

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA MOLECULAR



Diseño, construcción y evaluación *in vitro* de un nanosistema magnético para la transfección de líneas celulares de cáncer de mama HER2+

Presentada por:

M.C. Jorge Alberto Roacho Pérez

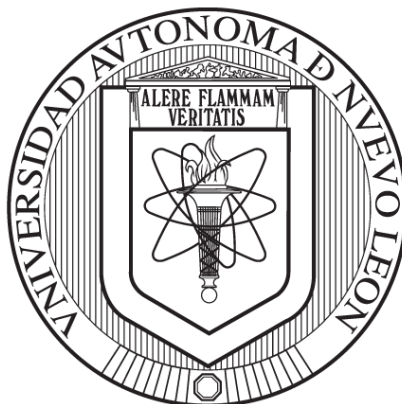
Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias con orientación en
Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Agosto 2020 Monterrey, Nuevo León

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA MOLECULAR



**Diseño, construcción y evaluación *in vitro* de un nanosistema magnético para la
transfección de líneas celulares de cáncer de mama HER2+**

Presentada por:

M.C. Jorge Alberto Roacho Pérez

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias con orientación en
Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Agosto 2020 Monterrey, Nuevo León

Diseño, construcción y evaluación *in vitro* de un nanosistema magnético para la transfección de líneas celulares de cáncer de mama HER2+

Aprobación de tesis:



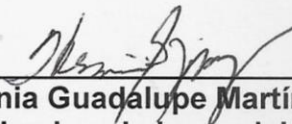
Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez
Director de Tesis



Dra. C. Perla Elvia García Casillas
Co-Director de Tesis



Dr. C. Christian Chapa Gonzalez
Miembro de la comisión



Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Miembro de la comisión



Dr. C. Hugo Leonid Gallardo Blanco
Miembro de la comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Agosto 2020 Monterrey, Nuevo León

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en los Laboratorios de Ciencias de Materiales del Instituto de Ingeniería y Tecnología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez; bajo la dirección de la Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez y la codirección de la Dra. C. Perla Elvia García Casillas.

Este trabajo fue aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL con el número de registro BI17-00001.

Este proyecto fue realizado gracias a recursos del CONACyT de la convocatoria de Ciencia Básica 2017-2018 con número de proyecto A1-S-9859.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano

Delfina Pérez Torres

Jorge Roacho Muñoz

Alejandro Roacho Pérez

por siempre apoyarme

*A todas las personas que me acompañaron en mi aventura en Monterrey,
especialmente a*

Jonathan D Rodríguez San Martín

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento a los investigadores involucrados en el proyecto, que dirigieron y asesoraron, para que éste pudiera culminar. También a los estudiantes, voluntarios, tesistas de licenciatura, servicio social y técnicos que apoyaron en el proyecto experimental.

De la Facultad de Medicina UANL, a la Dra. Celia Sánchez, Dr. Hugo Gallardo, Dra. Elsa Garza, Dra. Herminia Martínez, QCB. Kassandra Aguillón, E.MCP. Fernando Ruíz, E.QCB. Aline Martínez y E.QCB. Paola Carrión.

Del Instituto de Ingeniería y Tecnología UACJ, a la Dra Perla García, Dr. Christian Chapa, M.C. Israel Flores, M.C. Víctor Gómez, M.C. Sofía Valenzuela, Biol. Óscar Zabala, IB. Itzel Morales, IB. Karla Sosa, IB. Alexa Escareño e IB. Tomás Galván.

Del CIMAV Unidad Monterrey a la Dra. Margarita Sánchez y M.C. Ana Pinilla.

De la University of Medicine and Pharmacy of Craiova al E.MCP. Gabriel Văcaru.

De la Facultad de Ciencias Biológicas UANL a la Dra. Minerva Bautista.

Un agradecimiento especial a Alexis Silva y a Martha Salazar, por su apoyo emocional durante mi estancia en monterrey.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Subtipos en CaMa	1
1.2. Respuesta al tratamiento.....	2
1.3 Terapia con genes inductores de muerte celular	6
1.4. Vectores de transfección en terapia génica.....	9
1.5. Nanopartículas	13
1.6. Diseño del nanosistema	16
1.7. Terapias dirigidas.....	20
II. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN.....	23
III. JUSTIFICACIÓN.....	24
IV. OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo general.....	25
4.2. Objetivos específicos	25
V. MATERIAL Y MÉTODOS	26
5.1. Esquema general de trabajo.....	26
5.2. Materiales	27
5.3. Síntesis de nanopartículas de magnetita.....	29
5.4 Caracterización de las nanopartículas.....	31
5.5 Evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas	33
5.6 Conjugación de MNPs-PEI + ADN	36
5.7 Análisis estadístico	40
VI. RESULTADOS	41
6.1. Síntesis de las nanopartículas de magnetita	41
6.2. Funcionalización de MