotor del pHRE-Luc.

**Figura 11.** Caracterización del vector pHRE-Luc.

**Figura 12.** Homogeneidad y tamaños de los Nanocomplejos con pHRE-Luc.

**Figura 13.** Homogeneidad y tamaños de los Nanocomplejos con pRNAi-HIF.

**Figura 14.** Potencial Z de los Nanocomplejos con pHRE-Luc.

**Figura 15.** Potencial Z de los Nanocomplejos con pRNAi-HIF.

**Figura 16.** Fluorescencia de órganos y tejido tumoral de ratones inoculados intravenosamente con Nanocomplejos.

**Figura 17.** Luminiscencia de órganos y tejido tumoral de ratones inoculados intravenosamente con Nanocomplejos

**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la amplificación (827 pb) del 16 S rDNA de *Bifidobacterium Breve* en órganos de ratones sacrificados a los 5, 7 y 9 días

**Figura 19.** Niveles de citocinas en ratones con tumor inoculados intravenosamente con Bifidobacterias 1h, 3h, 6h y 8h post inoculación.

**Figura 20.** Potencial Z de los Bacteriobots.

**Figura 21.** Micrografía al microscopio electrónico de barrido de un bacteriobot

**Figura 22.** Análisis de fluorescencia de órganos y tejido tumoral de ratones a las 48h.

**Figura 23.** Cuantificación de la expresión de la luciferasa en órganos y tejido tumoral de ratones a las 48h.

**Figura 24.** Biodistribución de Bacteriobots inoculados vía IV.

## 6. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

<b>µg</b>	microgramo
<b>µL</b>	microlitro
<b>DMEM-F12</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco: Mezcla de nutrientes F12
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>G</b>	Gauss
<b>LB</b>	medio Luria Bertani
<b>mL</b>	mililitro
<b>mV</b>	milivolts
<b>NPMF</b>	Nanopartículas magnéticas fluorescentes
<b>pb</b>	pares de bases
<b>pDNA</b>	DNA plasmídico
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>T</b>	Tesla
<b>V</b>	volts

## 7. RESUMEN

Estrategias actuales para combatir el cáncer suelen presentar ciertas desventajas, ya que no son selectivas para células blanco y afectan tejidos sanos. Es por esto por lo que se buscan nuevas alternativas. En cáncer se ha explorado el uso de microbots basados en bacterias anaerobias como trasportadores específicos dirigidos a tejidos tumorales, ya que la mayoría de los tumores sólidos exhiben regiones hipóxicas, por lo que la masa tumoral presenta microambientes anaeróbicos únicos, la hipoxia puede ser explotada para el tratamiento de cáncer selectivo. Los microbots tienen el potencial de suministrar agentes génicos y farmacéuticos concentrados a las células blanco para evitar efectos secundarios a células sanas. En el presente trabajo se elaboraron Bacteriobots basados en bacterias de la cepa *Bifidobacterium Breve* y Nanocomplejos (NCs) compuestos por: nanopartículas magnéticas fluorescentes (NPMF), quitosán y el plásmido pHRE-LUC, el cual codifica para el gen de luciferasa que es regulado por un promotor inducible por hipoxia. Se evaluó la biocompatibilidad de las *Bifidobacterias* al ser inoculadas intravenosamente (IV) en ratones. Los Bacteriobots fueron caracterizados por el microscopio de barrido electrónico (SEM), además de evaluar su potencial para el envío dirigido y expresión de genes en un modelo tumoral *in vivo*. Los NCs acoplados a la membrana de la bacteria presentaron un tamaño de 200 a 250 nm con una carga superficial de + 16 mV. Se comprobó que las Bifidobacterias tienen la capacidad de colonizar el área hipólica de tumores sólidos mediante PCR. Posteriormente los Bacteriobots fueron inoculados IV en ratones portadores de tumor de la cepa C57/Bl6, al cabo de 2 días fueron sacrificados para determinar la biodistribución de los Bacteriobots, así como su eficiencia de transporte específico y expresión génica. Se determinó la capacidad natural de colonización tumoral de los microbots mediante fluorescencia y luminiscencia. El sistema de envío de genes (Bacteriobots) tuvo una mayor selectividad y especificidad hacia un tejido específico, esto comparado con otros dos sistemas; Nanocomplejos con presencia de campo magnético y plásmido desnudo inoculado.

## 8. ABSTRACT

Current strategies to fight cancer usually have certain disadvantages, since they are not selective for target cells and affect healthy tissues. Because of these new alternatives are sought. In cancer, the use of microbots based on anaerobic bacteria as specific transporters targeting tumor tissues has been explored, since most solid tumors exhibit hypoxic regions, so that the tumor mass has unique anaerobic microenvironments, hypoxia can be exploited for selective cancer treatment. Microbots have the potential to deliver concentrated gene and pharmaceutical agents to specific cells to avoid side effects to healthy cells. In this work, Bacteriobots based on bacteria of the strain *Bifidobacterium Breve* and Nanocomplex (NCs) composed of: fluorescent magnetic nanoparticles (NPFM), chitosan and the plasmid pHRE-Luc which codes for the luciferase gene that is regulated by a hypoxia inducible promoter. The biocompatibility of *bifidobacteria* was evaluated. Bacteriobots were characterized by scanning electron microscope (SEM), in addition to assessing their potential for targeted delivery and gene expression in an *in vivo* tumor model. The size of NCs coupled to the membrane of the bacterium was about 200 to 250 nm with a surface load of + 16 mv. It was found that *bifidobacteria* have the ability to colonize the hypoxic area of solid tumors by PCR. Subsequently, Bacteriobots were inoculated IV in tumor-bearing mice of strain c57 / bl6, after 2 days they were sacrificed to determine the biodistribution of Bacteriobots, as well as their efficiency of specific transport and gene expression. The highest fluorescence and luminescence signal were found in tumor tissue compared to other organs. The gene delivery system (Bacteriobots) had greater selectivity and specificity towards a specific tissue, this compared with two other systems: nanocomplexes with presence of magnetic field and naked plasmid.

## **9. INTRODUCCIÓN.**

El cáncer es una de las enfermedades que causan más muertes a nivel mundial, estrategias actuales contra el cáncer y otras enfermedades de importancia global presentan ciertas desventajas tales como la falta de selectividad tumoral, toxicidad no específica y la resistencia a múltiples drogas. Los tratamientos están generalmente limitados por la ineficiencia terapéutica y por la alta incidencia de efectos secundarios graves asociados debido a los complejos microambientes cancerígenos, las células cancerosas desarrollan la capacidad de resistencia a los medicamentos debido a las diversas jerarquías celulares estimuladas por la hipoxia y el bajo pH que lo rodea. Los tumores sólidos que muestran un rápido progreso de las células tumorales hacia la agregación celular esférica desarrollan una necrosis central, una región de hipoxia que rodea el área necrótica. La región de hipoxia en el tumor sólido ha sido reconocida como un microambiente complejo con una concentración muy baja de oxígeno y nutrientes deficientes, debido al suministro inadecuado de oxígeno de la vasculatura anormal, la cual no puede satisfacer las demandas de las células cancerosas que proliferan rápidamente. El microambiente hipóxico reduce la susceptibilidad de las células cancerosas a los medicamentos contra el cáncer, baja respuesta de radicales libres y menor proliferación de células cancerosas en el centro de los tumores sólidos. A medida que los tumores desarrollan regiones de hipoxia, deben ajustar su metabolismo para adaptarse a este microambiente empobrecido en oxígeno, los tumores se adaptan a este cambio a través de la activación del Factor Inducibles por Hipoxia (HIF), que juega un papel esencial en el cambio a producción de energía anaeróbica. HIF a su vez regula al alza la expresión de múltiples genes asociados con la carcinogénesis, la angiogénesis, la regulación metabólica, el equilibrio del pH y la apoptosis celular, los cuales promueven la supervivencia del tumor. El papel esencial de HIF: en la protección vascular, la recuperación de sangre tumoral y el suministro de nutrientes, hace que los tumores sólidos sean difíciles de tratar, lo que lleva a la resistencia en radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia. Un mediador importante de la respuesta hipódica es la interacción de HIF con su sitio de reconocimiento de ADN, los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE). Se ha demostrado que las secuencias HRE inducen selectivamente la expresión génica en respuesta a la hipoxia cuando se colocan río arriba de un promotor, logrando así generar una terapia génica dirigida contra la hipoxia. La hipoxia tumoral es un obstáculo importante y frecuente para el tratamiento eficaz del cáncer con radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia. Aunque la hipoxia de los tumores sólidos ha resultado en un obstáculo en la terapia, su bajo nivel de oxígeno sirve como hábitat ideal para una serie de bacterias anaerobias. La presencia de bacterias en tumores humanos ha sido reconocida por más de 50 años. Se han encontrado grandes cantidades de bacterias en tumores extirpados de pacientes, por ejemplo, se ha demostrado que cepas atenuadas de

*Clostridium* y *Bifidobacterium spp* son capaces de multiplicarse selectivamente en tumores. Kimura informó por primera vez que *B. bifidum* se puede localizar selectivamente y proliferar en las zonas hipóticas tumorales mediante un método intravenoso sistémico, esta característica se atribuyó al microambiente hipótico del tejido tumoral ya que era adecuado para la localización de *B. bifidum*. *Bifidobacterium spp.* es una bacteria Gram positiva, clasificada como no patógena anaeróbica, cuando se inocula por vía intravenosa, prolifera selectivamente y se localiza en diferentes tipos de tumores sólidos. Actualmente existen estudios clínicos desarrollándose en humanos con el uso de Bifidobacterias. Por otro lado, se ha generado una gran expectativa en los sistemas basados en células (microbots) ya que poseen mecanismos más complejos que les permiten alcanzar tejidos específicos, atravesar barreras no permeables fácilmente y modular su microambiente. Recientemente, se han propuesto el uso microbots debido a su potencial en aplicaciones biomédicas. Algunos microbots se han desarrollado utilizando microorganismos dinámicos, como *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. marcescens* y cepas de bacterias magnetotácticas (MTB). Sin embargo, varias cepas de bacterias no son adecuadas para su uso como microbots biomédicos debido a su fuerte resistencia a algunos antibióticos, patogenicidad y difíciles procedimientos de cultivo. En este estudio mostramos el uso simultáneo de Bifidobacterias con NCs para administrar pDNA en un modelo *in vivo*, los Bacteriobots actúan como vector de entrega de NCs que transfecan las células tumorales y entregan el transgén, el microbot no expresa el transgén de interés (en este caso, un gen bioluminiscente) más bien, el gen bioluminiscente se carga en los NC, que se transportan en la superficie de la bacteria. Aquí, aprovechamos el microambiente hipótico característico de los tumores sólidos, que favorece el crecimiento selectivo de Bifidobacterias y el aumento de expresión del transgén cargado en los Bacteriobots cuya expresión es mediada por un promotor que responde a hipoxia. Estos Bacteriobots son biocompatibles y relativamente seguros.

## **10. ANTECEDENTES.**

### **10.1 Cáncer.**

Cáncer es el nombre general para un grupo de más de 100 enfermedades, se caracteriza por el crecimiento anormal de células más allá de sus límites habituales que pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y / o extenderse a otros órganos, aunque hay muchos tipos de cáncer, los no tratados pueden causar enfermedades graves e incluso la muerte (OMS 2018). El crecimiento celular del cáncer es diferente al de las células normales, en lugar de morir, continúan creciendo y forman nuevas células anormales, las cuales pueden invadir otros tejidos, algo que las células normales no pueden hacer. Las células se transforman en células cancerosas debido a cambios en su ADN (ácido desoxirribonucleico) el cual se encuentra en cada célula y dirige todas sus acciones. En una célula normal, cuando el ADN se daña, la célula repara el daño o muere. En las células cancerosas el ADN dañado no se repara, la célula no muere y se pueden dividir sin parar formando tumores (American Cancer Society, 2013).

Actualmente el cáncer es uno de los mayores retos en salud pública y es la segunda causa principal de muerte a nivel mundial, se estima que causó 9.6 millones de muertes en 2018. El cáncer de pulmón, próstata, colorectal, estómago e hígado son los tipos más comunes en hombres. (OMS 2018). Los tumores malignos se han posicionado como primeras causas de mortalidad desde hace varias décadas, México no ha sido la excepción, desde la década de 1960 el cáncer se ubicó entre las diez principales causas de muerte (Reynoso y Torres, 2017).

Una característica de los tumores es el nivel bajo de oxígeno lo que genera hipoxia. La hipoxia intratumoral se ha considerado una fuerza que conduce a la progresión tumoral con pronóstico negativo en los pacientes (Greijer y Wall, 2004; López, 2006; Monti y Gariboldi, 2011; Xu *et al.*, 2013).

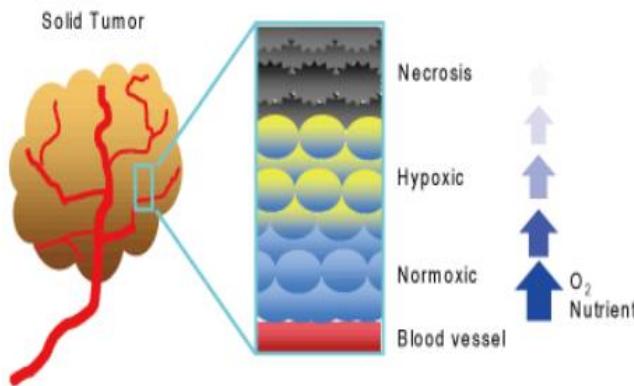
### **10.1.1 Hipoxia y su relación con el cáncer.**

El suministro adecuado de oxígeno a los tejidos es esencial para el mantenimiento de la función de las células de mamíferos (Greer *et al.*, 2012). La hipoxia tisular se produce cuando hay un desequilibrio entre la oferta y el consumo de oxígeno (Gilany y Vafakhah, 2010). La deficiencia en este suministro caracteriza aquellas situaciones fisiopatológicas tales como insuficiencia circulatoria, el infarto y la isquemia cerebral en la cuales existe un flujo sanguíneo insuficiente para proporcionar la oxigenación necesaria (Zitta *et al.*, 2010, Greer *et al.*, 2012). La creciente evidencia, estudios clínicos y experimentales señala el papel fundamental y fisiopatológicos de la hipoxia en el cáncer (Gilany y Vafakhah, 2010). Las células tumorales muy proliferativas forman rápidamente masas, que al estar localizadas lejos de los vasos sanguíneos, no alcanzan el aporte necesario de oxígeno y nutrientes, en tales condiciones el factor inducible por hipoxia (HIF) se activa y, a su vez, activa o reprime la expresión de una amplia variedad de genes que inicián la formación de nuevos vasos sanguíneos y modifican el metabolismo, estableciendo así las condiciones favorables para el desarrollo de la masa tumoral y su proliferación (Denny, 2010).

La hipoxia que se observa con frecuencia en los tumores sólidos ha sido identificada como un importante pronóstico negativo. Debido a una menor disponibilidad del oxígeno en el tumor, aumenta la resistencia a radioterapia, quimioterapia, fármacos, además activa una cascada señalizadora que promueve la inducción o represión de la transcripción de una multitud de genes (Boticario y Cascales, 2010; Denny, 2010; Xu *et al.*, 2013).

Los tumores sólidos muestran un rápido progreso de las células tumorales hacia la agregación celular esférica, desarrollan necrosis central y la región de hipoxia, que rodea el área necrótica, con capilares sanguíneos desordenados (Brown y Wilson, 2004) (Figura 1).

## Tumor Microenvironment



**Figura 1. Microambiente tumoral.** Concentración de oxígeno en tumor sólido (Thomas Stefani *et al.*, 2013).

La región de hipoxia en el tumor sólido se ha reconocido como un microambiente complejo (Graham y Unger, 2018; Wang *et al.*, 2019) que revela una concentración de oxígeno muy baja y nutrientes deficientes (Luo *et al.*, 2016), debido al suministro inadecuado de oxígeno de la vasculatura anormal que no puede satisfacer las demandas de las células cancerosas que proliferan rápidamente (Graham y Unger, 2018).

El ambiente hipóxico reduce la susceptibilidad de las células cancerosas a los medicamentos anticancerígenos (Teicher *et al.*, 1981, 1990; Vaupel y Mayer, 2007; Zeng *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019; Graham y Unger, 2018), baja respuesta de radicales libres y menor proliferación de células cancerosas en el centro de los tumores sólidos (Luo *et al.*, 2016). A medida que los tumores desarrollan regiones de hipoxia, deben ajustar su metabolismo para adaptarse a este microambiente empobrecido en oxígeno. Los tumores se aclimatan a través de la activación de HIF, que juega un papel esencial en el cambio a una producción de energía anaeróbica (Bertout *et al.*, 2008; Chauhan y Jain 2013; Zeng *et al.*, 2015). HIF a su vez regula la expresión de múltiples genes asociados con la angiogénesis, la regulación metabólica, el equilibrio del pH y la apoptosis celular, que promueven la supervivencia del tumor. El papel esencial de los HIF en la protección vascular, la recuperación de sangre tumoral y el suministro de

nutrientes, hace que los tumores sólidos sean difíciles de tratar, lo que lleva a la resistencia en radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia (Zeng *et al.*, 2015).

La hipoxia tumoral es un obstáculo importante y frecuente para un tratamiento eficaz (Wilson y Hay, 2011; Leone *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2015; Graham y Unger, 2018). Un mediador importante de la respuesta hipódica es la interacción de HIF con su sitio de reconocimiento de ADN relacionado, el elemento de respuesta a la hipoxia (HRE) (Wang y Semenza 1993; Keith *et al.*, 2012).

Las estrategias actuales contra el cáncer y otras enfermedades de importancia mundial tienen ciertas desventajas, como la falta de selectividad tumoral, toxicidad inespecífica y resistencia a múltiples fármacos. Los tratamientos generalmente están limitados por la ineficiencia terapéutica y por la alta incidencia de efectos secundarios graves asociados (Cho *et al.*, 2012), debido a los complejos microambientes cancerígenos, las células cancerosas desarrollan la capacidad de resistencia a los medicamentos para bloquear la focalización, debido a las diversas jerarquías celulares estimuladas por la hipoxia y el bajo pH que rodea (Brown 2007; Beck y Blanpain 2013). Por ende, es necesario implementar nuevas terapias. Entre los enfoques utilizados en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer se encuentran: la nanobiotecnología, inmunoterapia e imagenología y la terapia génica donde se emplean diversas herramientas para la detección, análisis, producción e inhibición de genes o proteínas, específicos de células afectadas en estas enfermedades.

## **10.2 Terapia génica.**

Dentro del tratamiento de pacientes con cáncer la terapia génica se presenta como una alternativa importante, entre los enfoques utilizados en el desarrollo de dichos tratamientos se encuentran: la nanobiotecnología, inmunoterapia e imagenología, donde se emplean diversas herramientas para la detección, análisis, producción e inhibición de genes o proteínas, específicos de células afectadas en estas enfermedades, sin embargo

el éxito de esta terapia depende en gran medida del desarrollo de un vector o vehículo de envío que sea capaz de entregar de forma eficiente y selectiva el material genético deseado en las células diana, además que este vehículo presente un mínimo de toxicidad para las células normales (St George, 2003).

Las herramientas empleadas son múltiples y variadas, entre ellas el desarrollo de vacunas de DNA, anticuerpos monoclonales, y vectores para la entrega de genes o proteínas; así como el uso de terapia celular, nanopartículas magnéticas (NPM), microbots y RNA de interferencia, entre otros.

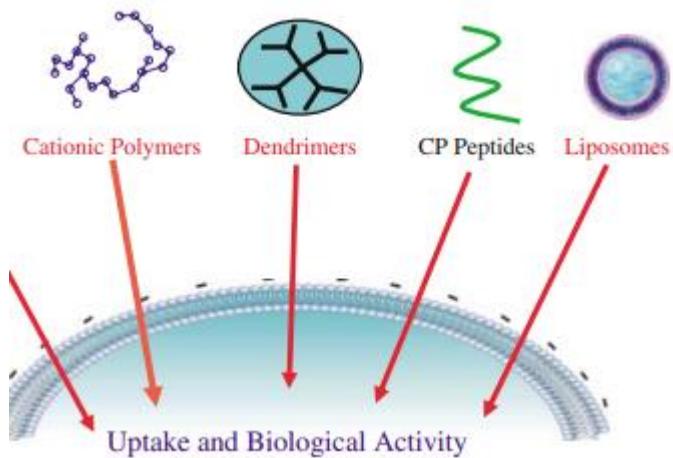
### **10.3 Vectores para terapias génicas.**

Se define vector como el vehículo que transporta un gen al interior de uno o varios hospedadores y permite su replicación y/o expresión (Kok *et al.*, 1984). Para la terapia génica *in vivo*, el gen debe ser entregado adecuadamente a las células en el sitio objetivo. El uso directo de ácidos nucleicos libres ha producido niveles eficientes de transfección cuando se administra por vía intratumoral o intramuscular, lejos de las enzimas plasmáticas degradantes. Sin embargo, los ácidos nucleicos desnudos no logran los resultados deseados debido a su rápida eliminación, degradación enzimática, biodistribución inespecífica y baja absorción celular. Por lo tanto, el desafío principal para la terapia génica es desarrollar portadores seguros y eficientes para proteger los ácidos nucleicos y facilitar su transferencia a células específicas en el sitio específico. Para la administración de genes *in vivo*, los sistemas de portador / ácido nucleico, denominados vectores, se clasifican en dos clases: vectores virales y vectores no virales. (Zhou *et al.*, 2017). Los vectores virales han sido estudiados ampliamente para el envío de material genético, los cuales son eficientes en la transfección a las células tumorales, en ellos han sido desarrolladas diferentes estrategias a manera de obtener un sistema eficaz de expresión genética, los cuales incluyen la orientación específica al tejido de interés, minimizar o eliminar la expresión de genes virales que podrían llevar a la perdida de la señal transducida, así como métodos de identificación de dosis respuesta para los

distintos tipos de cáncer, todo esto se ha realizado para lograr obtener el mayor beneficio terapéutico, pese a ello no se ha conseguido desarrollar un modelo idóneo, ya que en muchos de los modelos virales se presenta cierta tasa de respuesta inmunológica hacia el vehículo lo cual disminuye el potencial del sistema, otro punto donde se encuentra una desventaja a estos modelos es la transfección inespecífica, esto es, que presentan cierta citotoxicidad a células normales (St George, 2003; Hidai y Kitano 2018), además, los vectores virales no son viables para la liberación de medicamentos (Kaneda y Tabata, 2006). Por estas propiedades no deseadas se ha buscado utilizar otros métodos de envío de material genético y acarreadores de drogas, en los cuales puedan evadirse contrariedades como estas. Un par de décadas atrás se ha puesto gran interés en los denominados vectores no virales, demarcando que son adecuados para utilizarlos como vehículos de envío en terapia génica respecto a su facilidad de uso, producción a gran escala y la falta de respuesta inmune específica considerable hacia ellos, por esto se ha tomado interés a una variedad de sistemas no virales para utilizarlos en terapia génica (Li y Huang, 2000).

### **10.3.1 Vectores no virales.**

Los vectores no virales son mucho menos inmunogénicos (Hardee *et al.*, 2017) y abarcan todos los sistemas físicos y químicos que van desde liposomas catiónicos, polímeros, dendrímeros, nanopartículas magnéticas, bacterias, etc. (Figura 2) (Nayerossadat *et al.*, 2012). En las últimas décadas, la aplicación de la nanotecnología en el diseño de vectores no virales ha mejorado enormemente su eficiencia, especificidad y biocompatibilidad de transfección génica.



**Figura 2. Vectores no virales para terapia génica** (Akhtar S. 2006).

El número de vectores no virales en ensayos clínicos también ha aumentado. Estos vectores no virales están diseñados con muchas propiedades favorables para superar las barreras biológicas en su viaje desde el sitio de administración al sitio de acción: el citoplasma o el núcleo. En la sangre, los vectores de administración de genes están diseñados para evitar la filtración renal rápida, escapar del sistema fagocítico mononuclear (SFM) y el sistema reticuloendotelial (SRE) para prolongar su circulación sanguínea para una mayor acumulación en el tejido tumoral a través de la permeabilidad y retención. También están diseñados para responder al microambiente tumoral y a las señales intracelulares y así administrar ácidos nucleicos en el citosol o el núcleo para la extracción o expresión de genes (Zhou *et al.*, 2017). Para entender más sobre estos vectores no virales, es necesario profundizar a detalle en cuanto a los mecanismos de liberación y entrada a las células huésped.

### 10.3.2 Vectores catiónicos.

#### Lípidos catiónicos.

Los lípidos catiónicos pueden condensar los ácidos nucleicos en lipoplejos y se han utilizado ampliamente para la administración de genes (Semple *et al.*, 2010; Jones *et al.*,

2013), algunos de los cuales se han utilizado en ensayos clínicos que incluyen lipofectina y lipofectamina. Lipofectin es un kit de administración de genes *in vitro* comercializado. La lipofectamina se compone de una mezcla de un lípido poliacidónico 2,3-dioleiloxi-N-[2-(esperminacarboxamido) etil]-N, N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA) y 1,2-dioleoifosfatidiletanolamina (DOPE) (Dalby *et al.*, 2004). Los lípidos catiónicos generalmente se mezclan con lípidos auxiliares tales como DOPE o colesterol para promover la condensación de ácidos nucleicos en una estructura de fase hexagonal estable, que es favorable para la eficiencia de la transfección (Gao y Huang, 1995; Lasic, 1996), DOPE no solo promueve la formación de una estructura de fase hexagonal, sino que también facilita que los ácidos nucleicos escapen de los endosomas y se liberan del complejo (Hoekstra *et al.*, 2007).

### Polímeros catiónicos.

Polímeros catiónicos a base de aminas como la polilisina (PLL), polietilenimina (PEI), poliamidoamina (PAMAM) y quitosán han sido explotados como polímeros acarreadores de genes (Figura 3).

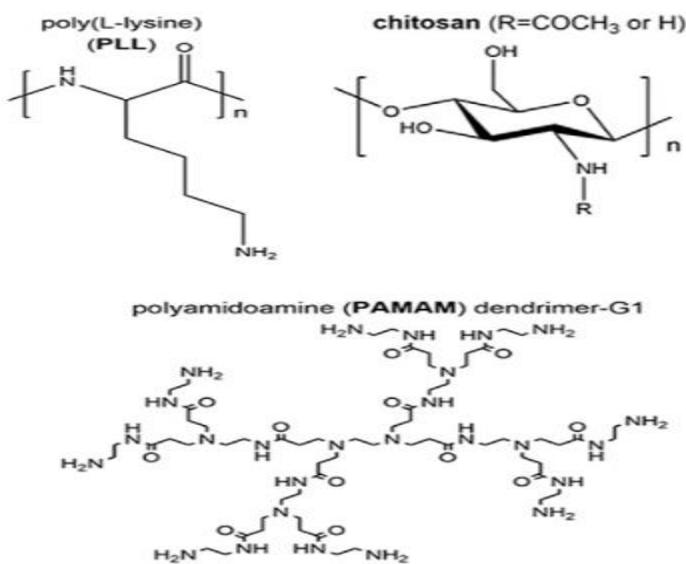


Figura 3. Estructura química de polímeros catiónicos (Zhou *et al.*, 2017).

Estos polímeros pueden acomplejarse con los ácidos nucleicos cargados negativamente para formar poliplejos nanométricos y así protegerlos contra la degradación enzimática y potenciar su entrada celular (Zhou *et al.*, 2017).

### **PLL**

PLL es uno de los polímeros más usados para la entrega de genes. Su estructura biodegradable lo hace atractivo para su uso *in vivo*. La transfección génica de los complejos poliméricos de PLL es débil, debido a que pueden quedar atrapados en el endosoma y lisosoma después de la endocitosis celular. Debido a esto PLL es usualmente modificado con los grupos endosomolítico (histidilo e imidazol) para facilitar el escape lisosomal y así mejorar su actividad de transfección.

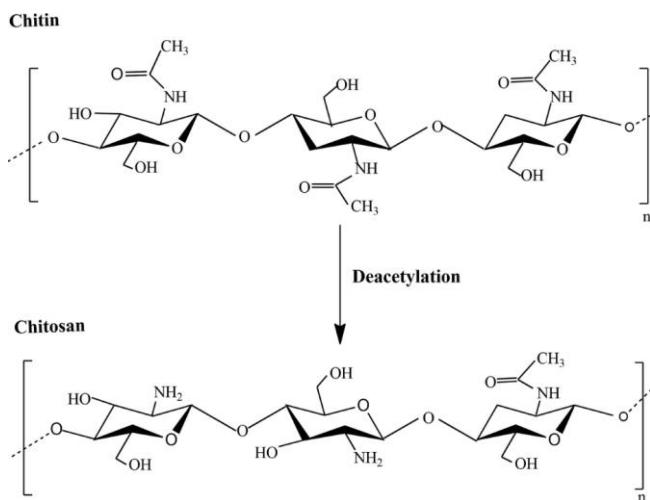
### **PEI**

PEI, particularmente con un peso molecular de 25 kDa, muestra una gran eficiencia de transfección en una amplia gama de tipos de células. Su alta eficiencia de transfección de genes es, posiblemente, porque puede romper los endosomas a través del mecanismo protón-esponja. La eficacia de transfección y la toxicidad de PEI están estrechamente asociadas con su peso molecular. La PEI de alto peso molecular generalmente tiene una eficiencia de transfección favorable, pero también una alta toxicidad debido a su daño inducido por la membrana celular y la apoptosis. PEI con el peso molecular en el rango de 20 a 30 kDa exhibe alta eficiencia de transfección; especialmente, 25 kDa PEI se considera el estándar de oro en la transfección genética de polímeros. Aunque el PEI de bajo peso molecular (<2,000 Da) ha reducido la toxicidad, es incapaz de condensar el ADN y, por lo tanto, no es efectivo para la transfección (Zhou *et al.*, 2017).

### **10.3.3 Quitosán.**

Otro de los polímeros catiónicos más utilizados es el quitosano; es un polisacárido poliacidónico natural biodegradable compuesto de unidades de D-glucosamina y N-acetil

D-glucosamina unidas por enlaces glucocídicos 1,4 derivados de la desacetilación parcial de la quitina (Figura 4) de los caparazones de los crustáceos, gambas, cangrejos, camarones, calamares, así como de las paredes celulares de los hongos (Koping *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004; Saranya *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2017; Ali y Ahmed, 2018; Hu *et al.*, 2018), es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa (Ali y Ahmed, 2018).



**Figura 4. Estructura del quitosano.** Quitina ( $\beta$ -(1-4)- N-acetyl-D-glucosamina) y quitosano ( $\beta$ -(1-4) -D-glucosamina) producto de la desalcalización parcial de la quitina (Khattak S *et al.*, 2019).

El quitosano es un material multifuncional, ampliamente considerado como un polímero no tóxico, biodegradable, biocompatible (Koping *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004; Kean y Thanou, 2010; Saranya *et al.*, 2011;), con actividad supresora de tumores (Ye *et al.*, 2017), antibacteriana, fungicida y baja inmunogenisidad (Ali y Ahmed, 2018; Hu *et al.*, 2018). Además de todas estas características positivas, el quitosano exhibe otras propiedades relevantes, como la mucoadhesión, la transfección, la gelificación *in situ*, la mejora de la permeación y la inhibición de la bomba de eflujo, en reconocimiento de todas estas características el quitosano se ha indicado como un biomaterial prometedor para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas como la administración controlada de medicamentos, ingeniería de tejidos, bioimágenes, dispositivos biomédicos, cicatrización de heridas (Rodrigues *et al.*, 2012; Ali y Ahmed, 2018). En 2001, fue

aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) como sustancia GRAS (generalmente reconocida como segura) (Ali y Ahmed, 2018), además para su uso en vendajes para heridas (Kean y Thanou, 2010; Rodrigues *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2017), para ingeniería de tejidos y suministro de medicamentos (Mohamed *et al.*, 2017). También está aprobado para aplicaciones dietéticas en Japón, Italia y Finlandia (Kean y Thanou, 2010).

El quitosano está disponible en una variedad de formas que difieren principalmente en el peso molecular y el grado de desacetilación (Rodrigues *et al.*, 2012), dependiendo del procedimiento de preparación y sus fuentes, su peso molecular (Mw) puede variar de 300 a más de 1000kD con un grado de desacetilación de 30% a 95% (Ali y Ahmed, 2018). Estas diferencias afectan características importantes como la solubilidad y la mucoadhesividad. Con un pKa de aproximadamente 6.5, el quitosano es soluble en soluciones ácidas debido a la protonación de los grupos amino que componen la cadena polimérica a este pH, el quitosano altamente desacetilado (85%) es fácilmente soluble en soluciones de pH de hasta 6.5, pero a medida que disminuye el grado de desacetilación, la solubilización se vuelve más difícil. Con respecto a la capacidad mucoadhesiva del polímero, esta incrementa con el aumento en el grado de desacetilación, ya que esto proporciona más grupos amino cargados positivamente disponibles para la interacción con residuos cargados negativamente del moco, es decir, ácido siálico. De hecho, esto explica por qué la mayor parte de las aplicaciones de quitosano en la administración de medicamentos informa el uso de quitosano altamente desacetilado, ya que la mucoadhesión es responsable de una retención más prolongada en el sitio de acción o absorción (Rodrigues *et al.*, 2012).

Inicialmente, el quitosano utilizó en aplicaciones médicas, como para el vendaje de heridas y la ingeniería de tejidos, sin embargo, con el tiempo, el quitosano se desarrolló como un candidato destacado para el sistema de administración de biomacromoléculas y fármacos (Ali y Ahmed, 2018), el quitosano es uno de los materiales más populares en el campo de la entrega de medicamentos y es, con mucho, el más aplicado de los polímeros naturales, debido a sus propiedades mucoadhesivas y de absorción, estrechamente relacionadas con el carácter catiónico del polímero. De hecho, debido a su carga

positiva, el quitosano tiene la característica especial de adherirse a las superficies mucosas, favoreciendo la interacción del fármaco con la capa de moco que cubre diferentes superficies epiteliales.

Las aplicaciones del quitosano en el campo de la administración de fármacos se han centrado principalmente en la producción de acarreadores que mejoran el rendimiento y la eficacia de las moléculas encapsuladas, ya sean macromoléculas o fármacos de bajo peso molecular. Las nanopartículas y las micropartículas, como matrices continuas sólidas, son los acarradeadores más habituales con una composición a base de quitosano. Es importante destacar que muchos trabajos informan el uso de quitosano como material de recubrimiento, en lugar de ser parte de la matriz del sistema. Con respecto a este, se ha informado el recubrimiento de varias estructuras, incluidas las nanopartículas lipídicas sólidas, las nanopartículas poliméricas y liposomas. El objetivo claro de este enfoque es modificar las propiedades de la superficie de la estructura del núcleo, ya sea para mejorar el patrón de interacción con las estructuras circundantes o para mejorar el perfil de biodegradación. Una de las propiedades más relevantes del quitosano, con especial interés en la administración de fármacos, se basa en su capacidad para abrir transitoriamente las uniones epiteliales estrechas. Esta capacidad se ha demostrado en numerosas ocasiones, tanto en forma de solución como de acarreador, lo que resulta en la mejora de la permeación de macromoléculas a través de epitelios bien organizados como el nasal, intestinal, ocular, bucal y pulmonar. Otra característica del quitosano que aumenta el interés en el polímero es la flexibilidad de su estructura molecular, que facilita las modificaciones químicas que se realizan para mejorar aún más varias propiedades, como la solubilidad o la mucoadhesión.

Todas las propiedades del quitosano mencionadas anteriormente, desde sus propiedades estructurales intrínsecas hasta las capacidades demostradas de mejora de la mucoadhesión y la permeación, así como la biodegradabilidad, dotan a este polímero de un valioso potencial para aplicaciones de administración de fármacos. (Rodrigues *et al.*, 2012).

#### **10.3.4 Biocompatibilidad del quitosan.**

Su biocompatibilidad es un tema actual de gran importancia, aunque el significado real de la palabra muchas veces se ignora. La biocompatibilidad se aborda con frecuencia como ausencia de toxicidad, pero estos son conceptos diferentes que se refieren a contextos diferentes. En una revisión muy elucidativa sobre la seguridad preclínica de los vehículos poliméricos, Gaspar y Duncan indican claramente que, si bien las moléculas del fármaco deben discutirse en términos de toxicidad, los materiales biomédicos, que incluyen materiales poliméricos, deben considerarse por su biocompatibilidad. Desde esta perspectiva, la toxicidad se refiere al daño potencial que puede causar un material, mientras que la biocompatibilidad se define, como la capacidad de un biomaterial para realizar su función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar efectos locales o sistémicos indeseables en el receptor o beneficiario de esa terapia, pero generando la respuesta celular o tisular beneficia más apropiada. La formulación de quitosano bajo la forma de un vehículo puede tener implicaciones en su biocompatibilidad y, por lo tanto, es importante abordar y tratar de manera diferente, tanto la biocompatibilidad del quitosano como molécula y como vehículo. Como una molécula cargada positivamente, el quitosano generalmente proporciona una gran interacción con las membranas celulares, que están cargadas negativamente (aproximadamente -70 mV) debido a los intercambios iónicos entre el medio intracelular y extracelular, que están mediados por la bomba de Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>. En realidad, debido a esa carga positiva, las nanopartículas de quitosano a menudo son absorbidas por las células. Cuando el quitosano se formula como un vehículo y forma un complejo con un fármaco, el número de grupos amino cargados positivamente que permanece disponible con frecuencia disminuye, comparativamente. En consecuencia, este menor número de cargas afecta su capacidad de interactuar con las membranas celulares y el medio ambiente circundante, lo que puede disminuir su absorción y, posiblemente, su posible toxicidad. Como tal, los quitosanos altamente desacetilados tienen una mayor propensión natural a la interacción celular, como se ha demostrado (Rodrigues *et al.*, 2012).

### **10.3.5 Biodegradabilidad del quitosan.**

La biodegradabilidad se convierte en una característica crucial cuando se considera la toxicidad aguda y a largo plazo, ya que los materiales no degradables pueden acumularse en los órganos o incluso intracelularmente. En el caso de la absorción sistémica de polímeros hidrofílicos como el quitosano, deben tener un peso molecular adecuado para el aclaramiento renal. Si el tamaño del polímero administrado es mayor que esto, entonces el polímero debería sufrir degradación. La biodegradación (química o enzimática) proporcionaría fragmentos adecuados para el aclaramiento renal. La degradación química en este caso se refiere a la degradación catalizada por ácido, es decir, en el estómago. Aunque se ha informado que la despolimerización por oxidación-reducción y la degradación por radicales libres, es poco probable que sean una fuente significativa o degradación *in vivo*.

El quitosano es altamente biodegradable, debido principalmente al hecho de que, en condiciones fisiológicas, sus cadenas moleculares pueden ser digeridas por enzimas que hidrolizan los enlaces glucosamina-glucosamina, glucosamina-N-acetil-glucosamina y N-acetyl-glucosamina-nacetil-glucosamina, como lisozimas o quitinasas, el primero existe en las superficies mucosas, el segundo es producido por la microbiota intestinal normal.

Se han identificado ocho quitinasas humanas, tres de las cuales han mostrado actividad enzimática, (aún no se han investigado con respecto a la degradación del quitosano y / o sus derivados) estas formas son: la quitinasa ácida de mamífero (AMCasa), la di-N-acetylquitobiasa y la quitotriosidasa. AMCasa se identificó en el tracto gastrointestinal y el pulmón y se ha demostrado que juega un papel importante en el asma. Se ha demostrado que este papel está mediado a través de la respuesta de células T auxiliares de tipo 2 que induce la secreción de AMCasa de las células epiteliales pulmonares de una manera dependiente del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La di-N-acetylquitobiasa se identificó en hígados de pacientes con enfermedad de Tay Sachs

y Sandhoff en 1974 y en hígado de rata en 1986, donde se descubrió que catabolizaba las glucoproteínas ligadas a asparagina. La quitotriosidasa está presente en exceso en el plasma de pacientes con enfermedad de Gaucher. Esta enzima tiene implicaciones en algunas enfermedades (enfermedad de Gaucher y aterosclerosis) pero también en mecanismos de protección contra hongos y parásitos que tienen estructuras quitinosas.

La capacidad de un material para degradarse biológicamente, aunque se entiende positivamente, también debe considerarse desde el punto de vista de la posibilidad de producir productos de degradación tóxica. En el caso del quitosano, su degradación no plantea ninguna preocupación crítica, ya que los productos de su metabolismo son oligosacáridos que se incorporan a las vías metabólicas de glucosaminoglicanos y glucoproteínas o se excretan fácilmente en la orina directamente. Además, se han presentado pruebas en varios informes de que no se observan problemas de acumulación o retención en el cuerpo.

En general, tanto la tasa como el grado de biodegradabilidad del quitosano en organismos vivos dependen del grado de desacetilación y peso molecular. El aumento del grado de desacetilación disminuye la tasa de degradación.

En cuanto a la degradación *in vivo* de quitosano después de la administración intravenosa no está claro cuál es el mecanismo de degradación cuando se inyecta quitosano por vía intravenosa. Es probable que los procesos de degradación y eliminación de la distribución dependan mucho del peso molecular. Los posibles sitios de degradación, inferidos debido a la localización del quitosano, pueden ser el hígado y el riñón. En un estudio, se encontró que los oligosacáridos de quitosano aumentan la actividad de la lisozima en la sangre de conejos inyectados por vía intravenosa con 7.1–8.6 mg / kg (Kean y Thanou, 2010).

Suzuki y col. administraron quitosano (700 kDa) con Holmium-166 en forma de complejo de quelato y estudiaron su distribución en ratas y ratones. Encontraron que 72 h después de i.v., el 4,2% y el 4,8% de la radiactividad se recuperó en la orina y las heces, respectivamente. Banerjee y col. inyectaron nanopartículas de quitosan (10 kDa) marcadas con 99 mTc por vía intravenosa, los autores encontraron que el principal

órgano de absorción parece ser el hígado, donde se determinó que la acumulación aumenta con el incremento del peso molecular. Sin embargo, hubo una recuperación de menos del 60% de la dosis administrada total en todos los casos y no se normalizó al peso del tejido. Esta falta de normalización dificulta la comparación de estos resultados con los de otros estudios. La mayoría de los estudios han encontraron que el hígado es un sitio significativo de acumulación; Esto podría deberse a que este órgano es un sitio primario de metabolismo.

Zhang y col. analizaron la biodistribución de paclitaxel a partir de micelas de quitosano de noctil-O-sulfato en ratas Sprague-Dawley, se encontró que el quitosano modificado marcado con fluorescencia se localiza principalmente en el riñón (riñón> hígado> bazo> genital> intestino delgado> plasma> pulmón> intestino> estómago> corazón> músculo> cerebro) y se excreta por vía renal (Kean y Thanou, 2010).

#### **10.3.6 Toxicidad del quitosan.**

El quitosano es ampliamente considerado como un polímero no tóxico, biológicamente compatible. Está aprobado para aplicaciones dietéticas en Japón, Italia y Finlandia, y ha sido aprobado por la FDA para su uso en vendajes para heridas

En un ensayo clínico de fase 2 que incluyó la inyección percutánea de complejo de quitosano-166 holmium, para el tratamiento del carcinoma hepatocelular, en pacientes con malas perspectivas quirúrgicas, informó resultados seguros y eficaces, en un estudio sobre quelación de grasas, no se informó que el quitosano de 4,5 g / día en humanos fuera tóxico, aunque no se encontró una reducción significativa en la grasa. En un estudio relativamente largo (65 días), no se encontró ningún efecto perjudicial cuando se injectaron oligosacáridos de quitosano (7,1–8,6 mg / kg durante 5 días). Un aumento en la actividad de la lisozima fue evidente en el primer día después de las inyecciones Rao y col. no declararon "efectos tóxicos significativos" del quitosano en las pruebas de toxicidad aguda en ratones, ni irritación de los ojos o la piel en conejos y cobayas, respectivamente. Sin embargo, 50 mg/kg de quitosano administrado por vía intravenosa causó la muerte, probablemente debido a la agregación de la sangre (Kean y Thanou,

2010), esto confirma un principio fundamental de toxicología, expresado por primera vez por Paracelso, diciendo que "la dosis produce el veneno". Además de depender de la dosis, la toxicidad también está condicionada por las características del polímero, como el peso molecular y el grado de desacetilación, así como por el pH del medio de incubación y el tiempo de incubación (Rodrigues *et al.*, 2012).

La mayoría de los estudios reportados, el quitosano muestra efectos tóxicos mínimos y esto justifica su selección como un material seguro en la administración de medicamentos. Sin embargo, es importante enfatizar los estudios de seguridad cuando se sugieren nuevos derivados de quitosano para uso biomédico (Kean y Thanou, 2010).

#### **10.4 Nanopartículas Magnéticas.**

El término "nanopartículas" se refiere a materiales con al menos una dimensión entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros (nm) y generalmente contienen de varios cientos de átomos. Los materiales magnéticos son aquellos materiales que muestran una respuesta a un campo magnético aplicado. Se clasifican en cinco tipos principales; ferromagnético, paramagnético, diamagnético, antiferromagnético y ferrimagnético. En los materiales ferromagnéticos (como el hierro, el níquel y el cobalto) un átomo tiene un momento magnético neto debido a electrones no apareados.

Las Nanopartículas magnéticas (MNP) son de gran interés para una amplia gama de disciplinas, tales como fluidos magnéticos, catálisis, biomedicina, almacenamiento de energía magnética, almacenamiento de información y espintrónica. Se utilizan para mejorar la capacidad de los dispositivos de almacenamiento magnético, como cintas magnéticas y discos duros de computadora. Las nanopartículas magnéticas también se pueden usar como sensores gigantes de resistencia magnética (Issa *et al.*, 2013).

En la última década, las nanopartículas de óxido de hierro (IONP) han atraído cada vez más atención por sus excelentes propiedades fisicoquímicas y sus prometedoras aplicaciones biomédicas como: administración de fármacos, hipertermia magnética, resonancia magnética (MRI), reparación de tejidos, separación magnética, transfección

magnética, detección de hierro, terapia de quelación y terapia de cáncer (Issa *et al.*, 2013; Maldonado *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2018). Las IONP son un excelente material de nanomedicina debido a su superparamagnetismo, altos momentos magnéticos, contribución adicional de anisotropía magnética, irreversibilidad de la magnetización de alto campo, gran área superficial, efecto magnetotérmico, capacidad de manipular el movimiento de las partículas y biocompatibilidad ideal. Las tres estructuras más comunes de las IONP que se utilizan en aplicaciones biomédicas son: magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ); entre ellos, las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  son de gran interés para aplicaciones *in vivo* y clínicas debido a su propiedad superparamagnética, y que no tienen magnetismo restante después de la eliminación del campo magnético (Issa *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2018).

Sin embargo, es importante mencionar que la oxidación y erosión ácida de la superficie en las IONP es un problema importante, ya que su degradación es más rápida. Aunado a esto las IONP deben de interactuar con moléculas biológicas y poder evadir el sistema reticuloendotelial (RES). Inmediatamente después de ser injectados en el torrente sanguíneo, las IONP se recubren con proteínas del plasma sanguíneo. Este proceso, conocido como opsonización, hace que las IONP sean susceptibles de identificación y posterior eliminación por las células fagocíticas, también se sabe que las IONP desnudas generalmente muestran una mayor toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, estos complejos son recubiertos con polímeros como: almidón, dextrano, polietilenglicol (PEG) y quitosano, en consecuencia aumenta su tiempo de circulación, biocompatibilidad y aumenta la probabilidad de alcanzar sus células objetivo (Issa *et al.*, 2013). Estas modificaciones de la superficie tienen muchas funciones importantes que incluyen: proteger contra la aglomeración del núcleo de óxido de hierro y mejorar la dispersión, proporcionar mangos químicos para la conjugación de moléculas de fármacos, ligandos dirigidos y restos informadores, limitan interacciones celulares específicas para menor citotoxicidad y mayor (Xie *et al.*, 2018).

## **10.5 Nanopartículas magnéticas poliméricas.**

Las Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (IOMNP) funcionalizadas con polímeros se han investigado ampliamente debido a las deficiencias de los agentes quimioterapéuticos convencionales como: su focalización inespecífica, eliminación rápida del cuerpo y los efectos secundarios hacia los tejidos sanos. Las IOMNP poliméricas ofrecen propiedades físicas y químicas únicas, una toxicidad significativamente disminuida, alta capacidad para acarrear fármacos, mayores fuerzas repulsivas para equilibrar las fuerzas de atracción magnéticas y de Van der Waals y una fácil funcionalización (Xie *et al.*, 2018).

Las IOMNP recubiertas pueden funcionalizarse uniendo varias moléculas tales como grupos carboxilo, biotina, aminas, etc. Estas moléculas sirven para acoplar varios fármacos terapéuticos o anticuerpos dirigidos al complejo IOMNP. Estos portadores magnéticos pueden usarse para atacar sitios u órganos específicos en el cuerpo para terapia tumoral o administración de genes.

El vector cargado de fármaco se introduce por vía intravenosa o intraarterial en el sistema circulatorio en complejos biocompatibles. El campo magnético de alto gradiente se usa para apuntar y concentrar el vector magnético en un sitio específico. Luego, el fármaco se puede liberar de forma pasiva, es decir, debido a la degradación del vector o de forma activa mediante la aplicación de un pulso magnético o calor. Cabe señalar que el entorno natural del sitio juega un papel importante en la liberación del fármaco a través de diversas condiciones como el pH y la osmolalidad, experimentan un cambio en sus propiedades fisiológicas que conduce a su liberación en el área u órgano afectado. Obviamente, el objetivo del vector se logra a través de una fuerza magnética ejercida a través de la interacción del momento dipolar magnético de las IOMNP con el gradiente de campo magnético aplicado. El éxito del proceso de selección y entrega dependerá de una interacción compleja de muchas variables, como las propiedades del campo magnético aplicado y las IOMNP, incluida la estabilidad de la unión del fármaco, las

condiciones hidrodinámicas, la concentración de IOMNP, el método de inyección, la ubicación y profundidad del sitio objetivo ( Issa *et al.*, 2013; Ali y Ahmed, 2018).

Desde la idea pionera de que las partículas finas de hierro podrían transportarse a través del sistema vascular y concentrarse en un sitio específico del cuerpo con la ayuda de un campo magnético, la aplicación de nanopartículas magnéticas para administrar medicamentos o anticuerpos a órganos o tejidos se ha convertido en un campo de investigación activo (Freeman *et al.*, 1960; Goodwin *etal.*, 1999).

Arias y colaboradores prepararon nanocompuestos de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) / quitosano para el suministro intravenoso de gencitabina. La capacidad de respuesta magnética se examinó registrando el ciclo de histéresis por exposición a un imán permanente de 1,1 T. La retención del fármaco en la cubierta polimérica proporciona una mayor carga junto con un perfil de liberación del fármaco más lento. Ellos observaron que la liberación del famaco fue dependiente del pH, por lo cual puede ser un potencial vehículo para el tratamiento del cáncer (Arias *et al.*, 2012). En otro informe, fue reportado un nanocompuesto magnético mesoporoso basado en magnetita y sílice ( $\text{SiO}_2$ ) envuelto en quitosano para controlar la liberación de DOX. El compuesto mostró una buena sensibilidad al pH y liberó el 86,1 % del fármaco total cargado en 48 horas a un pH de 4,0. Se descubrió que el comportamiento de liberación era de tipo controlado por difusión (Wu *et al.*, 2017). El quitosano actuó como un agente bloqueante para inhibir la liberación prematura de la droga. En un estudio en 2016 Alvizo y colaboradores utilizaron nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosan y pDNA (gen Trail) como envío de genes dirigidos a tumor en ratones, encontrando una reducción significativa del tumor, esto fue asociado a que las NP fueron direccionadas al sitio del tumor mediante un imán y en el sitio del tumor hubo una mayor expresión de Trail comparado con otros órganos (Alvizo *et al.*, 2016).

## **10.6 Bacterias como vectores.**

Otro tipo de vectores no virales que se utilizan son las bacterias, cualquier bacteria adecuada para su uso en terapia debe poseer varias características. Deben ser genéticamente tratables, ser no patogénicas, por lo que deben ser bien toleradas por el anfitrión, exhibir una replicación preferencial y acumulación dentro de los tumores, ser móviles, no inmunogénicas y ser susceptible a antibióticos para que se puedan eliminar del el cuerpo después de la entrega de genes. Como vectores bacterianos que satisfacen los criterios anteriores, dos estrategias están surgiendo en función de si las bacterias se utilizan o no como una herramienta de entrega de proteína o gen.

La idea básica de la entrega de genes es que las cepas bacterianas transformadas suministren genes codificados en un plásmido eucariótico en células donde se expresan como productos génicos terapéuticos. El proceso de entrega podría implicar la localización intracelular de las bacterias. En otro enfoque, las bacterias no se utilizan para la transferencia de genes, sino más bien persisten en los tejidos diana y producen las proteínas terapéuticas *in situ*. El transgén puede ser expresado en el citoplasma mediante transcripción procariota y su maquinaria de traducción (Min *et al.*, 2010).

### **10.6.1 Bacterias como vehículos en terapia tumoral.**

Diversas líneas de investigación en el desarrollo de terapias contra el cáncer se han centrado en la utilización de bacterias genéticamente modificadas a manera de utilizarlas como vectores en sistemas de envío y liberación de plásmidos, se ha reportado que algunas especies de bacterias genéticamente modificadas tienen la capacidad de alojarse y replicarse favorablemente en el interior de tumores sólidos, esto se ha atribuido a las condiciones hipóxicas presentes en las áreas necróticas dentro de los tumores, lo cual sitúa a estas bacterias como potenciales vehículos localizados (Theys *et al.*, 2003). Bacterias que colonizan los tumores con algun efecto benéfico de la infección bacteriana fue reconocida por primera vez por el Dr. William B. Coley hace más de 100 años. Desde entonces, las estrategias oncolíticas utilizando diversas cepas bacterianas, tales

como *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *E. coli*, *Clostridium*, *Bifidobacterias*, y *Listeria*, han sido ampliamente exploradas como alternativas a las terapias tradicionales contra el cáncer, como la radioterapia o la quimioterapia. Estas bacterias según se informa tienen una propensión a acumular de forma natural y replicarse en una amplia variedad de tumores sólidos.

Bacterias dirigidas a tumores se han aplicado solas o en combinación con agentes terapéuticos convencionales, también han sido manipulados para entregar moléculas terapéuticas. En particular, *S. typhimurium* ha sido modificada por bioingeniería para generar señal de bioluminiscencia o de fluorescencia y se ha empleado para controlar la migración bacteriana a los tumores en modelos de animales pequeños. En otro estudio se demostró que *Salmonella* presenta la capacidad de transferir plásmidos con expresión eucariótica al interior de células de mamíferos, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Bauer *et al.*, 2005), este modelo fue tomado en cuenta en las líneas de investigación que utilizan a microorganismos como vehículos de envío dirigido y fue orientado a tratamiento de cáncer, ejemplo de ello fue utilizar a *Salmonella typhimurium* transformada con un plásmido que contenía el ligando Flt3 el cual es un agente tumoricida, Flt3 demostró ser expresado en el interior de células tumorales y presentó efecto tumoricida *in vitro*, en el modelo *in vivo*, se administró *Salmonella typhimurium* modificada en sitios proximales al tumor de manera que esta aproximación facilitara la llegada al sitio diana, con ello se demostró una regresión en el volumen tumoral aproximada del 50% en comparación con los controles (Yoon *et al.*, 2007). Se demuestra con esto la disponibilidad de *Salmonella typhimurium* para el tratamiento de tumores sólidos, otros modelos de transfección a células eucarióticas como este se han desarrollado utilizando microorganismos como *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium* (Schoen *et al.*, 2004; Loeffler *et al.*, 2006; Daudel *et al.*, 2007).

En diversos modelos se ha demostrado el potencial de estos microorganismos para el desarrollo de terapia génica, estos datos pueden facilitar la predicción de la eficacia terapéutica de bacterio-terapia a través de la visualización de la acumulación bacteriana y replicación en órganos específicos. (Dunham 2002).

### **10.6.2 Colonización bacteriana en tumores.**

La colonización bacteriana de los tumores se atribuyó inicialmente a la naturaleza hipoxica de los tumores sólidos (bajos niveles de O<sub>2</sub>). Hipoxia es causada por tumores de crecimiento rápido con suministro insuficiente de sangre, y es una característica bien establecida de tumores sólidos. Se ha propuesto que la naturaleza anaerobia de hipoxia y regiones necróticas dentro de los tumores promueve el crecimiento de bacterias anaerobias y anaerobias facultativas. Las áreas de necrosis también pueden proporcionar nutrientes tales como purinas para promover aún más el crecimiento de bacteria. La participación de la quimiotaxis bacteriana hacia compuestos quimio-atrayente presentes en las regiones necróticas (por ejemplo, aspartato, serina, citrato, ribosa o galactosa) producidos por las células quiescentes de cáncer también se ha sugerido como un factor contribuyente. Sin embargo, la teoría de la hipoxia está evolucionando como se hace evidente que otros elementos del microambiente único dentro de los tumores sólidos pueden estar involucrados, incluyendo neovasculatura aberrante y supresión inmune local (Baban *et al.*, 2010).

Esta es la razón por la cual se han orientado diversas líneas de investigación hacia bacterias que por naturaleza propia pueden colonizar tumores y no son patogénicas para el huésped. Un grupo muy importante y altamente representativo de este tipo son las bacterias lácticas. El uso de bacterias lácticas como vehículos de envío de material genético representa un modelo atractivo para diseño de sistemas en el tratamiento de cáncer. Se ha demostrado que bacterias lácticas como *Bifidobacterium* tienen el potencial de liberar un plásmido contenido, ser internalizado y ser expresado (Min *et al.*, 2010).

## **10.7 *Bifidobacterium* como vector.**

Dentro del tratamiento de pacientes con cáncer la terapia génica se presenta como una alternativa importante, sin embargo el éxito de esta terapia depende en gran medida del desarrollo de un vector o vehículo de envío que sea capaz de entregar de forma eficiente y selectiva el material genético deseado en las células diana, además que este vehículo presente un mínimo de toxicidad para las células normales (St George, 2003). El potencial de localización en la fracción hipóxica de tumores sólidos ha sido determinado y ampliamente estudiado en *Bifidobacterias* el cual es clasificado como un bacilo no-patógeno anaerobio, al ser inoculado vía intravenosa prolifera de forma selectiva y localizada en diferentes tipos de tumores sólidos en modelos murinos (Yazawa *et al*, 2000).

Los primeros en demostrar que bacterias anaerobias del género *Bifidobacterium* podían selectivamente germinar y crecer en regiones hipóxicas en tumores sólidos después de una inyección intravenosa fueron Kimura y colaboradores debido al ambiente hipóxico requerido para el crecimiento de esta bacteria. Otro estudio fue el de Yazawa y colaboradores, administraron intravenosamente *B. Longum* con el plásmido denominado pBLES100 a ratones con carcinoma mamario inducido e inicialmente se observó una distribución de los bacilos viables en todo el cuerpo pero después de 96-168 horas solo se detectaron en el tejidos tumorales, los cuales presentaban replicación y expresión del plásmido pBLES100. Los bacilos fueron solo encontrados en el tumor debido al ambiente de hipoxia necesario para el crecimiento de esta bacteria, por lo que lo que se sugiere como un novedoso vector de entrega de genes específico a tumores (Yazawa *et al*, 2001).

Un diseño de aplicación terapéutica utilizando a *Bifidobacterium longum* se describe en el desarrollo del plásmido pBLES100-s-eCD que codifica para el gen de citosina deaminasa, esta enzima tiene la capacidad de convertir la 5-fluorocitocina (5-FC) en 5-fluorouracilo (5-FU) que a su vez es citotóxico, con esto se demostró la eficacia

antitumoral en ratones portadores de tumor mamario mediante la bactofección directa o intravenosa de *B. longum*. Se confirmó que *B. longum*/S-eCD producen selectivamente citosina desaminasa en tejido tumoral hipódico, la CD fue capaz de convertir el 5-fluorocitocina en 5-fluorouracil *in vivo*, a lo cual se le adjudica el efecto antitumoral (Sasaki *et al*, 2006), también *Bifidobacterium* se ha utilizado como acarreador de genes suicidas dirigidos a tumor, se demostró que puede inhibir eficazmente el crecimiento de tumor de vejiga en ratas, aumentando la proteína caspase 3 e induciendo apoptosis en las células del tumor (Tang *et al*, 2009).

*Bifidobacterium longum* tiene la habilidad de alojarse selectivamente en tumores sólidos, la capacidad de proliferación, replicación y expresión de un plásmido dentro del microambiente hipódico del tumor.

## 10.8 Microrobots.

El suministro terapéutico es un objetivo principal de la medicina moderna. Células, nanopartículas y materiales genéticos han sido utilizados para el tratamiento y la prevención de enfermedades. Sin embargo, los desafíos en el suministro convencional de medicamentos continúan incluyendo dosis altas, administración repetida, distribución fuera del objetivo y efectos secundarios graves. Independientemente del tipo de administración, la eficacia de las formulaciones de medicamentos a menudo se ve comprometida por las pobres propiedades farmacocinéticas de los medicamentos, como la vida media corta, la biodistribución limitada y la eliminación rápida del cuerpo. Por ejemplo, las terapias basadas en péptidos y proteínas tienen una semivida sérica corta y a menudo pierden su actividad en cuestión de minutos a horas. Por lo tanto, las administraciones repetidas en dosis altas son inevitables para inducir el efecto terapéutico deseado; sin embargo, estos tratamientos producen efectos secundarios adicionales debido a la distribución no específica. Por ejemplo, un problema importante que enfrenta la doxorrubicina es la cardiotoxicidad, que puede conducir a insuficiencia cardíaca congestiva después de años. De manera similar, el cisplatino causa nefrotoxicidad y daño al tubo proximal renal. Además, una serie de barreras biológicas,

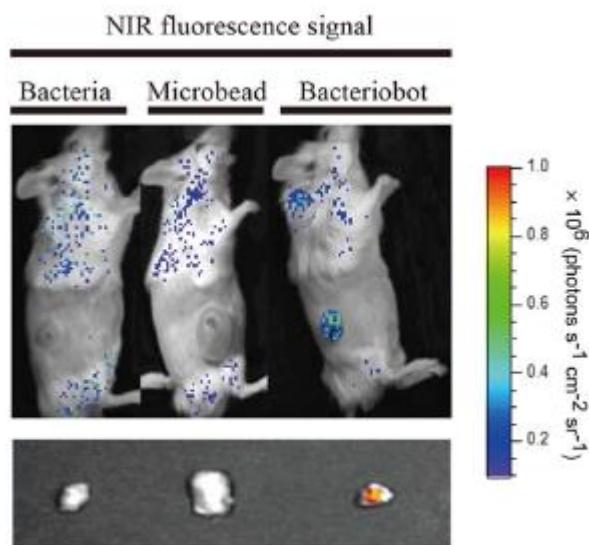
o la patología de la enfermedad, podrían limitar el acceso de medicamentos a sitios difíciles de alcanzar, lo que daría como resultado una biodisponibilidad y un índice terapéutico deficientes (Park *et al.*, 2013; Erkoc *et al.*, 2018). Por esta razón, recientemente se han explorado estrategias alternativas. Una de esas estrategias alternativas es utilizar los llamados “microrobots” (Erkoc *et al.*, 2018) ya que cuentan con mecanismos complejos que les permiten llegar a tejidos específicos, cruzar barreras no permeables fácilmente, y modular su microambiente (Wang *et al.*, 2014).

Los microbots basados en bacterias (bacteriobot) consisten en un sistema de entrega de fármacos, plásmidos y proteínas, conjugados con nanoestructuras y bacterias como un sensor, y un actuador que puede apuntar y guiar al bacteriobot a su destino a través de gradientes de temperatura, pH, oxígeno y diferentes quimioatractantes (Cho *et al.*, 2015; Erkoc *et al.*, 2018). Las nanoestructuras son acarreadas ya sea dentro o en la superficie de la membrana de las bacterias para la entrega de cargas terapéuticas en la célula (Sabu *et al.*, 2018). Además en este enfoque se aprovechan las características intrínsecas de las mismas bacterias, que incluyen quimiotaxis, magnetotaxis, galvanotaxis y fototaxis. Los Bacteriobots son uno de los vehículos más efectivos para los sistemas de administración de medicamentos (Cho *et al.*, 2015) ya que poseen la propiedad invasiva de las bacterias y pueden colonizar selectivamente las regiones hipoxicas del tumor (Sabu *et al.*, 2018).

Recientemente, se han propuesto varios tipos de bacteriobots debido a sus muchas ventajas en diversos campos, como la medicina, el monitoreo del medio ambiente, el espacio y el ejército. Especialmente, para superar los inconvenientes de la quimioterapia convencional (Park *et al.*, 2013).

En 2004, se introdujo por primera vez *Serratia marcescens*, una bacteria Gram negativa como agente activo de entrega de carga (Darnton *et al.*, 2004). En 2007, Akin *et al.*, demostró el suministro de nanopartículas y fármacos tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando *Listeria monocytogenes*. En este estudio, las nanopartículas recubiertas con estreptavidina se unieron a la superficie de la bacteria a través de la interacción biotina-estreptavidina. La absorción de las nanopartículas desnudas, un fármaco y microrobots se evaluó en células de carcinoma nasofaríngeo humano, *in vitro*. Los microrobots, que fueron fabricados usando nanopartículas que contienen genes de luciferasa, fueron

inyectados intraperitonealmente a ratones para investigar la aplicabilidad *in vivo* del sistema. Las imágenes de bioluminiscencia de los ratones después de 3 días de la inyección revelaron una transfección exitosa de los órganos con el fármaco (Akin *et al.*, 2007). Park y colaboradores proponen un microbot basado en bacterias para actividad teranóstica contra tumores sólidos. Desarrollaron un bacteriobot el cual acarrea microperlas de poliestireno recubiertas con Cy 5.5 los cuales fueron administrados en ratones y observaron que los Bacteriobots mostraron una mayor acumulación en tumor, esto fue detectado por la señal de Cy 5.5 (Figura 5).



**Figura 5. Orientación tumoral y localización de bacteriobots en un modelo de tumor de ratón singénico (Park *et al.*, 2013).**

En otro estudio publicado en 2014, se usó *Magnetococcus marinus* para transportar nanoliposomas unidos a su membrana celular, en este trabajo, los autores demostraron que es posible unir aproximadamente 70 nanoliposomas a la membrana celular bacteriana sin dañar su funcionalidad y movilidad. También analizaron la citotoxicidad de sus microrobots *in vitro* utilizando diferentes líneas celulares y revelaron que la biocompatibilidad de las bacterias mejoró cuando sus membranas celulares se funcionalizaron con nanoliposomas (Taherkhani *et al.*, 2014).

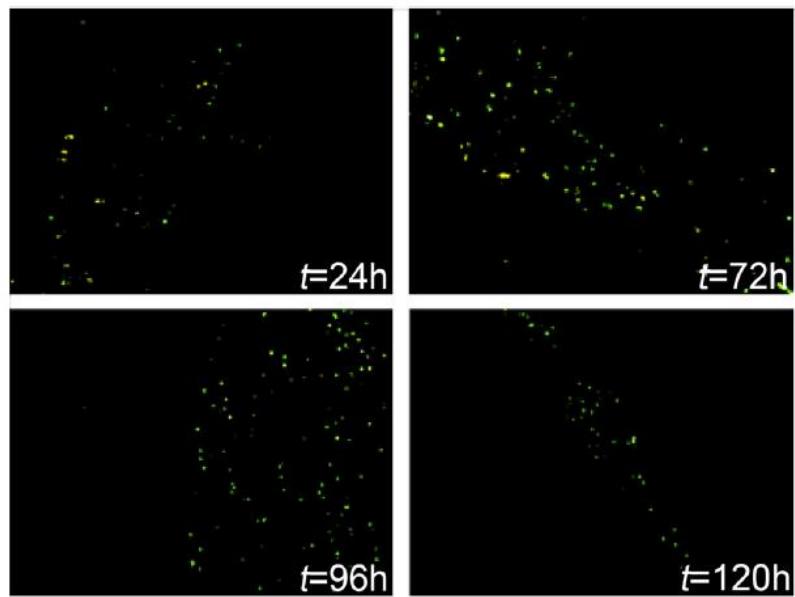
Después de una década de investigaciones físicas y químicas, los microrobots bacterianos recientemente comenzaron a usarse con más frecuencia en aplicaciones de administración de medicamentos. En 2016, Han *et al.* construyeron microrobots bacterianos basados en liposomas utilizando *S. typhimurium* atenuado. Demostraron que los microrobots bacterianos que transportan liposomas cargados de drogas tienen una mejor capacidad para matar tumores en comparación con los liposomas desnudos, que se distribuyen pasivamente debido al movimiento browniano. Además, se usó un sistema de cocultivo que contiene células sanas y células cancerosas en el mismo estudio para demostrar la quimiotaxis de los microrobots bacterianos hacia las células cancerosas (Han *et al.*, 2016). En otro estudio donde se vio una regresión tumoral fue realizado por Chen *et al* donde ratones fueron inoculados intravenosamente con  $10^5$  *Salmonellas* recubiertas de polidopamina, inmediatamente aplicaron una terapia fototermal y observaron que al día 20 hubo una regresión del tumor significativa (Chen *et al.*, 2018). Stanton y col. elaboraron un novedoso microrobot biohíbrido, fabricado a partir de micropartículas Janus con tapa metálica, donde *E. coli* se unió a la mitad del metal y DOX se cargó en la otra mitad de la micropartícula (Stanton et al., 2016). En otro estudio, la cepa MC-1 de *M. marinus* fue modificada con nanoliposomas, se utilizó en un trabajo *in vivo* para administrar un fármaco antineoplásico, en la región hipódica de tumores usando un campo magnético. Se demostró que el 55% de los microrobots bacterianos inyectados cerca del microambiente tumoral penetraron con éxito en las regiones deficientes en oxígeno con la ayuda del campo magnético (Polak et al., 2015) Afkhami y colaboradores demostraron que bacterias magnetotácticas tienen un gran potencial para ser utilizadas como acarreadores (microrobots) para la entrega dirigida de agentes terapéuticos ya que la magnetotaxis natural de la bacteria puede explotarse para dirigirlos hacia un tumor mientras es impulsado por sus propios motores moleculares (Afkhami *et al.*, 2011).

Como se vio anteriormente microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y cepas de bacterias magnetotácticas (MTB) (cepa *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, La cepa *Magnetospirillum magnetotacticum*

MS-1, la cepa *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 y la cepa *Magnetococcus* MC-1) se han utilizado para la elaboración de microbots. Sin embargo, varias cepas de bacterias, como *E. coli*, *S. marcescens* y cepas MTB todavía tienen varios puntos débiles que limitan su uso como microaccionadores para microrobots biomédicos: procedimiento de incubación complejo, resistencia a los medicamentos contra antibióticos y patogenicidad en animales vivos (Park *et al.*, 2013). Aunque las bacterias atenuadas tienen una patogenicidad limitada, la inmunogenicidad potencial también debe considerarse con respecto a las aplicaciones clínicas. Es por esto que en los últimos años se ha estado buscando un acarreador inocuo como es el caso de las *Bifidobacterias*, estas se han utilizado como agentes antitumorales mostrando infiltración específica y replicación selectiva dentro de tumores sólidos, incluida una función tumoricida directa (Xie *et al.*, 2018).

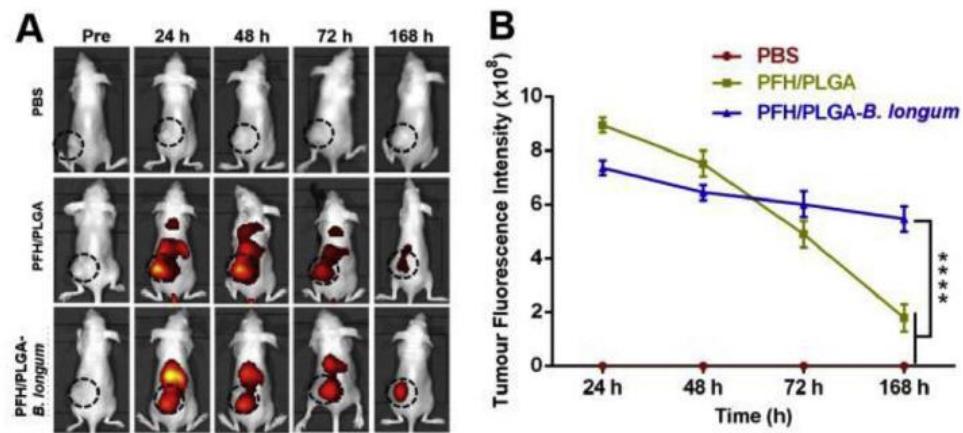
Luo y col. trabajaron con dos especies bacterianas anaeróbicas, *Bifidobacterium breve* (en el método de transporte de carga) y *Clostridium difficile* (en el método dirigido por anticuerpos), para administrar nanorods de Au, para imágenes, y para ablación térmica usando excitación de luz infrarroja cercana, en la región hipóxica de tumores sólidos *in vivo*. Observaron una mayor eficacia del tratamiento y un período de retención más prolongado de los nanorods, que se administraron mediante el método dirigido por anticuerpos en la región reducida en oxígeno de los tumores sólidos.

Liu y colaboradores utilizaron la cepa *B. bifidum* como acarreador de Quantum dots (Figura 6), los cuales fueron conjugados en la bacteria con palmitoil oleoil fosfatidilcolina, se inocularon  $2 \times 10^4$  bacilos intravenosamente en ratones C57B/6N y observaron la señal de fluorecsencia en tejido tumoral desde las primeras 24h post inyección, las máxima señal de fluorescencia fue entre las 72 y 96h, indicando que el microbot puede llegar al tejido profundo de los tumores sólidos después de ser administradas intravenosamente (Liu *et al.*, 2012).



**Figura 6.** Imágenes fluorescentes de cortes de tejido tumoral sólido en diferentes momentos después de la inyección intravenosa de Bifidobacterias con Quantum dots (Liu *et al.*, 2012).

En otro estudio en 2019, Luo y colaboradores diseñaron nanopartículas de PGLA con PFH (Figura 7) las cuales fueron conjugadas a la membrana de *B. longum*, 24h después de la administración intravenosa en ratones, se observó fluorescencia en el área tumoral desde las 24h hasta las 168 h (Luo *et al.*, 2019).



**Figura 7.** Capacidad de colonización tumoral de PFH / PLGA-*B. longum* *in vivo* (Luo *et al.*, 2019).

El bacteriobot representa un novedoso vehículo alternativo para los sistemas de administración de fármacos específicos (Cho *et al.*, 2015).

Debido a lo anterior y con base a los antecedentes mostrados, en el presente proyecto se propone el desarrollo de un microbot basado en Bifidobacterias y nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosano y pDNA, para su uso en envío dirigido de genes en cáncer. Para dicha estrategia se elaboraron nanocomplejos de nanopartículas magnéticas fluorescentes, quitosán (como agente protector), y un plásmido de DNA, que contiene un promotor cuya activación para la posterior expresión génica puede ser controlada por el microambiente tumoral. El sistema fue caracterizado y evaluado a nivel *in vivo* en un modelo tumoral de melanoma sólido implantado en muslo, así como también se monitorio el nivel de citocinas inflamatorias. En este estudio mostramos el uso simultáneo de Bifidobacterias con NCs (microbots) para entregar pDNA en un modelo *in vivo*, el transgen se expresa altamente en el tejido tumoral, el microbot no expresa el transgén de interés (en este caso, un gen bioluminiscente ) más bien actúan como vectores de entrega que transfecstan las células tumorales y entregan el transgen para que las células de los mamíferos lo expresen, el gen bioluminiscente se carga en los NC, que se transportan en la superficie de la bacteria. Aquí, aprovechamos el microambiente hipóxico tumoral, el cual es favorable para la replicación del Bacteriobot, este microambiente además regula la expresión del gen cargado en los NCs adheridos a la membrana de la bacteria y así mejorar la eficiencia del tratamiento en la hipoxia tumoral. Estos microbots son biocompatibles, relativamente seguros.

## **11. JUSTIFICACIÓN.**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, se le atribuyen millones de defunciones al año. Las terapias convencionales utilizadas en el tratamiento contra el cáncer han resultado ineficientes ya que son inespecíficas, derivando en daño colateral a tejidos sanos, presentando un índice casi nulo en la completa recuperación de los pacientes. Además, el microambiente hipóxico reduce la susceptibilidad de las células cancerosas a los medicamentos contra el cáncer, la baja respuesta de radicales libres y menor proliferación de células cancerosas en el centro de los tumores sólidos. Aunque la hipoxia de los tumores sólidos ha resultado en un obstáculo en la terapia, su bajo nivel de oxígeno sirve como hábitat ideal para una serie de bacterias anaerobias. La presencia de bacterias en tumores humanos ha sido reconocida por más de 50 años, se han encontrado grandes cantidades de bacterias en tumores extirpados de pacientes. Es por eso que se busca el desarrollo de sistemas con envío sitio dirigido, focalizado y biocompatible. Dentro del desarrollo de agentes terapéuticos, se ha generado una gran expectativa en los sistemas basados en células (microbots) ya que tienen mecanismos más complejos que les permiten alcanzar tejidos específicos, atravesar barreras no permeables fácilmente y modular su microambiente, recientemente se han propuesto el uso microbots debido a su potencial en aplicaciones biomédicas. Es por eso que en este trabajo se propuso el desarrollo y uso de Bacteriobots para la administración de plásmidos a células tumorales de un modelo murino. Los Bacteriobots actúan como vector de entrega de NCs que transfecan las células tumorales y entregan el transgén. Aquí, aprovechamos el microambiente hipóxico característico de los tumores sólidos, que favorece el crecimiento selectivo de Bacteriobot y el aumento de expresión del transgén cargado en los Bacteriobots cuya expresión es mediada por un promotor que responde a hipoxia, reduciendo así significativamente el daño a tejidos sanos.

## **12.HIPÓTESIS.**

Bacteriobots basados en *Bifidobacterias* y Nanopartículas Magnéticas Fluorescentes (NPMF) son eficientes para focalizar y sitio dirigir la liberación de un gen cuya expresión es controlada por hipoxia en un modelo tumoral murino *in vivo*.

## **13. OBJETIVO GENERAL.**

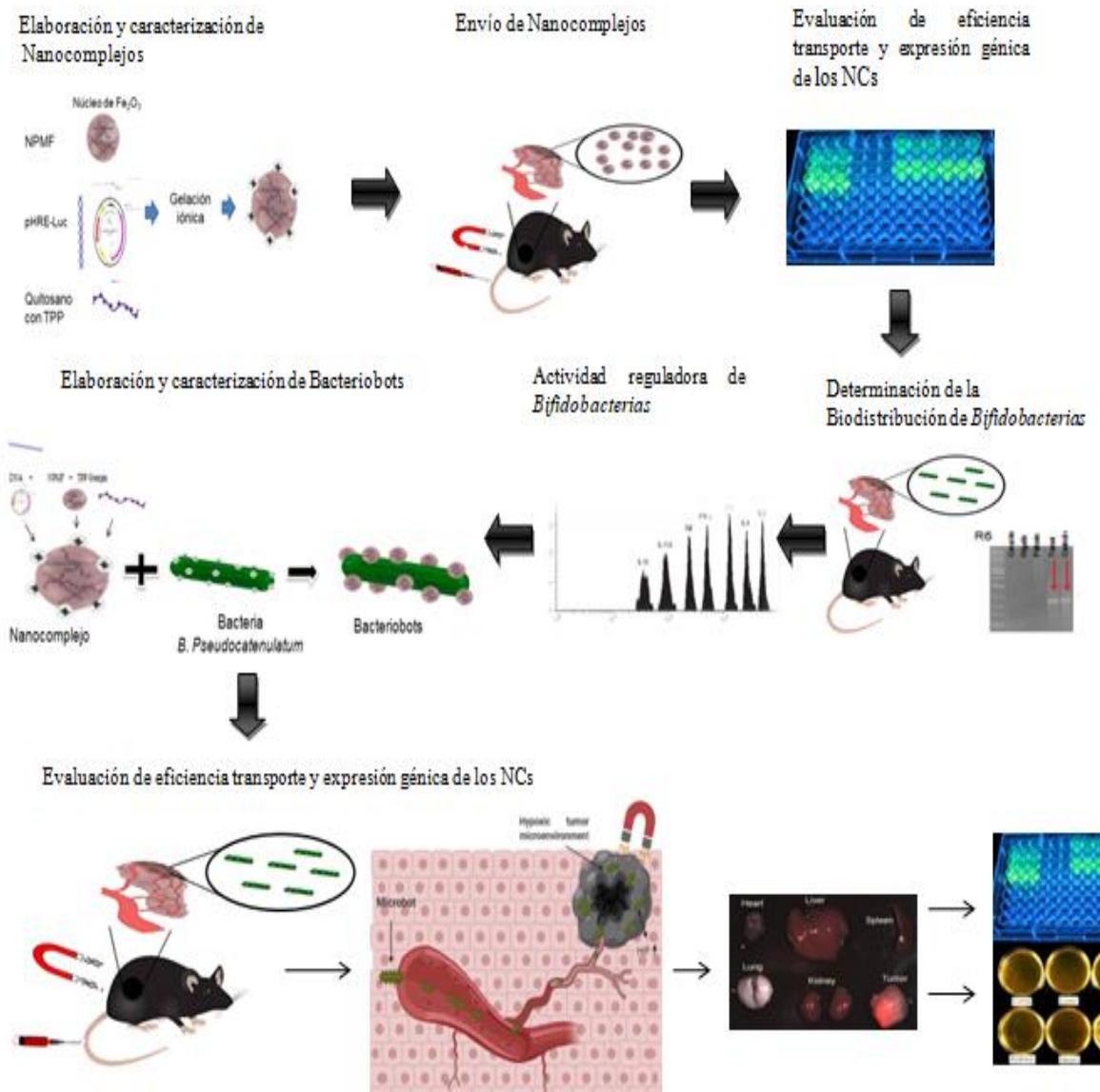
Evaluar la eficiencia de Bacteriobots basados en *Bifidobacterias* y NPMF para el envío dirigido de genes activado por hipoxia en un modelo tumoral *in vivo*.

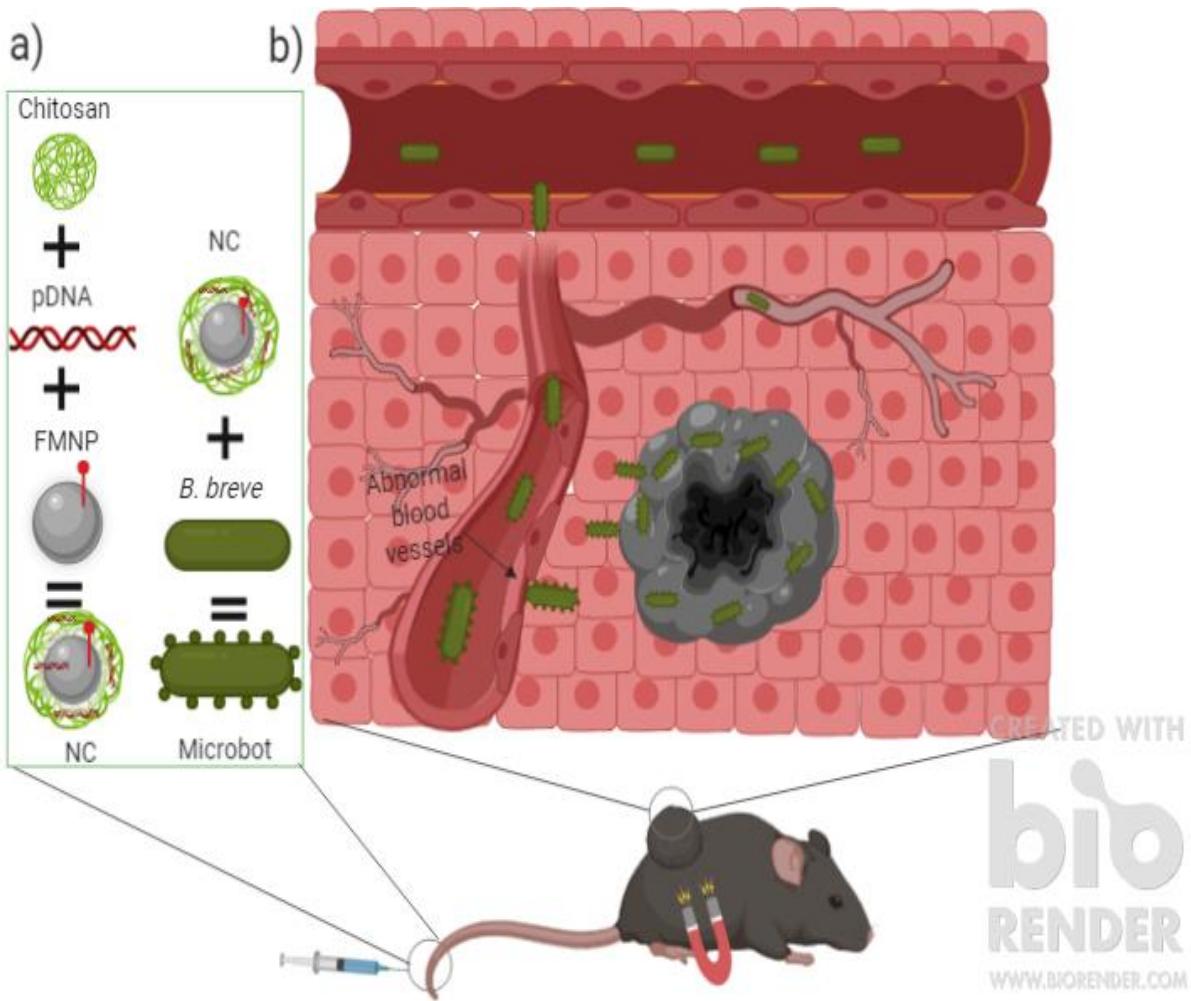
### **13.1 OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Elaborar y caracterizar Nanocomplejos (NCs) de quitosan- pDNA-NPMF.
2. Evaluar la eficiencia de transporte y expresión génica de los NCs en un modelo tumoral *in vivo*.
3. Determinar la biodistribución de *Bifidobacterias* tras una inyección intravenosa en un modelo tumoral *in vivo*.
4. Evaluar la actividad reguladora de citocinas por *Bifidobacterias* en un modelo tumoral *in vivo*.
5. Elaborar y caracterizar Bacteriobots basados en *Bifidobacterias* y pDNA-NPMF.
6. Evaluar eficiencia de transporte y expresión génica de Bacteriobots regulada por hipoxia en un modelo tumoral *in vivo*.

## 14. MATERIALES Y MÉTODOS.

### Esquema general.





#### 14.1 Descripción, purificación y caracterización de los plásmidos a utilizar.

Se utilizó el plásmido pNFkB-Luc adquirido de la empresa Clontech (Mountain, CA, US), el cual responde al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB). El vector contiene el gene que codifica para la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*, 1689 pb), además contiene múltiples copias de secuencias consenso del NFkB fusionadas a la región promotora de la Timidina Quinasa del Virus del Herpes Simple (HSV-TK), un sitio de clonación y un gen de resistencia a ampicilina (Figura 8).

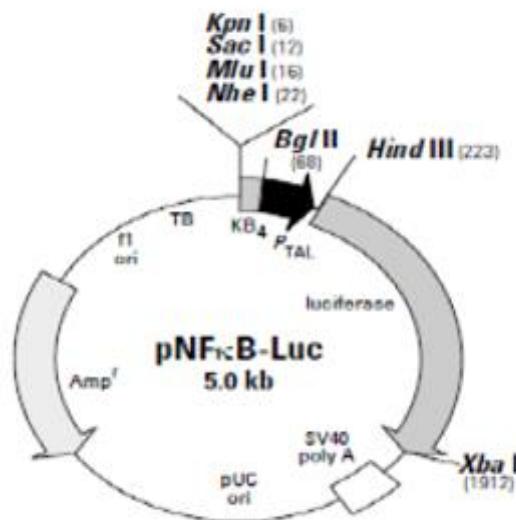
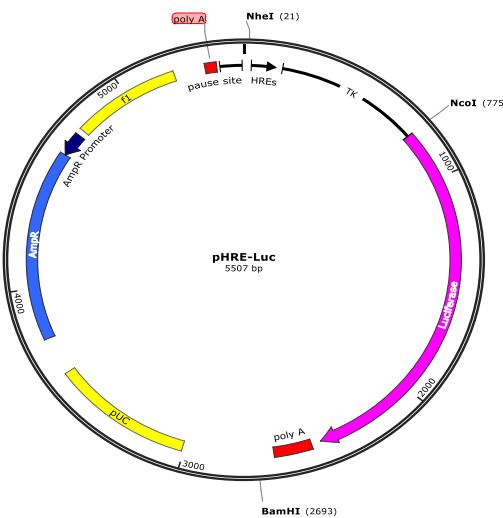


Figura 8. Mapa del vector pNFkB-Luc.

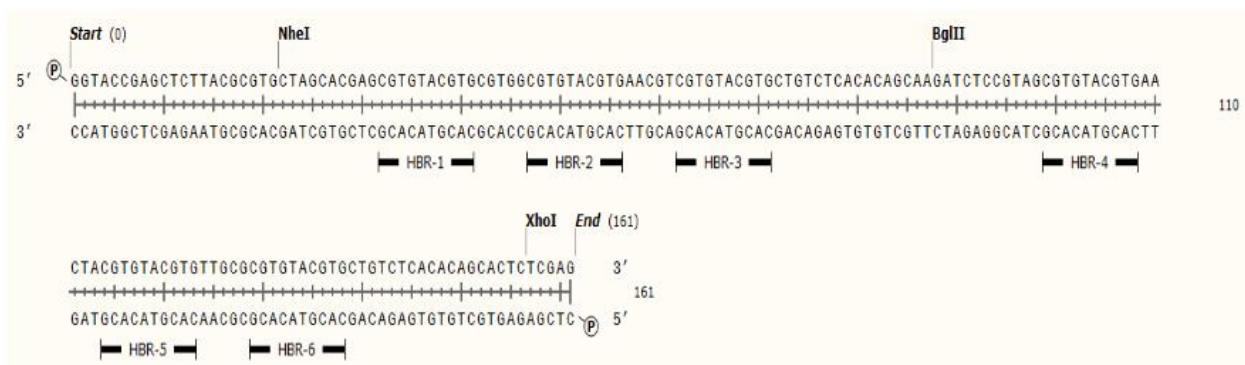
Otro vector que se utilizó fue pGSH-GFP-HIF4 (pRNAi-HIF) un ARN de interferencia del factor inducible por hipoxia.

Además, se utilizó el vector pHRE-Luc, el cual contiene el gen de la luciferasa (Figura 9) regulado por un promotor sensible a hipoxia, este fue generado por 6 repeticiones de secuencias consenso llamadas elementos de respuesta a hipoxia compuestas por sitios de unión a HIF altamente conservadas (CGTGTACGTG) separadas por 5 nucleótidos

aleatorios (Figura 10), seguido por el promotor mínimo de la timidina quinasa humana (TK).



**Figura 9.** Mapa del vector pHRE-Luc.



**Figura 10.** Secuencia de los 6 HRE que componen el promotor del pHRE-Luc.

## **14.2 Extracción de ADN plasmídico.**

Cada uno de los plásmidos fue trasformado en bacterias de la cepa *Escherichia coli* (*E. coli*) Top 10 de Invitrogen (Carlsbad, CA, US), para corroborar que la cepa tenía los vectores, se sembraron en placas de agar Lennox L Base (LB) de Invitrogen con ampicilina (100 $\mu$ g/ml) o kanamicina (50 $\mu$ g/ml) toda la noche 37°C, después del crecimiento en placa se tomaron varias colonias, estas se crecieron en tubos eppendorf con 1 ml de caldo LB ampicilina (100 $\mu$ g/ml) o kanamicina (50 $\mu$ g/ml) a 37°C con una agitación de 250 rpm toda la noche. De las colonias seleccionadas, se separaron 200  $\mu$ L de cada tubo y se almacenaron a -20°C, los 800  $\mu$ L restantes se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min para obtener un pellet bacteriano, se agregaron 20  $\mu$ L de Fenol y 20 $\mu$ L de solución Dye (Sucrosa (6%) y azul de bromofenol (0.1%), se mezcló todo con ayuda del Vortex (Maxi Mix II, Thermolyne) hasta resuspender el pellet, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 min, se tomó la fase acuosa colocándolo en un gel de agarosa al 0.8% posteriormente se realizó una electroforesis durante 50 min a 100 V y 80 mA. El gel se tñó en bromuro de etidio y se observó en el transiluminador (3UV, UVP).

## **14.3 Caracterización enzimática del vector pHRE-Luc.**

El plásmido purificado fue caracterizado por enzimas de restricción y se llevaron a cabo conforme a las instrucciones de la cosa comercial Promega (Madison, WI, US). Para cada reacción se utilizaron de 1 a 3 U de enzima por  $\mu$ g de ADN. Las reacciones y enzimas utilizadas se muestran en la (tabla1).

Agua	BSA	Buffer	Xho I	BamH I	ADN	Total
4.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tabla 1. Reacción de la digestión del vector pHRE-Luc.**

Las digestiones se incubaron a 37° por dos horas y se inactivaron a 65°C por 10 min. Después las reacciones se cargaron en un gel de agarosa al 0.8%, se realizó una electroforesis y se tiñó en bromuro de etidio para posteriormente observarlo en el transiluminador.

#### **14.4 Extracción de plásmido por el método maxiprep.**

Una vez caracterizado el vector, se produjo a gran escala. Se inoculo una colonia en 1 ml de caldo LB con antibiótico, el cual se incubo a 37°C toda la noche con una agitación de 300 rpm, posteriormente se paso a 1L de caldo LB con antibiótico, se incubo a 37°C toda la noche, una vez terminado el tiempo de incubación se realizó la extracción del plásmido utilizando el kit comercial “HiPure Plasmid Maxiprep Kit de Invitrogen (Carlsbad, CA, US), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **14.5 Preparación de reactivos para la formación de Nanocomplejos.**

El quitosán soluble en agua de 20kDa con un grado de desacetilación de ~70% de Coyote Foods (Saltillo, COA, MX) y el Tripolifosfato de pentasodio (TPP) de Sigma-Aldrich (San Louis, MO, US) fueron pesados y resuspendidos en agua MiliQ, a concentraciones de 2 mg/mL y 0.86 mg/ml respectivamente. El pH de quitosán se midió y ajustó a 5.5, mientras que para el TPP se ajustó a 3.

## **14.6 Formación y caracterización de Nanocomplejos formados por pDNA-Quitosán-NPMF.**

Los Nanocomplejos fueron elaborados por el método de gelación iónica descrito por Calvo y Cols (1997), en el cual los iones del quitosán reaccionan con los aniones del entrecruzante TPP para formar nanocomplejos, compuestos también por pDNA y NPMF de un tamaño de 75nm, compuestas por un núcleo de óxido de fierro superparamagnético (SPIO) de 8nm, cubierto de una capa silicea biocompatible y un fluoróforo orgánico unido covalentemente cuyo espectro es similar al del fluorocromo Cianina 5.5 (MaxVigen-710 nm, Nvigen). Los Nanocomplejos están formados de NPMF recubiertas de quitosan y pDNA.

## **14.7 Elaboración de Nanocomplejos.**

La metodología para la elaboración de Nanocomplejos fue estandarizada por Bonilla, 2017 de la siguiente manera: todos los reactivos se colocaron en dos microtubos Eppendorf (Hamburgo AL) etiquetados como (+) y (-). En el microtubo (-) se colocó 1 $\mu$ l de NPMF, 1  $\mu$ g de pDNA (pHRE-Luc), 3.75  $\mu$ l de TPP y tampón fosfato salino (PBS) Gibco, mientras que en el microtubo (+) se agregaron 15 $\mu$ l de quitosan y 15  $\mu$ l de PBS, ambos microtubos se agitaron en el vortex (Maxi Mix II, Thermolyne) por 1 min 30 seg. Para formar los Nanocomplejos, los componentes del microtubo (-) se agregaron al microtubo (+) gota a gota mientras estaban en agitación 950 rpm y una vez mezclados se incubaron 1h a TA a una agitación de 950 rpm. El volumen final para la elaboración de los nanocomplejos fue de 60  $\mu$ L.

Se utilizó una concentración de 100 ng/mL de NPMF para la caracterización de los Nanocomplejos y una relación de TPP-quitosán de 1:4, la cantidad de quitosán requerida fue calculada con la siguiente fórmula:

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

#### **14.8 Determinación de homogeneidad y tamaño de Nanocomplejos.**

Se realizó mediante dispersión de luz dinámica utilizando el aparato Zetasizer ZS90 (Malvern), los Nanocomplejos fueron aforados a 1mL con agua destilada filtrada y cargados en cubetas de poliestireno de 1 mL DTS0012, Malvern (Reino Unido).

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

#### **14.9 Determinación de la carga superficial de Nanocomplejos.**

Se evalúo la carga superficial de estos mediante medición del potencial Z determinado por dispersión de la luz electroforética en el Zetasizer ZS90. Para esta medición, los Nanocomplejos fueron aforados a 1 ml con agua destilada filtrada estéril, posteriormente fueron cargados con ayuda de una jeringa de insulina en una celda capilar plegada DTS1070 Malvern. Los valores de RI y absorción utilizados en las mediciones fueron los ya mencionados anteriormente. La medición se realizó con el modelo de Smoluchowski, los resultados obtenidos de las tres mediciones se reportan en una gráfica de potencial zeta. El software utilizado fue “Zetasizer Software” versión 7.11.

#### **14.10 Evaluación *in vivo* de Nanocomplejos.**

Una vez determinada la carga superficial y el tamaño de los Nanocomplejos, se realizaron evaluaciones *in vivo* para determinar tanto la eficiencia de transporte y entrega, así como la expresión génica. Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 NHsd de Harlan (Indianapolis, IN, EU) con una edad de 6 a 8 semanas, con pesos comprendidos entre 25-30 gr. Posteriormente se indujo un tumor sólido en todos los

ratones. Estos fueron inyectados con 500,000 células B16F10 (melanoma murino) intradérmicamente cerca del muslo. Se permitió el crecimiento de la masa tumoral por un periodo de 15 a 20 días post inyección. Tras la formación de los tumores sólidos todos los ratones fueron inoculados con distintos tratamientos con una n=3:

**Grupo 1** Nanocomplejos con el vector pHRE-Luc + la presencia de Magneto.

**Grupo 2** Nanocomplejos con el vector pHRE-Luc sin la presencia de Magneto.

**Grupo 3** Nanocomplejos con el vector pHRE-Luc + el vector pRNAi-HIF + la presencia de Magneto.

**Grupo 4** Control negativo; Solución fisiológica al 0.9%.

Todos los Nanocomplejos fueron preparados para llevar 50 µg de pDNA por ratón, resuspendidos en 100 µl finales de sln fisiológica, todos los tratamientos fueron inoculados por vena caudal. Posterior a la inoculación, a cada ratón (excepto el grupo 2) se le colocó un magneto de Neodimio con una intensidad de ~30,000 Gaus (3T) en el sitio de la masa tumoral durante 1h, con la finalidad de dirigir los tratamientos específicamente al tumor. Después de 48 h de la exposición a él magneto, todos los ratones fueron sacrificados y se tomaron los siguientes órganos: bazo, corazón, hígado, pulmón, riñón y tejido tumoral.

Los órganos fueron lavados con solución fisiológica, después fueron congelados y descongelados con nitrógeno líquido para su posterior maceración, una vez macerados fueron lisados con el buffer “Cell Culture Lysis 5X Reagent” de Promega. Posteriormente se centrifugó a 10,000 g, se colectó el sobrenadante resultante y fue almacenado para su posterior análisis.

#### **14.11 Determinación de la localización de Nanocomplejos en un modelo murino.**

Para determinar la localización de los Nanocomplejos después de la inoculación intravenosa (IV) en ratones, se midió la fluorescencia. Los Nanocomplejos contienen NPMF que estas a su vez cuentan con un fluoróforo que puede ser medido. Se tomaron 50 µl del sobrenadante del lisado de cada órgano y se mezclaron con 100 µl de sln. Fisiológica, los 150 µl resultantes de cada muestra se colocaron en una placa oscura de 96 pozos de fondo plano de Costar Corning (Corning, NY, EU).

La fluorescencia se midió con el lector de placas Varioskan Lux de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EU), los resultados fueron procesadas utilizando el software SkanIt RE versión 4.1, los valores obtenidos fueron analizados y graficados con el software GraphPad Prism versión 6.0. Las longitudes de emisión y excitación utilizadas fueron las establecidas por el fabricante: 673 nm y 695 nm, respectivamente. El análisis estadístico de los datos fue realizado con el software estadístico GraphPad Prism versión 6.0, donde se verificó la normalidad de datos y posteriormente se realizó una prueba post ANOVA para la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey.

#### **14.12 Análisis de la expresión de luciferasa en un modelo murino.**

Para determinar la expresión de luciferasa en los órganos de los ratones, se utilizó el kit ONE-Glo Luciferase Assay System de Promega de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se tomaron 50 µL de cada muestra, los cuales fueron colocados en placas blancas de 96 pozos de fondo plano Costar Cornin Inc. Posteriormente, a cada muestra se agregaron 100 µL del buffer con sustrato. La luminiscencia de la placa se leyó utilizando el equipo Varioskan Lux, y el procesamiento de los datos utilizando el software SkanIt, los valores en las gráficas se reportan como unidades de luminiscencia (UL). El análisis estadístico de los datos fue realizado con el software estadístico GraphPad Prism versión 6.0, donde se verificó la normalidad de datos y posteriormente se realizó una prueba post ANOVA para la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey.

#### **14.13 Determinación de la localización de *Bifidobacterias* en un modelo murino tras una inyección IV.**

Para este estudio se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 NHsd de Harlan con una edad de 6 a 8 semanas, con pesos comprendidos entre 25-30 gr. Posteriormente se indujo un tumor sólido en todos los ratones, se inyectaron 100,000 células B16F10 intradérmicamente cerca del muslo.

Se permitió el crecimiento de la masa tumoral por un periodo de 15 a 20 días post inyección. Tras la formación de los tumores sólidos se cultivaron Bacterias de la cepa *B. breve*, las *Bifidobacterias* se crecieron en caldo de Man, Rogosa, Sharpe de Oxoid Thermo Fisher (Waltham, MA, US) suplementado con L-Cisteina HCl al 0.005M, Glucosa 0.050M y Tween 20 al 0.100 % (scMRS) a 37°C durante 24 a 48h en condiciones de anaerobiosis, una vez terminado el tiempo de incubación se contaron  $1 \times 10^9$  bacilos en la cámara de Neubauer y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de sln fisiológica.

Las *Bifidobacterias* fueron inoculadas por vena caudal y se dividieron en los siguientes grupos, cada uno con una n=3:

**Grupo 1** Ratones inoculados con  $1 \times 10^9$  *Bifidobacterias* y sacrificados a los 5 días post-inoculación.

**Grupo 2** Ratones inoculados con  $1 \times 10^9$  *Bifidobacterias* y sacrificados a los 7 días post-inoculación.

**Grupo 3** Ratones inoculados con  $1 \times 10^9$  *Bifidobacterias* y sacrificados a los 9 días post-inoculación.

**Grupo 4** Ratones inoculados con sln fisiológica al 0.9 %.

Los ratones se sacrificaron 5, 7 y 9 días post-inoculación, se removieron los siguientes órganos: bazo, corazón, hígado, pulmón, riñón y tejido tumoral. Todos los órganos fueron macerados, este macerado se dividió en 2 partes: se tomaron 100 µl para inocular placas de agar scMRS, el resto se procesó con el kit “Wizard Genomic DNA Purification” siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, después de obtener el ADN genómico (gADN) de todos los órganos, se realizó PCR para buscar la presencia de la bacteria en los distintos órganos. Los oligonucleótidos que se utilizaron son específicos para la identificación de especies entre *Bifidobacterias* por el 16S rDNA:

IDB31F TAGGGAGCAAGGCACTTGTGT

IDBC1R ATCCGAACTGAGACCGGTT

Se utilizaron las condiciones recomendadas por Youn y colaboradores 2008. Posteriormente los productos de PCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **14.14 Evaluación de la actividad reguladora de citocinas por *Bifidobacterias* en un modelo murino.**

Para este estudio se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 NHsd de Harlan con una edad de 6 a 8 semanas, con pesos comprendidos entre 25-30 gr. Se utilizaron Bacterias de la cepa *B. breve*, estas se crecieron en caldo scMRS a 37°C de 24 a 48h en condiciones de anaerobiosis, una vez terminado el tiempo de incubación se contaron  $1 \times 10^9$  bacilos en la cámara de Neubauer y se resuspendieron en 100 µL de sln fisiológica.

Otra cepa que se utilizó fue *S. Aureus*, la cual se sometió 30 min a luz ultravioleta, una vez atenuada, se resuspendieron  $1 \times 10^9$  bacterias en 100 µL de sln fisiológica.

Tanto las *Bifidobacterias* como los *Staphylococcus* fueron inoculados por vena caudal y se dividieron en los siguientes grupos, cada uno con una n=3:

**Grupo 1** Ratones inoculados con  $1 \times 10^9$  *Bifidobacterias* /  $1 \times 10^9$  *Staphylococcus* sacrificados 1h post inoculación.

**Grupo 2** Ratones inoculados con  $1 \times 10^9$  *Bifidobacterias* /  $1 \times 10^9$  *Staphylococcus* sacrificados 3h post inoculación.

**Grupo 3** Ratones inoculados con  $1 \times 10^9$  *Bifidobacterias* /  $1 \times 10^9$  *Staphylococcus* sacrificados 6h post inoculación.

**Grupo 4** Ratones inoculados con  $1 \times 10^9$  *Bifidobacterias* /  $1 \times 10^9$  *Staphylococcus* sacrificados 8h post inoculación.

**Grupo 5** Ratones inoculados con  $1 \times 10^9$  *Bifidobacterias* y  $1 \times 10^9$  *Staphylococcus* sacrificados 24h post inoculación.

**Grupo 6** Ratones inoculados con sln fisiológica.

Después de inocular las cepas, los ratones fueron sacrificados a las 1h, 3h, 6h, 8h y 24h post inoculación, se extrajo sangre por punción cardiaca y se analizo el set de citocinas a partir de suero por el kit Mouse Inflammation (Becton Dickinson, NJ, EU) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las muestras se procesaron por citometría de flujo. El análisis estadístico de los datos fue realizado con el software GraphPad Prism versión 6.0, donde se verificó la normalidad de datos y posteriormente se realizó una prueba post ANOVA para la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey.

#### **14.15      Elaboración de Bacteriobots.**

Para la elaboración de los Bacteriobots se utilizó la combinación de Bifidobacterias de la cepa *Bifidobacterium breve* y Nanocomplejos. Se prepararon los Nanocomplejos como ya se explico previamente.

Para este proceso, los componentes se colocaron en 2 microtubos: el primero contenía Nanocomplejos resuspendidos en 60  $\mu\text{l}$  de sln fisiológica, el segundo,  $1 \times 10^9$  Bifidobacterias resuspendidas en 100  $\mu\text{l}$  de sln fisiológica, al segundo microtubo se le

agrego el primero, después se agregaron 1.875 µl de TPP y 1.875 µl de Genipin al 0.1M, posteriormente recibieron agitación vigorosa y se incubaron 1h a 4°C a una agitación de 950 rpm. Una vez terminado el tiempo de incubación los Bacteriobots fueron centrifugados a 2500 rpm para resuspenderse en un volumen final de 100 µl.

#### **14.16 Determinación de la carga superficial de Bacteriobots.**

Se evalúo la carga superficial de estos mediante medición del potencial Z determinado por dispersión de la luz electroforética en el Zetasizer ZS90. Para esta medición, los Bacteriobots fueron aforados a 1 ml con agua destilada filtrada estéril, posteriormente fueron cargados con ayuda de una jeringa de insulina en una celda capilar plegada DTS1070 Malvern. La medición se realizó con el modelo de Smoluchowski, los resultados obtenidos de las tres mediciones se reportan en una gráfica de potencial zeta. El software utilizado fue “Zetasizer Software” versión 7.11.

#### **14.17 Determinación de la viabilidad de Bacteriobots.**

Se elaboraron Bacteriobots con 1 y 3 veces la concentración de NPMF, con el propósito de comprobar que las NPMF no son toxicas para las Bifidobacterias al plegarlas en su membrana celular. Se prepararon Bacteriobots con las concentraciones antes mencionadas y se plaquearon en agar csMRS, las placas se incubaron por 24h y 48h en condiciones de anaerobiosis y se observó si existía o no crecimiento bacteriano.

Además, los Bacteriobots (1x y 3x) fueron inoculados en 1 ml de caldo scMRS y se monitoreo la densidad óptica durante 24h y 48h.

#### **14.18 Caracterización de Bacteriobots por el Microscopio de Barrido Electrónico (SEM).**

Se elaboraron Bacteriobots bajo las condiciones anteriormente descritas, se colocaron 20 $\mu$ L en un cubreobjetos y 20  $\mu$ L de la solución fijadora al 1% (buffer de fosfatos 0.1M y glutaraldehído al 25%). Se homogenizó la solución y se dejó fijar por 30 min a 4°C. Se removió el líquido restante con mucho cuidado de no tocar la superficie del cubreobjetos y se dejó secar por más tiempo para visualizar la muestra en el SEM.

#### **14.19 Determinación de la localización de Bacteriobots en un modelo murino.**

Una vez caracterizado el bacteriobot, se realizaron evaluaciones *in vivo* para determinar la eficiencia de transporte. Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 NHsd de Harlan, con una edad de 6 a 8 semanas, con pesos comprendidos entre 25-30 gr. Posteriormente se indujo un tumor sólido en todos los ratones, fueron inyectadas 500,000 células B16F10 (melanoma murino) intradérmicamente cerca del muslo. Se permitió el crecimiento de la masa tumoral por un periodo de 15 a 20 días post inyección. Tras la formación de los tumores sólidos todos los ratones fueron inoculados con distintos tratamientos con una n=3:

**Grupo 1** Bacteriobots + la presencia de Magneto.

**Grupo 3** Nanocomplejos + la presencia de Magneto.

**Grupo 3** Plásmido solo

**Grupo 4** Control negativo; Solución fisiológica al 0.9%.

Todos los Bacteriobots fueron preparados para llevar 50  $\mu$ g de pDNA por ratón resuspendidos en 150  $\mu$ l finales de sln fisiológica, todos los tratamientos fueron inoculados por vena caudal. Posterior a la inoculación, a cada ratón se le colocó un magneto de Neodimio con una intensidad de ~30,000 Gaus (3T) en el sitio de la masa tumoral durante 1h, con la finalidad de sitio dirigir los tratamientos específicamente al tumor. Después de 48 h de exposición al magneto, todos los ratones fueron sacrificados

y se tomaron los siguientes órganos: bazo, corazón, hígado, pulmón, riñón y tejido tumoral.

Los órganos fueron lavados con solución fisiológica, después fueron congelados y descongelados con nitrógeno líquido para su posterior maceración, una vez macerados fueron lisados con el buffer “Cell Culture Lysis 5X Reagent” de Promega. Posteriormente se centrifugó a 10,000 g, se colectó el sobrenadante resultante y fue almacenado para su posterior análisis.

Para determinar la localización de los Bacteriobots después de la inoculación intravenosa (IV) en ratones, se midió la fluorescencia de las NPMF ya que cuentan con un fluoróforo que puede ser medido. Se tomaron 50 µl del sobrenadante del lisado de cada órgano y se mezclaron con 100 µl de sln. Fisiológica, los 150 µl resultantes de cada muestra se colocaron en una placa oscura de 96 pozos de fondo plano de Costar Corning.

La fluorescencia se midió con el lector de placas Varioskan Lux de ThermoFisher Scientific, los resultados fueron procesadas utilizando el software SkanIt RE versión 4.1, los valores obtenidos fueron analizados y graficados con el software GraphPad Prism versión 6.0. Las longitudes de emisión y excitación utilizadas fueron las establecidas por el fabricante: 673 nm y 695 nm, respectivamente. El análisis estadístico de los datos fue realizado con el software estadístico GraphPad Prism versión 6.0, donde se verificó la normalidad de datos y posteriormente se realizó una prueba post ANOVA para la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey.

#### **14.20 Análisis de la expresión de luciferasa de Bacteriobots en un modelo murino.**

Se realizaron evaluaciones *in vivo* para determinar la eficiencia de entrega de material genético, así como la expresión génica.

Para determinar la expresión de luciferasa en los órganos de los ratones, se utilizó el kit ONE-Glo Luciferase Assay System de Promega de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se tomaron 50 µL de cada muestra, los cuales fueron colocados en placas blancas de 96 pozos de fondo plano Costar Cornin Inc. Posteriormente, a cada muestra

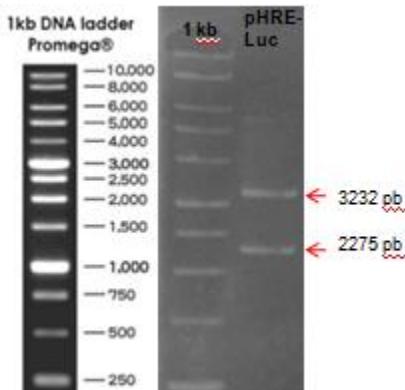
se agregaron 100  $\mu$ L del buffer con sustrato. La luminiscencia de la placa se leyó utilizando el equipo Varioskan Lux, y el procesamiento de los datos utilizando el software SkanIt, los valores en las graficas se reportan como unidades de luminiscencia (UL). El análisis estadístico de los datos fue realizado con el software estadístico GraphPad Prism versión 6.0, donde se verifico la normalidad de datos y posteriormente se realizó una prueba post ANOVA para la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey.

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Todos los procedimientos de manejo de animales fueron realizados de acuerdo a la Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

## 15.RESULTADOS

### 15.1 Caracterización de pHRE-Luc.

La caracterización del vector pHRE-Luc fue realizada por digestión enzimática mediante las enzimas de restricción NheI y BamHI. En la figura 11, se muestra un gel de electroforesis con el vector pHRE-Luc digerido, el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular y en el carril 2 se observaron dos bandas: la primera con un peso de 3232 pares de bases (pb), la segunda de 2275 pb la cual contiene el casete de expresión (promotor inducible por hipoxia y el gen reportero de la luciferasa).



**Figura 11. Caracterización del vector pHRE-Luc.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la digestión del vector pHRE-Luc, con las enzimas NheI y BamHI.

### 15.2 Formación y caracterización de Nanocomplejos de pDNA-Quitosan-NPMF.

Fue evaluado el tamaño y potencial Z de los Nanocomplejos mediante dispersión de luz dinámica. Se elaboraron NCs acomplejados con 2 distintos pDNAs conforme a la metodología establecida por Bonilla y colaboradores en 2017, en el primer Nanocomplejo se utilizó pHRE-Luc, en la figura 12 se muestra la grafica obtenida para la evaluación de tamaño, se observó una completa homogeneidad, un índice de polidispersión bajo (0.157) y un tamaño de 302 nm con un 100 % de intensidad.

Mientras que para los Nanocomplejos con pRNAi-HIF se observó una homogeneidad con un índice de polidispersión de 0.174, un tamaño de 228 nm con 100 % de intensidad (Figura 13).

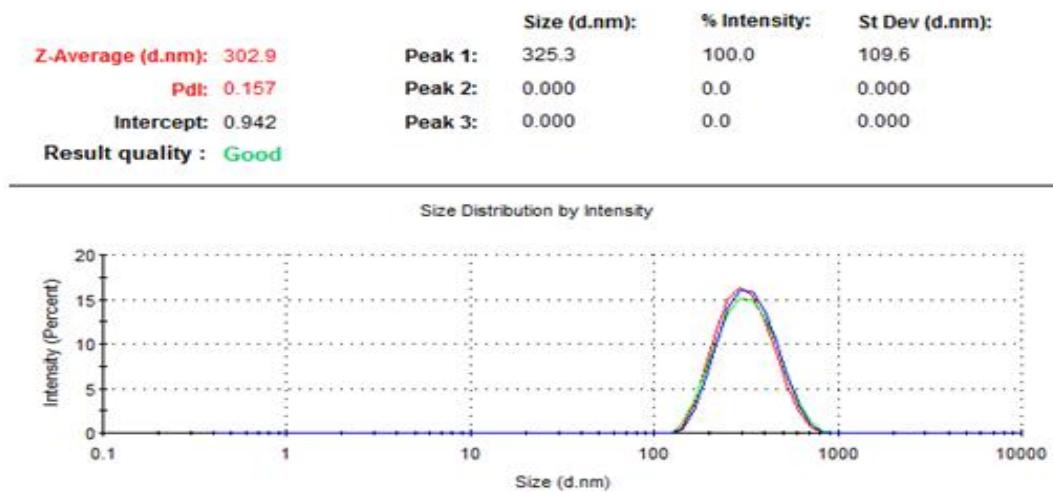


Figura 12. Homogeneidad y tamaños de los Nanocomplejos con pHRE-Luc.

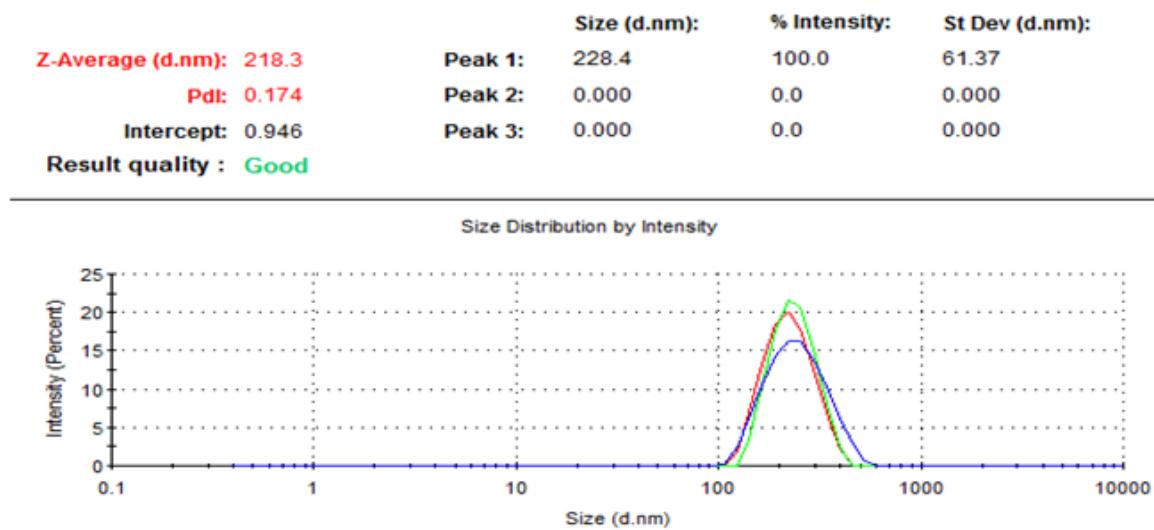
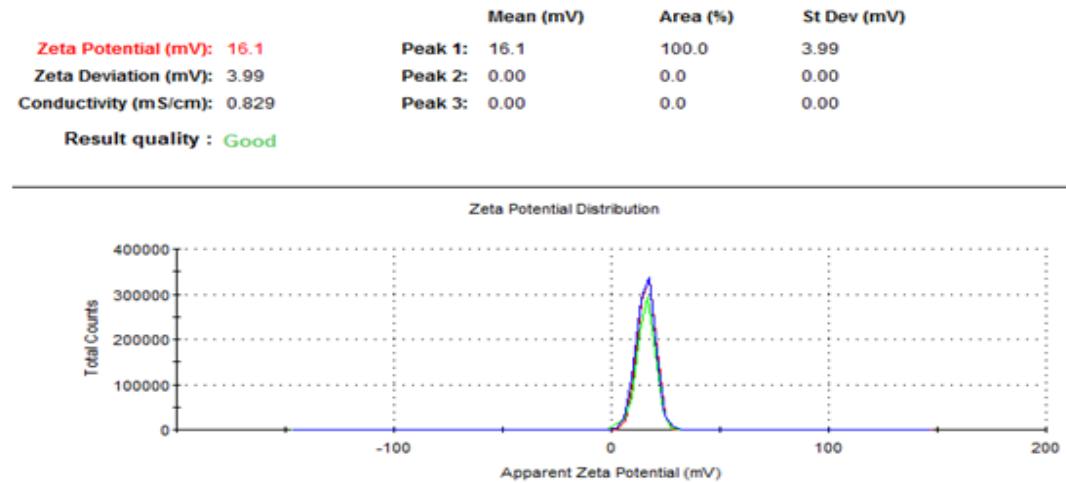
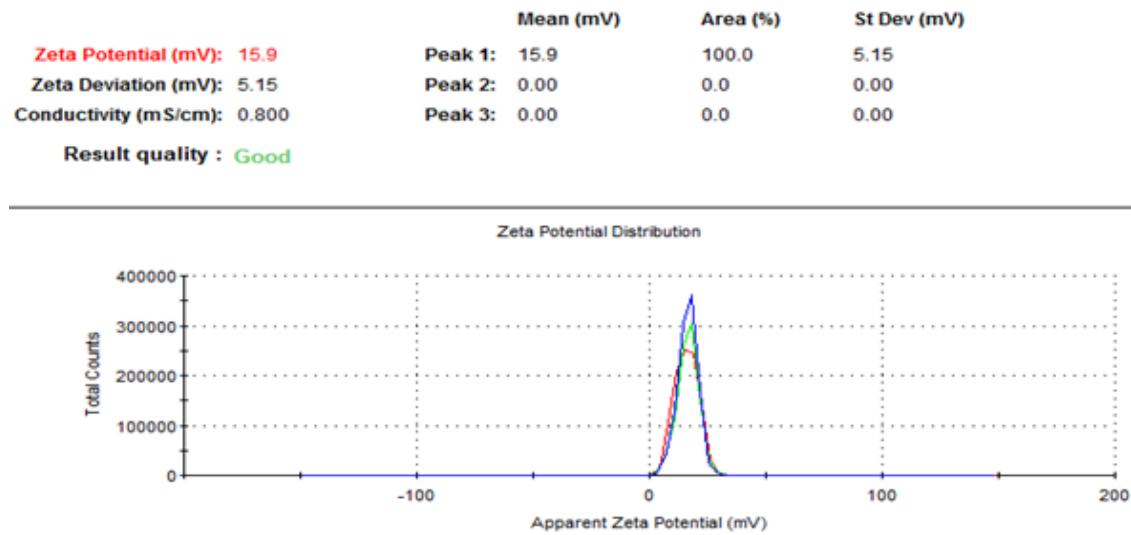


Figura 13. Homogeneidad y tamaños de los Nanocomplejos con pRNAi-HIF.

Además también se midió el potencial Z de ambos NC, el acomplejado con pHRE y pRNAi-HIF: con un potencial positivo de 16.1mV y 15.9 mV respectivamente, ambos con una intensidad de 100% (Figura 14 y 15).



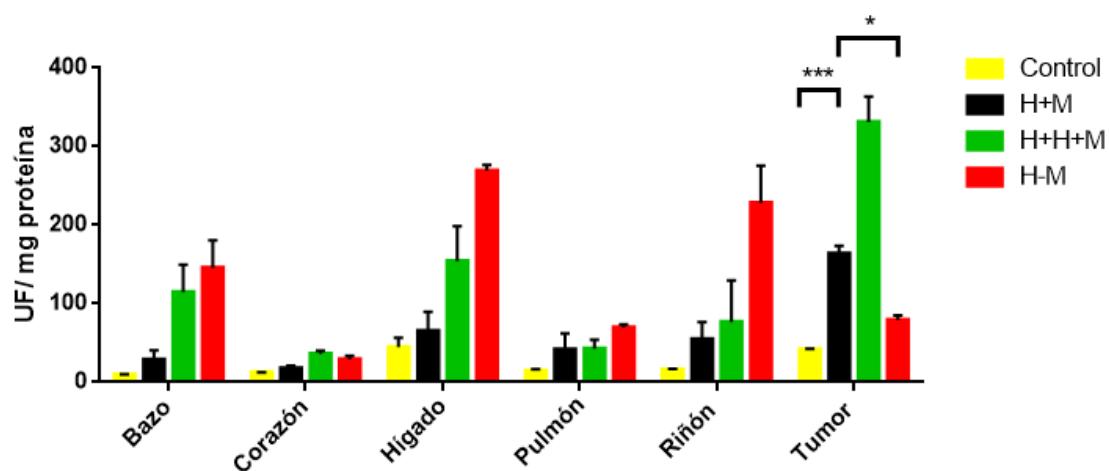
**Figura 14.** Potencial Z de los Nanocomplejos con pHRE-Luc.



**Figura 15.** Potencial Z de los Nanocomplejos con pRNAi-HIF.

### 15.3 Evaluación de la eficiencia de transporte específico de Nanocomplejos en un modelo *in vivo*.

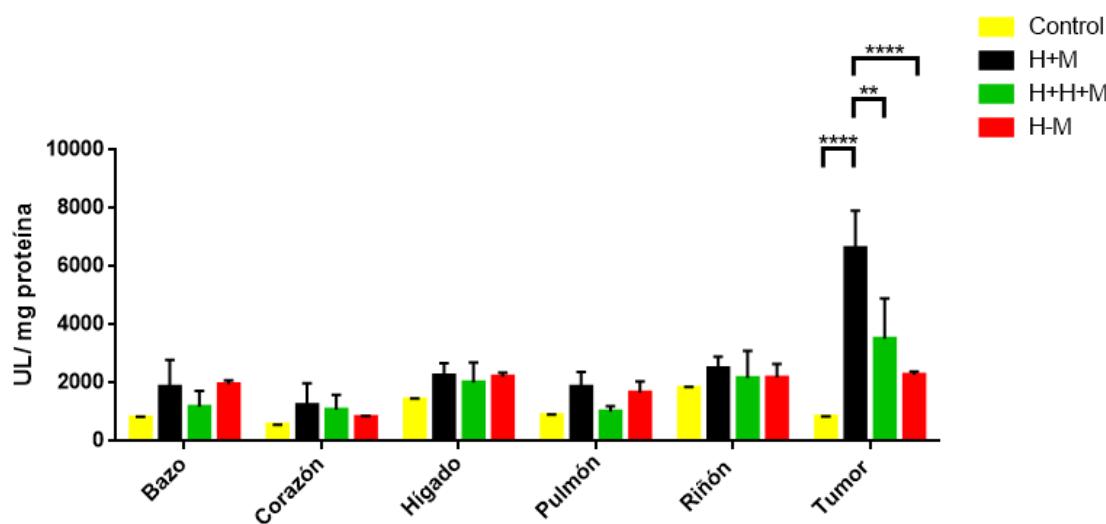
Se determinó la eficiencia de transporte de los Nanocomplejos mediante una medición de fluorescencia (longitudes de emisión 673 nm y excitación 695 nm). El órgano que tuvo una mayor concentración de Nanocomplejos fue el tumor, seguido por el hígado y riñón, esto en el grupo con la influencia de un magneto (H+M). En el tejido tumoral analizado, el grupo H+M fue significativamente mayor con 163 unidades de fluorescencia (UF)/ mg proteína comparado con el grupo que no tuvo la presencia del magneto (H-M) (79 UF/ mg proteína). La concentración de NCs del grupo H+M fue significativamente mayor en tejido tumoral comparado con otros órganos (bazo, corazón, hígado, pulmón y riñón). En cambio, el grupo sin presencia de magneto H-M, tuvo una distribución más homogénea y no fue específica de algún órgano si no que se acumuló en hígado y riñón (Figura 16).



**Figura 16.** Fluorescencia de órganos y tejido tumoral de ratones inoculados intravenosamente con los distintos tratamientos a las 48h. (H+M) Nanocomplejos con el vector pHRE-Luc más la presencia de magneto, (H-M) Nanocomplejos con el vector pHRE-Luc sin la presencia de magneto, (H+H+M) Nanocomplejos con los vectores pHRE-Luc y pRNAi-HIF más la presencia de magneto, (Control) ratones inoculados con solución fisiológica al 0.9%. Los datos representan la media ± el error estándar de la media de 3 repeticiones. Arriba de las barras se marcan las diferencias entre cada uno de los tratamientos \*p<0.05, \*\* p<0.01.

## 15.4 Evaluación de la expresión génica de Nanocomplejos en un modelo *in vivo*.

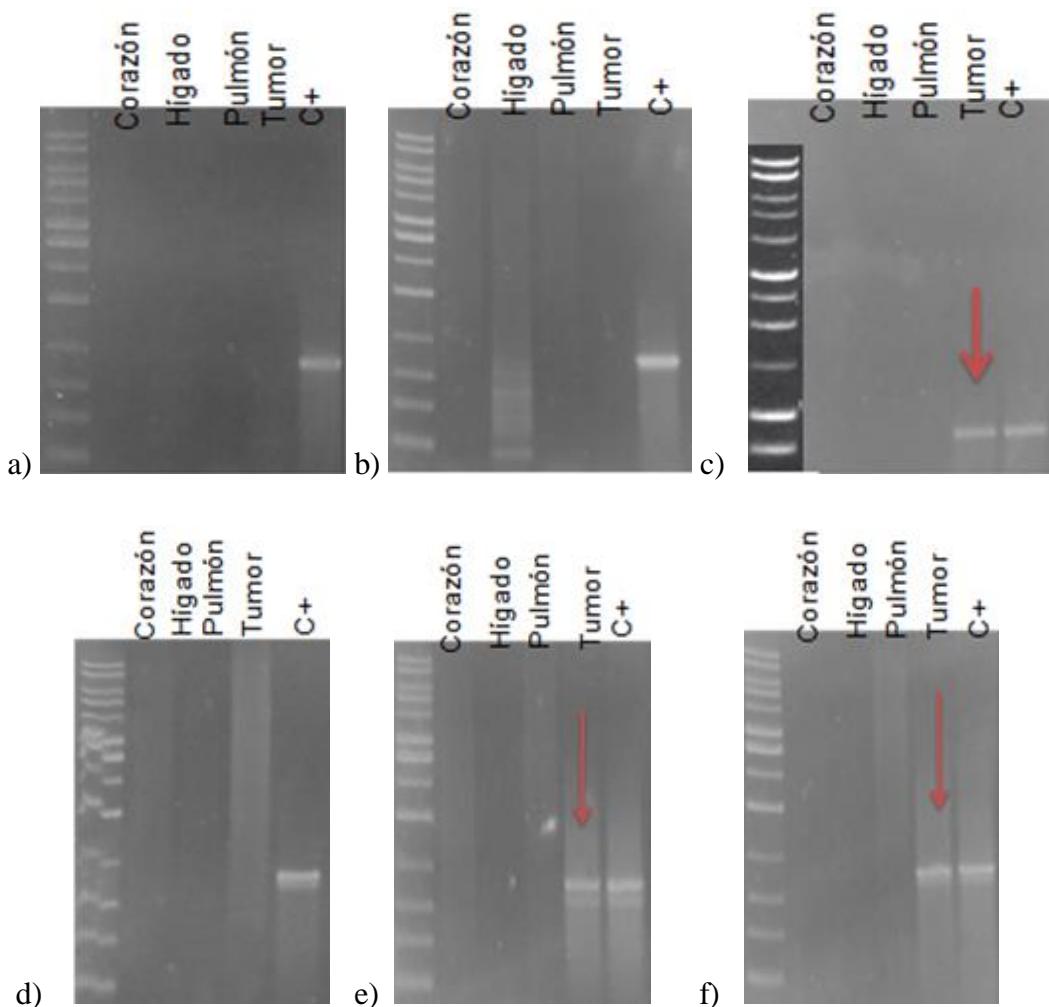
Se analizó la eficiencia de expresión del gen reportero luciferasa en los distintos órganos (bazo, corazón, hígado, pulmón y riñón), mediante la intensidad de luminiscencia. El grupo (H+M) tuvo una mayor intensidad de luz en el tejido tumoral (6631 unidades de luz (UL) / mg proteína) comparado con el grupo que no tuvo la presencia del magneto (H-M) (2277 UL/mg proteína) y con el control negativo (849 UL/mg proteína). Además se observó una disminución de la intensidad de luz en el grupo (H+H+M) (4868.1413 UL/mg proteína) el cual contiene un iRNA dirigido contra HIF (Figura 17).

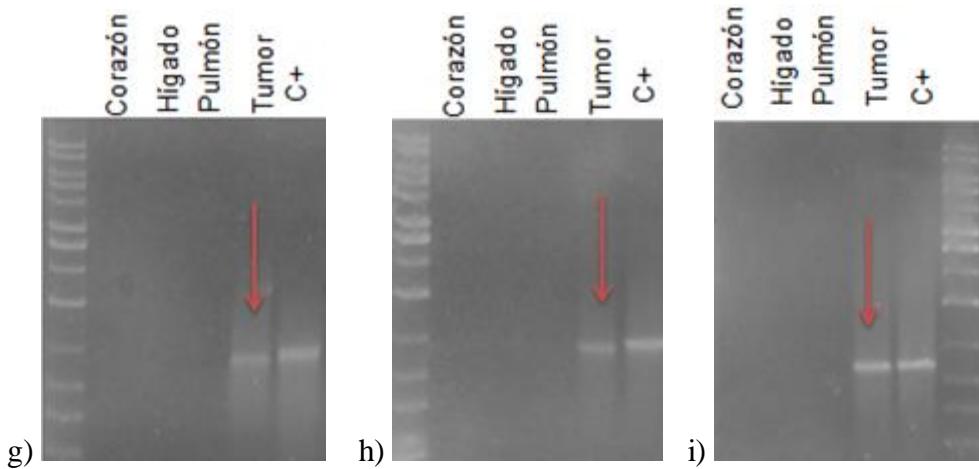


**Figura 17.** Luminiscencia de órganos y tejido tumoral de ratones inoculados intravenosamente con los distintos tratamientos a las 48h. (H+M) Nanocomplejos con el vector pHRE-Luc más la presencia de magneto, (H-M) Nanocomplejos con el vector pHRE-Luc sin la presencia de magneto, (H+H+M) Nanocomplejos con los vectores pHRE-Luc y pRNAi-HIF más la presencia de magneto y (Control) ratones inoculados con solución fisiológica al 0.9%. Los datos representan la media ± el error estándar de la media de 3 repeticiones. Arriba de las barras se marcan las diferencias entre cada uno de los tratamientos \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

## 15.5 Determinación de la localización de Bifidobacterias en un modelo murino tras una IV.

Para demostrar que la bacteria anaerobia *B. breve* coloniza tumores. Los órganos y tejidos de ratones (bazo, corazón, hígado, pulmón, riñón y tumor) inoculados a los 5, 7 y 9 días con la bacteria, fueron sembrados en placas de agar scMRS en condiciones de anaerobiosis a 37°C de 24 a 48h. Además se analizaron varios órganos mediante PCR para determinar la presencia de *B. breve*. Se encontró la presencia de Bifidobacterias después de la inoculación intravenosa en: un ratón de los tres sacrificados a los 5 días, dos de los tres ratones sacrificados a los 7 días y en todos los ratones sacrificados a los nueve días (Figura 18).

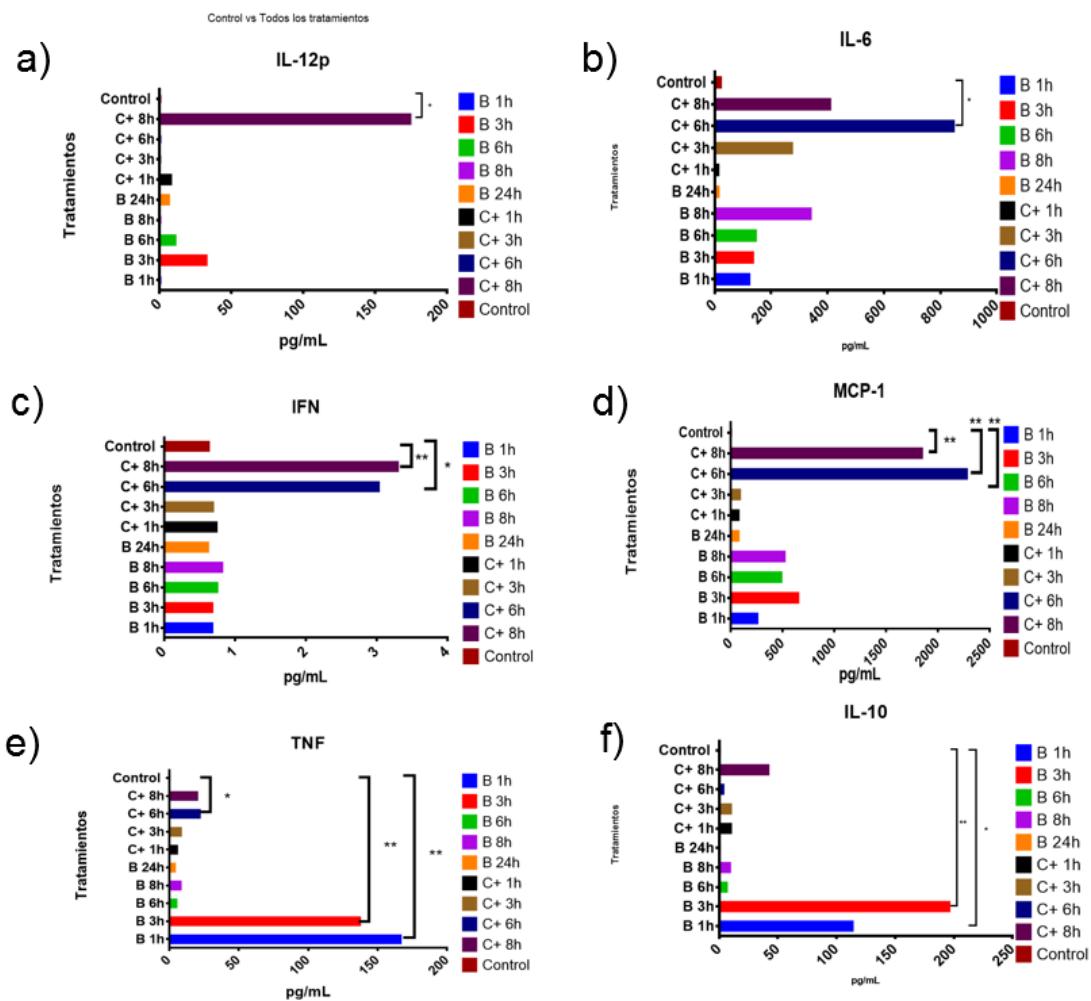




**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la amplificación (827 pb) del 16 S rDNA de *Bifidobacterium Breve* en órganos de ratones sacrificados a los 5, 7 y 9 días. a), b) y c): ratones sacrificados a los 5 días, d), e) y f): ratones sacrificados a los 7días, g), h) e i): ratones sacrificados a los 9 días. C+: control positivo.

### 15.6 Evaluación de la actividad reguladora de citocinas por *Bifidobacterias* en un modelo murino.

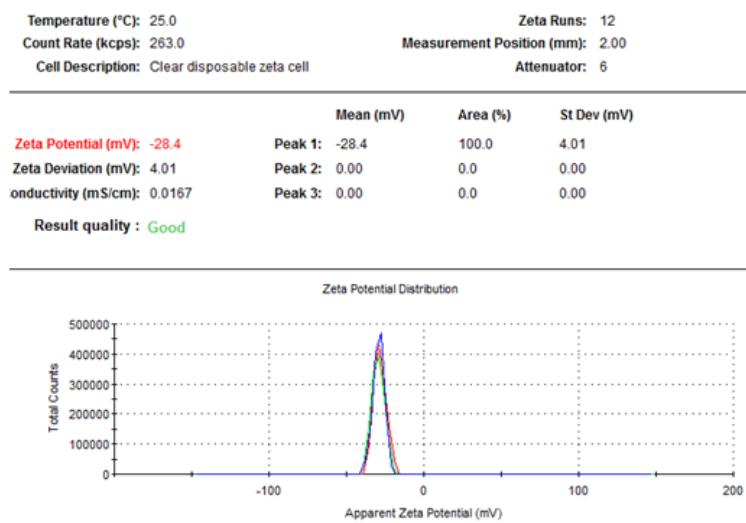
Se determinaron los niveles de las citocinas IL-12p, IL-6, IFN, MCP-1, TNF e IL-10 a partir de suero de ratones con un tumor sólido desarrollado, inoculados intravenosamente con  $1 \times 10^9$  bacilos de *Bifidobacterias*. La IL-12p no tuvo un incremento significativo con respecto al control negativo en ninguno de los grupos (B1h, B 3h, B 6h y B 8h). La IL-6 se incrementó conforme aumentaba el tiempo, teniendo su máxima concentración a las 8h, después tuvo un descenso considerable a las 24h. El incremento de esta citocina en el grupo de las *Bifidobacterias* no fue significativo con respecto al control negativo. La concentración de IFN no fue significativa comparado con el control negativo. MCP-1 tuvo un aumento a las 3h. La TNF se incrementó en las primeras horas (1 y 3h), este incremento fue altamente significativo con respecto a los controles, después de las 3h los niveles detectados disminuyeron casi a 0 pg/mL. En la primera hora la IL-10 tuvo un incremento considerable y a las 3h tuvo su mayor detección, ambas horas fueron estadísticamente significativas con respecto a los controles. Los valores de IL-10 fueron inversamente proporcionales a los de TNF (Figura 19).



**Figura 19. Niveles de citocinas en ratones con tumor inoculados intravenosamente con *Bifidobacterias* 1h, 3h, 6h y 8h post inoculación.** B 1h, citocinas después de 1h post inoculación de *Bifidobacterias*; B 3h, citocinas después de 3h post inoculación de *Bifidobacterias*; B 6h, citocinas después de 6h post inoculación de *Bifidobacterias*; B 8h, citocinas después de 8h post inoculación de *Bifidobacterias*; B 24h, citocinas después de 24h post inoculación de *Bifidobacterias*; C+ 1h, citocinas después de 1h post inoculación de *S. Aureus*; C+ 3h, citocinas después de 3h post inoculación de *S. Aureus*; C+ 6h, citocinas después de 6h post inoculación de *S. Aureus*; C+ 8h, citocinas después de 8h post inoculación de *S. Aureus*; Control, ratones inoculados con solución fisiológica al 0.9%. Los datos representan la media ± el error estándar de la media de 3 repeticiones. Arriba de las barras se marcan las diferencias entre cada uno de los tratamientos \*p<0.05, \*\*p<0.01.

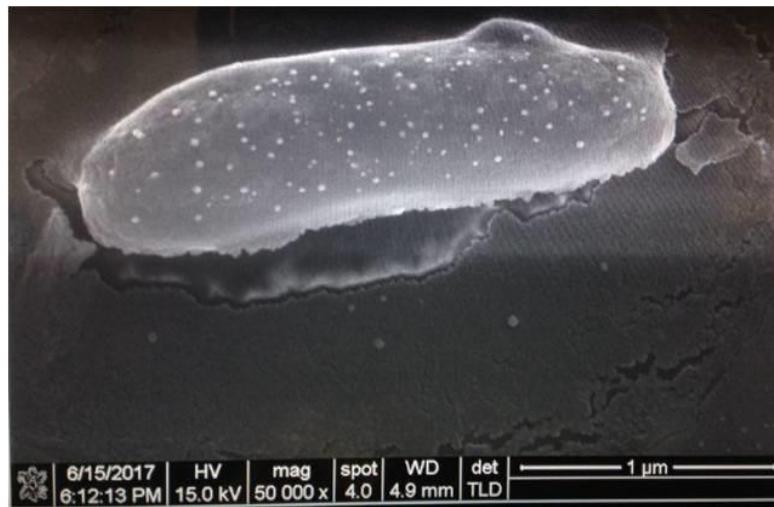
## 15.7 Caracterización de Bacteriobots.

Fue evaluado el potencial Z de los Bacteriobots. El valor obtenido se muestra en la figura 20, donde se observa un potencial Z negativo con una media de -28 mV y una intensidad del 100%.



**Figura 20. Potencial Z de los Bacteriobots.**

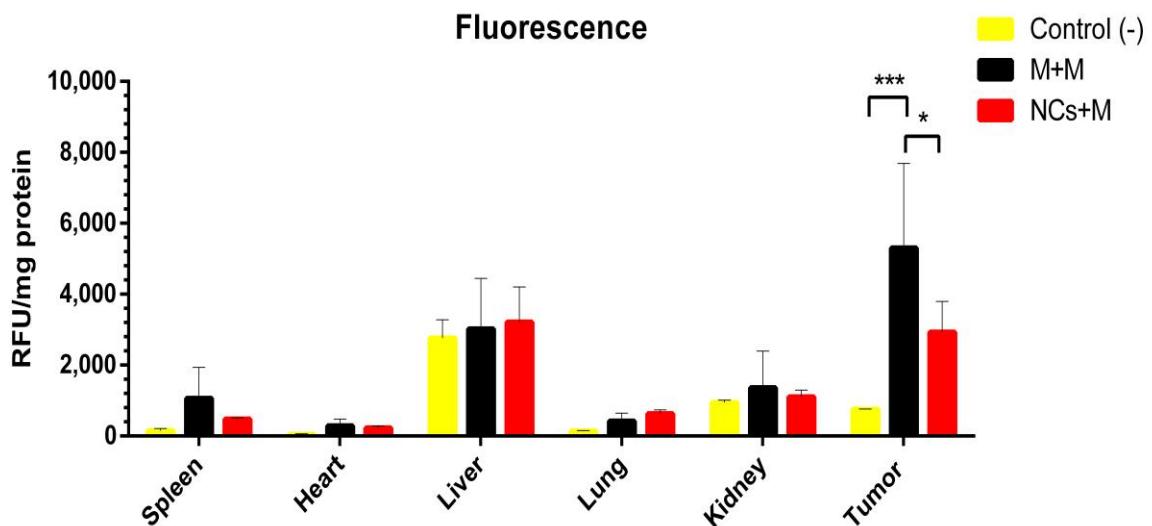
Los Bacteriobots fueron analizados por SEM a 15kV y 50,000x de aumento, Bacteriobots con un diámetro de 1 a 2  $\mu\text{m}$  fueron observados (Figura 21). También se pudo observar que los NCs fueron adheridos a la membrana de la *Bifidobacterias* y no endocitados.



**Figura 21. Micrografía al microscopio electrónico de barrido de un bacteriobot a base de *Bifidobacterias* y nanopartículas magnéticas fluorescentes recubiertas de quitosan-DNA (pHRE-Luc).**

### **15.8 Evaluación de la eficiencia de transporte específico de los Bacteriobots en un modelo *in vivo*.**

Se determinó la eficiencia del transporte de los Bacteriobots mediante una medición de fluorescencia (longitudes de emisión 673 nm y excitación 695 nm). La mayor señal de fluorescencia fue claramente observada en el tejido tumoral comparado con los otros órganos (bazo, corazón, hígado, pulmón, riñón). En el tejido tumoral analizado se comparó la eficiencia de transporte de dos sistemas: Microbots vs Nanocomplejos, teniendo una mayor señal de fluorescencia el grupo de los microbots (figura 22).

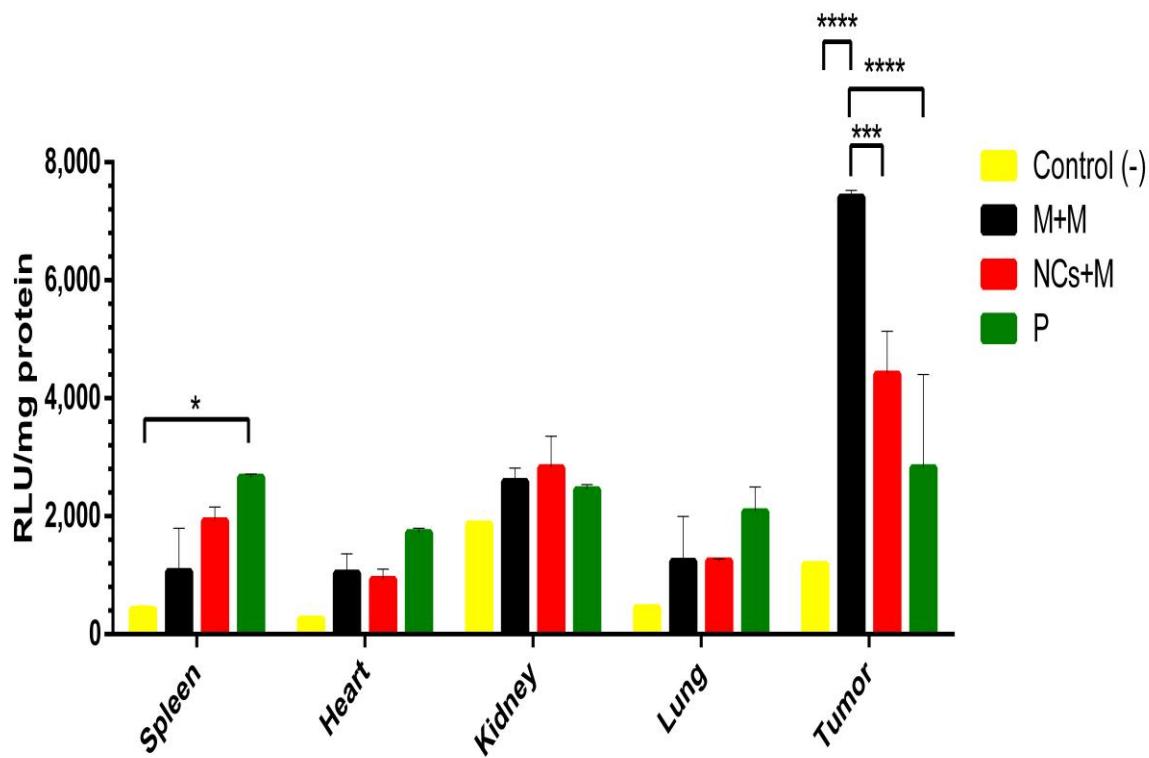


**Figura 22. Análisis de fluorescencia de órganos y tejido tumoral de ratones a las 48h.**

Ratones inoculados intravenosamente con Microbots y NCs. M+M, microbots más la presencia de magneto; NCs+M Nanocomplejos más la presencia de magneto; Control (-), solución fisiológica al 0.9%, todos los tratamientos contienen el vector pHRE-Luc a excepción del control negativo. Los datos representan la media ± el error estándar de la media de 3 repeticiones. Arriba de las barras se marcan las diferencias entre cada uno de los tratamientos \*p<0.05, \*\*\*p<0.001.

### 15.9 Evaluación de la expresión génica de los Bacteriobots como vector en un modelo *in vivo*.

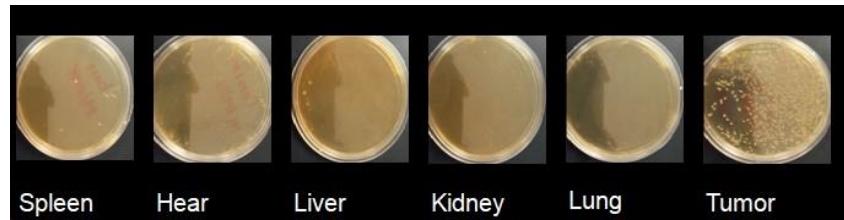
La mayor intensidad de señal de luminiscencia se obtuvo en el tejido tumoral comparado con otros órganos; bazo, corazón, hígado, pulmón y riñón ( $P<0.001$ ). En el grupo de los Microbots más la presencia de magneto (M+M) la biodistribución de la expresión del gen cargado fue mayormente focalizada en tejido tumoral, al igual que en el grupo de los NCs más la presencia de magneto, en cambio, en el grupo del plásmido solo (P), la distribución de la expresión no fue selectiva, si no que fue casi la misma en todos los órganos (Figura 23).



**Figura 23. Cuantificación de la expresión de la luciferasa en órganos y tejido tumoral de ratones a las 48h.** M+M, microbots más la presencia de magneto; NCs+M, Nanocomplejos más la presencia de magneto; Control (-), solución fisiológica al 0.9%, todos los tratamientos contienen el vector pHRE-Luc a excepción del control negativo. Los datos representan la media ± el error estándar de la media de 3 repeticiones. Arriba de las barras se marcan las diferencias entre cada uno de los tratamientos \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001.

### **15.10 Determinación de la localización de los Bacteriobots en un modelo murino tras una IV.**

Para demostrar que los Bacteriobots colonizan tumores. Los órganos y tejidos de ratones (bazo, corazón, hígado, pulmón, riñón y tumor) inoculados con los Bacteriobots, fueron sembrados en placas de agar scMRS en condiciones de anaerobiosis a 37°C de 24 a 48h. Se observó crecimiento bacteriano en la placa con tejido tumoral y un mínimo en hígado y bazo (Figura 24).



**Figura 24. Biodistribución de los Bacteriobots.** El tejido tumoral y órganos mayores (bazo, corazón, hígado, riñón, pulmón) fueron sembrados en placas con agar scMRS.

## 16.DISCUSIÓN

Las estrategias actuales para combatir el cáncer usualmente presentan ciertas desventajas, debido a que no son selectivas para las células cancerígenas y afectan las células de los tejidos normales. Debido a ello, se están buscando nuevas alternativas (Cho *et al.*, 2012). En cáncer, el uso de microbots basado en bacterias anaeróbicas como transportadores específicos dirigidos a tejidos tumorales ha sido explorado, debido a que ellas tienen mecanismos más complejos que les permiten alcanzar tejidos específicos, cruzar barreras no-permeables fácilmente y modular su microambiente (Wang *et al.*, 2014). En este estudio mostramos el uso simultáneo de *Bifidobacterias* con NCs (Bacteriobots) para la entrega de un gen a células tumorales cuya expresión es regulada por el microambiente hipóxico de tumores sólidos en un modelo *in vivo*.

Desde la idea pionera de que las partículas finas de hierro podrían transportarse a través del sistema vascular y concentrarse en un sitio específico del cuerpo con la ayuda de un campo magnético, la aplicación de nanopartículas magnéticas para administrar medicamentos o anticuerpos a órganos o tejidos se ha convertido en un campo de investigación activo (Freeman *et al.*, 1960; Goodwin *et al.*, 1999). Sin embargo, es importante mencionar que la oxidación y erosión ácida de la superficie es un problema importante, ya que su degradación es más rápida. Aunado a esto las nanopartículas desnudas son más susceptibles a la opsonización, además muestran una mayor toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, en este estudio se utilizaron Nanopartículas magnéticas fluorescentes con un núcleo de óxido de hierro recubiertas con quitosán y el vector pHRE-Luc (formando Nanocomplejos o NCs), al recubrirlas con este polímero aumenta su tiempo de circulación, biocompatibilidad y protege a los ácidos nucleicos contra endo/exo nucleasas intra/extracelulares (Issa *et al.*, 2013). Otra de las funciones más importante del recubrimiento con quitosán es que, proporciona enlaces químicos

para la conjugación de moléculas de fármacos, ligandos dirigidos y ácidos nucleicos (Xie *et al.*, 2018).

En este estudio se obtuvieron NCs de 302 nm (figura 12) y 218 nm (figura 13) con los plásmidos pHRE-Luc y pRNAi-HIF respectivamente. Este tamaño es ideal para la transfección en terapias contra tumores, ya que estas pueden extravasarse al área tumoral (Angelova y Yordanov 2015). También se obtuvieron potenciales zeta positivos de +16.1 mV (figura 14) y +15.9 mV (figura 15) respectivamente. Un potencial positivo representa una ventaja en terapias de envío dirigidas y en la eficiencia de transfección, debido a que la membrana celular se encuentra cargada negativamente, de este modo los NC's pueden tener una fuerte interacción electrostática con la célula, lo cual resulta en una rápida endocitosis, permitiendo una transfección eficiente (Kou *et al.* 2013). Una carga excesivamente positiva puede causar citotoxicidad, interacción no específica y agregación sanguínea (Honary y Zahir 2013).

Una vez caracterizados, los NCs fueron inoculados vía IV por vena caudal en ratones, donde se midió la fluorescencia de órganos para determinar su localización 48 h post inoculación, la fluorescencia puede ser determinada debido a que los NCs llevan un fluoróforo orgánico unido covalentemente cuyo espectro es similar al del fluorocromo Cianina 5.5. El órgano que tuvo una mayor acumulación de NCs fue el tejido tumoral (figura 16), debido a que los NCs magnéticos fueron dirigidos mediante un imán hacia la zona del tumor, evitando que se desvíen a tejidos sanos. En cambio, cuando no se aplicó un campo magnético, la concentración de NCs no fue específica de un órgano blanco, si no que se detectó una mayor concentración en hígado y riñón. Este resultado nos indica, que cuando se coloca un campo magnético en un sitio específico, es capaz de sitio dirigir Nanopartículas magnéticas a través de la circulación venosa hacia un órgano o tejido específico deseado. Tal y como lo demostraron Alvizo y colaboradores en 2016 al inocular vía IV Nanopartículas magnéticas acomplejadas con quitosán y pDNA en ratones C57/BL6, mediante un imán dirigieron las Nanopartículas a los focos tumorales en los pulmones de los ratones donde se vio una mayor expresión del gen apoptótico cargado en las Nanopartículas (Alvizo *et al.*, 2016).

Además de comprobar la eficiencia de transporte, también se determinó la eficiencia de expresión del gen reportero acomplejado en los NCs. La mayor intensidad de luminiscencia detectada: fue en el tejido tumoral comparado con los otros órganos (bazo, corazón, hígado, pulmón y riñón), esto debido a que en las regiones tumorales son características la regiones hipoxicas, lo que genera la activación de HIF (Denny, 2010), este factor de transcripción reconoce las repeticiones en tandem de los sitios de unión mínimos de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  puestas en el promotor del vector pHRE-Luc utilizado en este estudio, lo que genero una alta expresión del gen lucifera en el tejido tumoral. El nivel de expresión de la lucifera es dependiente de los niveles de HIF en los tejidos. Esto fue demostrado mediante un iRNA dirigido contra HIF, en el grupo donde se utilizó el iRNA; el nivel de intensidad de luminiscencia disminuyo significativamente. Zhou y colaboradores elaboraron un vector con un promotor similar, al transfectar células en un ambiente hipoxico observaron que la intensidad de eYFP fue significativamente mayor que en células con niveles normales de oxigeno, de igual manera observaron que cuando se transfeto un siRNA contra HIF el nivel de eYFP disminuyo (Zhou *et al.*, 2011). También se observó que en el grupo donde hubo ausencia de un campo magnético para dirigir los NCs, la señal de luminiscencia disminuyó tres veces en comparación con el grupo que si tuvo la presencia de un campo (Figura 17).

Una vez que se comprobó la eficacia de entrega y transporte de los NCs, y la expresión específica en tejido tumoral, se elaboraron Bacteriobots como acarreadores de NCs. Lo primero que se realizó fue comprobar si *B. breve* fue capaz de colonizar tumores tras una inoculación intravenosa en ratones con tumor. Los órganos de ratones inoculados con  $1 \times 10^9$  bacilos fueron sembrados en placas de agar scMRS, se detectó la presencia de *B. breve* mediante PCR en los días 5, 7 y 9 post inoculación, esto solo en tejido tumoral (Figura 18). En el 2001 Yazawa y colaboradores, administraron intravenosamente *B. Longum* con el plásmido denominado pBLES100 a ratones con carcinoma mamario, inicialmente se observó una distribución de los bacilos viables en todo el cuerpo, pero después de 96-168 horas solo se detectaron en el tejidos tumorales, los cuales presentaban replicación y expresión del plásmido pBLES100. Los bacilos fueron solo encontrados en el tumor debido al ambiente de hipoxia necesario para el crecimiento de esta bacteria (Yazawa *et al.*, 2001).

Ya que la manera de administrar *B. breve* en ratones es vía IV, se evaluaron los niveles de citocinas inflamatorias 1, 3, 6, 8 y 24h post inoculación en los mismos. En la primera hora hubo un incremento de la TNF aprox. 170 pg/mL, la cual se fue reduciendo conforme fue en aumento la IL-10 (120pg/mL), a la 3er hora la TNF bajo su concentración a 140 pg/mL mientras que la IL-10 aumento a casi 200 pg/mL, a partir de la sexta hora ambas citocinas se redujeron casi a su nivel basal. Estudios muestran que las Bifidobacterias son capaces de promover la inducción de las citocinas TNF e IL-10 (Amrouche *et al.*, 2006; López *et al.*, 2010; Herfel *et al.*, 2013). Curiosamente, IL-10 y TNF $\alpha$  son dos citoquinas pleiotrópicas que son producidas tanto por linfocitos T como por células mieloides. Están mutuamente reguladas y juegan roles opuestos en las respuestas inflamatorias, y por lo tanto su equilibrio relativo es de relevancia central para controlar la desviación inmune (López *et al.*, 2010). Algunos géneros de Bifidobacterias secretean serpinas extracelulares, las cuales son inhibidores de la serina proteasa, tienen la capacidad de unirse e inactivar a las mismas. El gen que codifica la serpina no está ampliamente distribuido entre el género *Bifidobacterium*, y hasta el 2010 se ha identificado en nueve especies (Turroni *et al.*, 2010). Mas precisamente, los objetivos de las serpinas secretadas por las Bifidobacterias son dos importantes proteasas pro-inflamatorias: la neutrófila humana y elastasa pancreática (Ivanov *et al.*, 2006).

Una vez que se comprobó que la administración de Bifidobacterias por torrente sanguíneo es segura, se elaboraron Bacteriobots a partir de la cepa *B. breve* y NCs de 200-300 nm con un potencial zeta positivo. Posteriormente se determinó su forma y morfología donde se utilizó SEM a un voltaje de 15 kV y una magnificación de 50,000X, donde se observaron microbots con un diámetro entre 1-2  $\mu$ m, los resultados confirmaron que los NCs fueron adheridos uniformemente a la superficie bacteriana (Figura 21). Los microbots fueron inoculados vía IV por vena caudal en ratones, donde se midió la fluorescencia de órganos para determinar su localización 48 h post inoculación. El órgano que tuvo una mayor acumulación de Bacteriobots fue el tejido tumoral (figura 22), debido a que estos tienen la capacidad de localizarse y germinar en las zonas tumorales después de una inyección IV. Se colocó un imán en la zona tumoral para acelerar y eficientar la llegada de los microbots. En cambio, cuando se comparó el

grupo de Microbots contra los NCs, se observó una mayor acumulación de Microbots en el tejido tumoral, lo que indicó que los Microbots tienen una mayor capacidad para llegar a tumor después de ser inoculados vía IV que los NCs solos. La fluorescencia obtenida en tejido tumoral no se compara con la obtenida en otros órganos sanos; sin embargo, se detectó una ligera detección de fluorescencia en el hígado y el riñón, ya que juegan un importante papel en la excreción de nanopartículas y otras sustancias (Ernsting *et al.*, 2013; Anita *et al.*, 2018).

Múltiples reportes indican que los vasos sanguíneos tumorales presentan anomalías estructurales y están interrumpidos por fenestraciones, con un tamaño de 400 nm a 1-2 micrones, lo cual permite la extravasación de nuestros Bacteriobots hacia las células tumorales (Angelova y Yordanov 2015; Graham y Unger 2018; Yuan *et al.*, 1995) ya que miden aproximadamente 2  $\mu$ m (Figura 21), además los Bacteriobots pueden colonizar áreas hipóticas del tumor debido a sus complejos mecanismos (Wang *et al.*, 2014). Una vez en el área tumoral, los NCs adheridos a la bacteria fueron liberados (debido a las condiciones ligeramente ácidas del microambiente tumoral) y endocitados por las células tumorales para la expresión genética del vector pHRE-Luc. La expresión de luciferasa fue medida 48 h después de la administración IV de microbots que contenía 50  $\mu$ g del vector pHRE-Luc. Se determinó que en el tejido tumoral se dio la mayor expresión de luciferasa, esto comparado con los demás órganos sanos, esta expresión selectiva es atribuida al promotor hipótico y a la presencia de los elementos de respuesta a hipoxia que incrementan la expresión del gen luciferasa ante condiciones hipóticas (Marignol *et al.*, 2005; Greco *et al.*, 2003). Además, los microbots fueron comparados con otros dos sistemas de entrega de genes; NCs solos y el plásmido desnudo. Los microbots mostraron una diferencia significativa en cuanto a la eficiencia de entrega de genes a un tejido específico (Figura 23).

*B. breve* fue usada como vehículo para acarrear y transportar NCs a la zona del tejido tumoral por las siguientes razones: primeramente, al ser una bacteria probiótica típica que existe en muchos tipos de mamíferos incluyendo a los seres humanos, se ha probado que el uso de *B. breve* es seguro, sin efectos inmunes secundarios o patogénicos. Segundo, al ser una bacteria anaeróbica *B. breve* solamente coloniza tejidos hipóticos y

esto le da un potencial para asentarse en la profundidad de los tejidos de los tumores sólidos, en lugar de en los órganos y tejidos sanos. Tercero, la superficie rica en peptidoglucano de la bacteria permite modificaciones químicas adicionales para mejorar la especificidad y eficacia de la entrega de los NCs. Cuarto, la escala-micrón de *B. breve* tiene suficiente espacio dentro para el acoplamiento de los NCs con tamaño nano (Liu *et al.*, 2012).

Los microbots probaron ser muy específicos y eficientes como sistema de entrega de genes ya que la expresión de los genes entregados fue específica en el tejido tumoral debido a: la habilidad de los microbots para colonizar solamente tumores y no los tejidos sanos. Los NCs magnéticos unidos a las membranas de los microbots fueron dirigidos por un magneto al tejido tumoral, mejorando la eficiencia del transporte. El quitosán fue usado para proteger al ADN de degradación. Los bajos niveles de oxígeno en el microambiente tumoral, generaron la acumulación de HIF, el cual puede incrementó la expresión del gen luciférica del vector pHRE-Luc; sin embargo, en tejidos con niveles normales de oxígeno, esta acumulación de HIF no ocurrió, por lo cual la expresión de luciférica fue mínima (comparado con el tejido tumoral). Estos microbots son biocompatibles y seguros para su uso.

## 17.CONCLUSIONES

- Se elaboraron y caracterizaron Nanocomplejos de quitosan- pDNA-NPMF con un tamaño de entre 250 y 300 nm y un potencial Z de + 16mV
- La influencia de un campo magnético fue capaz de dirigir y focalizar NCs en el tejido tumoral de un modelo murino.
- *B. breve* demostró tener una alta capacidad para colonizar tumores sólidos y no otros órganos sanos en un modelo tumoral *in vivo*.
- *B. breve* es una bacteria segura al utilizarla como vehículo de transporte para terapia génica, al ser inoculada IV en un modelo murino, no representa ningún riesgo ya que es capaz de regular a la par citocinas inflamatorias y antiinflamatorias resultando en un punto medio de la inflamación.
- Se elaboraron y caracterizaron Bacteriobots a base de *Bifidobacterias*, NPMF, quitosan y pDNA.
- La microscopía de barrido electrónico demostró que los Bacteriobots tienen un tamaño de entre 1.5 a 2  $\mu\text{m}$  además de comprobar que los NCs son adheridos a la membrana de la bacteria.
- Los Bacteriobots tienen la capacidad de dirigirse y focalizarse significativamente en el tumor sólido de un modelo murino tras una IV.
- La expresión del gen cargado en la membrana del bacteriobot es regulada por el microambiente hipóxico de un tumor sólido

- La expresión del gen cargado en la membrana del bacteriobot es significativamente mayor en tejido tumoral comparada con tejidos sanos.
- El sistema de Bacteriobots demostró ser más eficiente en el transporte y expresión génica tejido-específico, comparado con NCs y plásmido desnudo.
- El Bacteriobot está diseñado con componentes biocompatibles y no tóxicos que le confieren un potencial para su aplicación en humanos

## **18.PERSPECTIVAS**

La importancia de este trabajo radica en la especificidad del Bacteriobot hacia tejido tumoral, así como en la expresión tejido-específica del gen reportero. El desarrollo de esta estrategia tiene aplicaciones en el área biomédica como agente teragnóstico, en terapia génica contra tumores y en otros campos como monitoreo ambiental, y militar. Los NCs adheridos a la membrana del Bacteriobots pueden ser acomplejados con algún farmaco y sustituir el gen reportero con un gen apoptótico ya que el Bacteriobot es altamente selectivo, el farmaco solo se libera en el sitio tumoral reduciendo al mínimo los daños a células sanas.

## 19.BIBLIOGRAFÍA

- Angelova N, Yordanov G. 2015. Albumin-stabilized epirubicin nanocarriers of core-shell type based on poly(butyl cyanoacrylate) and poly(styrene-co-maleic acid). *Colloids Surfaces A.* **487**:232–239.
- Anita K, Ankita L, Vljay K, Imran M, Suresh K. 2018. Biodistribution and in-vivo efficacy of doxorubicin loaded chitosan nanoparticles in ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing balb/c mice. *J Nanomed Nanotechnol.* **9:4**:2157-7439.
- Afkhami F, Taherkhani S, Mohamood M, Martel S. 2011. Encapsulation of magnetotactic bacteria for targeted and controlled delivery of anticancer agents for tumor therapy. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 6668:6671.
- Akhtar S. 2006. Beyond delivery. *Gene Ther.* **13**:739-740.
- Akin D, Sturgis J, Ragheb K, Sherman D, Burkholder K, Robinson J, Bashir R. 2007. Bacteria-mediated delivery of nanoparticles and cargo into cells. *Nat nanotechnol.* **2:7**: 441.
- Ali A, Ahmed S. 2018. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int J Biol.* **109**: 273-286.
- Alvizo C, Luna I, Vilches N, Rodríguez C, Alcocer G. 2016. Systemic delivery and activation of the TRAIL gene in lungs, with magnetic NP of chitosan controlled by an external magnetic field. *Int J Nanomed.* **11**: 6449-6458.
- Amrouche T, Boutin Y, Prioult G, Fliss I. 2006. Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production. *Int Dairy J.* **16:1**: 70-80.
- Arias J, Reddy L, Couvreur P. 2012. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/chitosan nanocomposite for magnetic drug targeting to cancer. *J Mater Chem.* **22:15**: 7622

- Arunachalam K. 1999. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology, *Nutr Res.* **19**: 1559–1597.
- Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. 2013. *Nat Rev Cancer.* **13**:727–738.
- Baban C, Cronin M, O'Hanlon D, Sullivan G, Tangney M. 2010. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer. *Bioeng Bugs.* **1**:6: 385-394.
- Bermudes D, Zheng, L, King I. 2002. Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors. *Curr Opin Drug Disc.* **5**: 194–199
- Bertout JA, Patel SA, Simon MC. 2008. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat Rev Cancer.* **8**:12:967–975.
- Brown JM. 2007. Tumor Hypoxia in Cancer Therapy. *Method Enzymol.* **435**:297-302.
- Brown JM, Wilson WR. 2004. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* **4**:6: 437–447.
- Chauhan VP, Jain RK. 2013. Strategies for advancing cancer nanomedicine. *Nat Mater.* **12**:11:958–962.
- Chen W, Wang Y, Qin M, Zhang X, Zhang Z, Sun X, Gu Z. 2018. Bacteria-driven hypoxia targeting for combined biotherapy and photothermal therapy. *ACS nano.* **12**:6: 5995-6005.
- Cho S, Park SJ, Young S, Park J, Park S. 2012. Development of bacteria-based microrobot using biocompatible poly (ethylene glycol). *Biomed Microdevices.* **14**:1019–1025.
- Cho S, Jin Y, Zhung S, Han J, Young S, Prak J, Park S. 2015. Modeling of chemotactic steering of bacteria based microrobot using a population scale approach. *Biomicrofluidics.* **9**: 5: 054116.

Wang Q, Chengb H, Penga H, Zhoub H, Lib PY, Lange R. Non-genetic engineering of cells for drug delivery and cell-based therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **2014:** 91:125-140.

Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki E, Tilkins M, Price P, Ciccarone V. 2004. Advanced transfection with lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, si RNA and high-throughput applications. *Methods.* **33:** 95-103.

Dang L, Bettegowda C, Huso D, Kinzler K, Vogelstein B. 2001. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors, *PNAS.* **98:**15155–15160.

Darnton N, Turner L, Breuer K, Berg H. 2004. Moving fluid with bacterial carpets. *Biophys J.* **86:3:** 1863-1870.

Freeman M, Arrott A, Watson J. 1960. Magnetism in medicine. *J Appl Phys.* **31:** 404-405.

Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. 2011. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci.* **36:**981–1014.

Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li SD. 2013. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release.* **172:3:**782–794.

Erkoc P, Yasa I, Ceylan H, Yasa O, Alapan Y, Sitti M. 2018. Mobile microbots for active therapeutic delivery. *Adv Ther.* **2:1:** 1800064.

Fu A, Wilson RJ, Smith BR, Mullenix J, Earhart C, Akin D, Gambhir SS. 2012. Fluorescent magnetic nanoparticles for magnetically enhanced cancer imaging and targeting in living subjects. *ACS Nano.* **6:8:**6862–6869.

Gao X, Huang L. 1995. Cationic liposome-mediated gene transfer, *Gene Ther.* **2:**710–722.

- Gobbo O, Sjaastad K, Radomski M, Volkov Y, Prina A. 2015. Magnetic Naanoparticles in cáncer theranostics. *Theranostics*. **5:11**:1249-1263.
- Goodwin S, Peterson C, Hoh C, Bittner C. 1999. Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy. *J Magn Magn Mater*. **194**: 132-139.
- Graham K, Unger E. 2018. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Int J Nanomed*. **13**:6049–6058.
- Greco O, Marples B, Joiner MC, Scott SD. 2003. How to overcome (and exploit) tumor hypoxia for targeted gene therapy. *J Cell Physiol*. **197**: 312-325.
- Greijer AE, Wall E. 2004. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*. **57**:1009-1014.
- Han J, Choi Y, Cho S, Zheng S, Ko, S, Park J, Park S. 2016. Active tumor-therapeutic liposomal bacteriobot combining a drug (paclitaxel)-encapsulated liposome with targeting bacteria (*Salmonella Typhimurium*). *Sens Actuators B Chem*. **224**: 217-224.
- Hardee C, Arévalo L, Hornstein B, Zechiedrich L. 2017. Advances in non viral DNA vectors for gene therapy. *Genes*. **8**: 65.
- Herfel T, Jacobi S, Lin X, Jouni Z, Chichlowski M, Stahl C, Odle J. 2013. Dietary supplementation of *Bifidobacterium longum* strain AH1206 increases its cecal abundance and elevates intestinal interleukin-10 expression in the neonatal piglet. *Food chem toxicol*. **60**:116-122.
- Hidai C, Kitano H. 2018. Nonviral Gene Therapy for Cancer: A Review. *Diseases*. **6:3**:57.
- Hoekstra D, Rejman J, Wasungu L, Shi F, Zuhorn I. 2007. Gene delivery by cationiclipids: in and out of an endosome. *Biochem Soc Trans*. **35**: 68–71.

Honary S, Zahir F. 2013. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop J Pharm Res.* **12**: 2:265–273.

Huang M, Khor E, Lim L. 2004. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of descetylation. *Pharm Res.* **21**:2:344-353.

Hu Z, Zhang D, Lu S, Li P, Li S. 2018. Chitosan based composite materials for prospective hemostatic applications. *Mar Drugs.* **16**:8:273.

Huang M, Fong C, Khor E, Lim L. 2005. Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *J Control Release.* **106**:391–406.

Issa B, Obaidat I, Albiss B, Haik Y. 2013. Magnetic nanoparticles: Surface effects and properties related to biomedicine applications. *Int J Mol Sci.* **14**: 11: 21266-21305.

Ishii T, Okahata Y, Sato T. 2010. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochimica et Biophysica Acta Biomemb.* **1514**: 51–64.

Ivanov D, Emonet C, Foata F, Affolter M, Delley M, Fisseha M, Arigoni F. 2006. A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *J Biol Chem.* **281**:25:17246-17252.

Jones C, Chen C, Ravikrishnan A, Rane S, Pfeifer B. 2010. Overcoming nonviral gene delivery barriers: perspective and future. *Mol Pharm.* **10**:4082-4098.

Kaneda Y, Tabata Y. 2006. Non viral vectors for cáncer therapy. *JCA.* **97**: 5: 324-354.

Kean T, Thanou M. 2010 Biodegradation, Biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* **62**:1: 3-11.

Keith B, Johnson RS, Simon MC. 2012. HIF  $\alpha$  and HIF2  $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.* **12**:9-22.

- Khattak S, Wahid F, Liu L, Jia S, Chu L, Xie Y, Li Z, Zhong C. 2019. Applications of cellulose and chitin/chitosan derivates and composites as antibacterial materials: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biot.* **103**:1989-2006.
- Kimura NT, Taniguchi S, Aoki K, Baba T. 1980. Selective localization and growth of *Bifidobacterium bifidum* in mouse tumors following intravenous administration. *Cancer Res.* **40**:2061-2068.
- Kok J, Van der Vossen J. MB M, Venema G. 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb.* **48**: 726-731.
- Koping M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Varum M, Artursson P. 2001 Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther.* **8**: 1108–1121.
- Kou L, Sun J, Zhai Y, He Z. 2013. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J Pharm Sci.* **8**:1:1–10.
- Lasic D, Templeton N. 1996. Liposomes in gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **20**: 221–266.
- Leone RD, Horton MR, Powell JD. 2015. Something in the air: hyperoxic conditioning of the tumor microenvironment for enhanced immunotherapy. *Cancer Cell.* **27**:4:435–436.
- Li S, Huang L. 2000. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther* **7**:31-34.
- Liu Y, Zhou M, Luo D, Wang L, Hong Y, Yang Y, Sha Y. 2012. Bacteria-mediated in vivo delivery of quantum dots into solid tumor. *Biochem Biophys Res Commun.* **425**:4: 769-774.

- López M. 2006. Hypoxia inducible factor 1 as a possible target for cancer chemoprevention. *Cancer Epidem Biomar.* **15**:2332-2335.
- López P, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. 2010. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. *Int J Food microbiol.* **138:1:2**: 157-165.
- Luo Ch, Huan Ch, Su Ch, Yeh Ch. 2016. Bacteria-mediated hypoxia-specific delivery of nanoparticles for tumors imaging and therapy. *Nano letters.* **16:6**:3493-3499.
- Luo Y, Xu D, Gao X, Xiong J, Jiang B, Zhang Y, Li H. 2019. Nanoparticles conjugated with bacteria targeting tumors for precision imaging and therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* **514:4**: 1147-1153.
- Maldonado L, Unni M, Rinaldi C. 2017. Magnetic characterization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Methods Mol Biol.* **1570**: 47-71.
- Marignol L, Lawler M, Coffey M, Hollywood D. 2005. Achieving hypoxia-inducible gene expression in tumors. *Cancer Biol Ther.* **4**: 359-364.
- Mao S, Sun W, Kissel T. 2010. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev.* **62**:12–27.
- Min J, Nguyen V, Gambhir S. 2010. Molecular Imaging of Biological Gene Delivery Vehicles for Targeted Cáncer Therapy: Beyond Viral Vectors. *Nucl Med Mol Imaging.* **44**:15–24.
- Mohamed M, Seyda J, Wasan K, Wasan E. 2017. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non parental drug delivery. *Pharmaceutics.* **9:4**:53.
- Monti E, Gariboldi MB. 2011. HIF-1 as a target for cancer chemotherapy, chemosensitization and chemoprevention. *Curr Mol Pharmacol.* **4**: 62-77.
- Nayerossadat N, Maedeh T, Abas P. 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res.* **1:27**.

Park S, Park S, Cho s, Kim D, Lee Y, Ko S, Hong Y, Choy H, Min J, Park J, Park S. 2013. New paradigm for tumor theranostic methodology using bacteria based microrobot. *Sci Rep.* **3**: 3394.

Phase I/II study of APS001F with flucytosine and maltose in solid tumors.(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01562626, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01562626>).

Polak R, Lim R, Beppu M, Pitombo R, Cohen R, Rubner M. 2015. Liposome-Loaded Cell Backpacks. *Adv Healthc Mater.* **4:18**: 2832-2841.

Reynoso N, Torres J. 2017. Epidemiology of cáncer in México: global burden and projections 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual.* **8**: 9-15.

Rodrigues S, Dionísio M, Remuñán C, Grenha A. 2012. Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. *J Funct Biomater.* **3**:615-641.

Sabu Ch, Rejo Ch, Kota S, Pramod K. 2018. Bioinspired and biomimetics systems for advanced drug and gene delivery. *J Controlled Release.* **287**: 142-155.

Saranya N, Moorthi A, Saravanan S, Devi M, Selvamurugan N. 2011. Chitosan and its derivatives for gene delivery. *Int J Biol Macromol.* **48**: 234–238.

Semple S, Akinc A, Chen J, Sandhu A, Mui B, Cho C, Sah D, Stebbing D, Crosley E, Yaworski E, Hafez I, Dorkin J, Quin J, Lam K, Rajeev K, Wong K, Jeffs L, Nechev L, Eisenhardt M, Jayaraman M, Kazem M, Maier M, Srinivasulu M, Weinsten M, Chen Q, Alvarez R, Barros S, De S, Klimuk S, Borland T, Kosovrasti V, Can tley W, Tam Y, Manoharan M, Ciufolini M, Tracy M, Fougerolles A, MacLachlan I, Cullis P, Madden T, Hope M. 2010. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol.* **28**: 172-178.

St George JA. 2003 Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther.* **10**:1135-1141.

- Stanton M, Simmchen J, Ma X, López M, Sánchez S. 2016. Biohybrid janus motors driven by *Escherichia coli*. *Adv Mater Interfaces*. **3**:2: 1500505.
- Tang W, He Y, Zhou S, Ma Y, Liu G. 2009. A novel *Bibidobacterium infantis* mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. **16**:28:155.
- Tanaka Y, Sato K, Shimizu T, Yamato M, Okano T, Kitamori T. 2007. Biological cells on microchips: New technologies and applications. *Biosens Bioelectron*. **23**:449–458.
- Teicher BA, Holden SA, Al-Achi A, Herman TS. 1990. Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSaIIC murine fibrosarcoma. *Cancer Res*. **50**:11:3339–3344.
- Teicher BA, Lazo JS, Sartorelli AC. 1981. Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res*. **41**:1:73–81.
- Taherkhani S, Mohammadi M, Daoud J, Martel S, Tabrizian M. 2014. Covalent binding of nanoliposomes to the surface of magnetotactic bacteria for the synthesis of self-propelled therapeutic agents. *ACS nano*. **8**:5: 5049-5060.
- Theys J, Barbe S, Landuyt W, Nuyts S, Van Mellaert L, Wouters B, Anne J, Lambin P. 2003. Tumor-specific gene delivery using genetically engineered bacteria. *Curr Gene Ther*. **3**:207-221.
- Turroni F, Foroni E, Motherway M, Bottacini F, Giubellini V, Zomer A, Ventura M. 2010. Characterization of the serpin-encoding gene of *Bifidobacterium breve* 210B. *Appl. Environ. Microbiol*. **76**:10: 3206-3219.
- Wang Y, Shang W, Jie MN, Xu K. 2019. Hypoxia-active nanoparticles used in tumor theranostic. *Int J Nanomed*. **14**:3705–3722.

Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, Jain RK. 1995. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* **55**:3752–3756.

Xie S, Chen M, Song X, Zhang Z, Zhang Z, Chen Z, Li X. 2018. Bacteria microbots for acid labile release of hybrid micelles to promote the synergistic antitumor efficacy. *Acta Biomater.* **78**: 198-210.

Xie W, Guo Z, Gao F, Gao Q, Wang D, Liaw B, Cai Q, Sun X, Wang X, Zhao L. 2018. Shape, size and structure controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticle for magnetic theranostics. *Theranostics.* **8**: **12**: 3284-3307.

Xu LF, Ni JY, Sun HL, Chen YT, Wu YD. 2013. Effects of hypoxia inducible factor 1  $\alpha$  silencing on the proliferation of CBRH-7919 hepatoma cells. *World J Gastroenterol.* **19**:**11**:1749-1759.

Wang GL, Semenza GL: 1993. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *PNAS.* **90**: 4304-4308.

Wang L, Vuletic I, Deng D, Crielaard W, Xie Z, Zhou K, Guo C. 2017. Bifidobacterium breve as a delivery vector of IL-24 gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Gene Ther.* **24**:**11**: 699.

Wang Q, Chengb H, Penga H, Zhoub H, Lib PY, Lange R. 2014. Non-genetic engineering of cells for drug delivery and cell-based therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **91**:125-140.

Wilson WR, Hay MP. 2011. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* **11**: 393-410.

Vaupel P, Mayer A. 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* **26**:**2**:225–239.

Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano TS. 2000. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective location and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther.* **7:** 269-274.

Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, Sasaki T, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. 2001 *Bifidobacterium longum* as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat.* **66:** 165-170.

Ye B, Zheng R, Ruan X, Zheng Z, Cai H. 2017. Chitosan coated doxorubicin nanoparticles drug delivery system inhibits cell growth of liver cáncer via p53/PRC1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* **495:** 414-420.

Yu Y, Shabahang S, Timiryasova TM, Zhang Q, Beltz R, Gentschev I, Goebel W, Szalay A. 2004. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat Biotechnol.* **22:**313-320.

Zeng W, Liu P, Pan W, Singh SR, Wei Y. 2015. Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism. *Cancer Lett.* **356:2:**263–267.

Zhou W, Dosey T, Biechele T, Moon R, Horwitz M, Ruohola H. 2011. Assessment of hypoxia inducible factor levels in cancer cell lines upon hypoxic induction using a novel reporter construct. *PloS one.* **6:11** e27460.

Zhou Z, Liu X, Zhu D, Wang Y, Zhang Z, Zhou X, Qiu N, Chen X, Shen Y. 2017. Nonviral cancer gene therapy: delivery cascade and vector nanoproperty integration. *Adv Drug Deliv Rev.* **115:** 115-154.

## **20. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.**

Luis Daniel Terrazas Armendáriz

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología

**Tesis:** DESARROLLO DE BACTERIOBOTS BASADOS EN *BIFIDOBACTERIAS* Y  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FLUORESCENTES BIOCOMPATIBLES  
PARA EL ENVÍO DE GENES A TUMOR REGULADOS POR HIPOXIA.

**Campo de Estudio:** Ciencias de la Salud

**Datos personales:** Nacido en Delicias, Chihuahua el 18 de diciembre de 1988, hijo de Luis Daniel Terrazas y María Alicia Armendáriz.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Chihuahua, como Químico Bacteriólogo Parasitólogo y egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León como Maestro en Ciencia con orientación en Inmunobiología.

Experiencia profesional: Investigador de tiempo completo desde 2016 en la FCB-UANL, docente de la materia Biología molecular.



## COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN Y BIENESTAR ANIMAL



RCJ03-009  
Rev. 0.00004

No. Registro  
CEIBA-2018-012

Comité de Ética de  
Investigación y Bienestar  
Animal

Dr. Moisés Armides  
Franco Molina

Presidente

Dr. Diana Caballero  
Hernández

Secretario

Vocales

M.C. MVZ. Daniel Julio  
Eguíarre Lira

Dr. Gabino Adrián  
Rodríguez Almaraz

Dr. Roberto Mercado  
Hernández

Miembros Externos

Dr. José González Salinas

Lic. Cinthya Galván Pinedo  
(Campaña de adopción y  
socorro animal A.C.)

Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de  
Ciencias Biológicas, (CEIBA) de la UANL

Para: Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

Fecha de aprobación: 26 de junio de 2018

Título: Construcción y evaluación de un dispositivo generador de  
campos electromagnéticos para la atracción tejido específico de  
nanopartículas metálicas

El presente es referencia para el protocolo de investigación mencionado en la  
parte superior.

En la deliberación de este comité, los procedimientos de dicha aplicación  
conformada por las reglas y el reglamento interno con los temas de uso  
animal. La aprobación se otorga durante un año.

Sin más por el momento, le reitero la seguridad de mi más atenta y  
distinguida consideración.

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, a 29 de junio de 2018



Dr. Moisés Armides Franco Molina  
Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de  
Ciencias Biológicas (CEIBA)



## COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN Y BIENESTAR ANIMAL



RC-07-192  
Rev. 0.06/04

No. Registro  
CEIBA-2018-022

Comité de Ética de  
Investigación y Bienestar  
Animal

Dr. Moisés Armides  
Franco Molina

Presidente

Dr. Diana Caballero  
Hernández

Secretario

Vocales

M.C. MVZ. Daniel Julio  
Eguíarre Lara

Dr. Gabino Adrián  
Rodríguez Almaraz

Dr. Roberto Mercado  
Hernández

Miembros Externos

Dr. José González Salinas

Lic. Cinthya Galván Pinedo  
(Campaña de adopción y  
socorro animal A.C.)

Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de  
Ciencias Biológicas, (CEIBA) de la UANL

Para: cDr. Luis Daniel Terrazas Armendáriz

Fecha de aprobación: 21 de mayo de 2018

Título: Desarrollo de un nanovector para la expresión génica específica  
en tumores controlada por la hipoxia y un campo magnético externo.

El presente es referencia para el protocolo de investigación mencionado en la  
parte superior.

En la deliberación de este comité, los procedimientos de dicha aplicación  
conformada por las reglas y el reglamento interno con los temas de uso  
animal. La aprobación se otorga durante un año.

Sin más por el momento, le reitero la seguridad de mi más atenta y  
distinguida consideración.

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, a 27 de junio de 2018

Dr. Moisés Armides Franco Molina

Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de  
Ciencias Biológicas (CEIBA)



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS, FACULTAD DE MEDICINA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FACULTAD DE AGRONOMÍA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN APLICADA PARA LA SALUD PÚBLICA

OTORGА LA PRESENTE

# Constancia

A

TERRAZAS ARMENDÁRIZ LUIS DANIEL, LUNA CRUZ ITZA ELOISA, RODRÍGUEZ  
PADILLA CRISTINA, ALCOCER GONZÁLEZ JUAN MANUEL.

POR SU PARTICIPACIÓN COMO PONENTES EN EL TRABAJO LIBRE

**Construcción y evaluación de un promotor eucariótico que controla  
la expresión de genes heterólogos en condiciones de hipoxia.**

PRESENTADO EN EL



REALIZADO DEL 25 AL 28 DE NOVIEMBRE DE 2015, EN LA CIUDAD DE MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO

ATENTAMENTE

"SURSUM VERSUS"

CULIACÁN ROSALES SINALOA, MÉXICO, 28 DE NOVIEMBRE DE 2015

DR. JUAN EULALIO GUERRA LIERA  
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

Sylvia Díaz Camacho  
DRA. SYLVIA DÍAZ CAMACHO  
PRESIDENTA DEL COMITÉ ORGANIZADOR





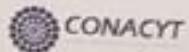
**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

RC-O  
Rev. 1



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



En el marco del  
**8º Simposio Internacional en  
Inmunopatogénesis e Inmunoterapia en Cáncer y  
Enfermedades Infecciosas**

2 y 3 de noviembre de 2015

Se otorga la **mención especial** al trabajo expuesto en cartel:

**"Construcción y evaluación de un promotor eucariótico que controla la expresión de genes heterólogos en condiciones de hipoxia"**

Terrazas Armendáriz Luis Daniel, Luna Cruz Itza Eloisa, Rodríguez Padilla Cristina,  
Alcocer González Juan Manuel.

"Alere Flammam Veritatis"

Ciudad Universitaria, 2 y 3 de noviembre de 2015.

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA  
JEFE DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y  
VIROLOGÍA  
RESPONSABLE TÉCNICO  
RED INMUNOCANEI

DRA. LYDIA RIVERA MORALES  
COORDINADOR DEL EVENTO  
MIEMBRO DEL COMITÉ  
TÉCNICO ACADÉMICO INMUNOCANEI



**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Ciencias Químicas  
Área y Cuerpos Académicos de Químico Farmacéutico Biólogo

OTORGAN EL PRESENTE

# RECONOCIMIENTO

A

*Luis Daniel Terrazas Armendáriz*

POR SU PARTICIPACIÓN Y ASISTENCIAL AL

## "III Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y I Simposio Nacional de Microbiología Aplicada"

LLEVADO A CABO EN EL CENTRO DE CONVENCIONES DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, U.A.N.L.  
EL 1 Y 2 DE SEPTIEMBRE DE 2016

Dr. Isaias Balderas Renteria  
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR

*Alere Flammam Veritatis*

  
Dr. Eduardo Soto Regalado  
DIRECTOR

**DAAD**  
Deutscher Akademischer Austausch Dienst  
German Academic Exchange Service

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León  
a través de la Subdirección de Investigación otorga  
**la presente**

## CONSTANCIA

a:

**MC Luis Daniel Terrazas Armendáriz**

por su asistencia al



Llevado a cabo del 4 al 7 de Octubre de 2017  
en Monterrey, N.L. México  
"Alere Flammam Veritatis"

  
Dr. med. **Edelmiro Pérez Rodríguez**

Director

  
Dr. C. **Guillermo Elizondo Riojas**

Secretario de Fomento a la Investigación

  
Dr. med. **Consuelo Treviño Garza**

Coordinadora XXIX Congreso Nacional  
de Investigación en Medicina

  
Dr. med. **José Gerardo González González**  
Subdirector de Investigación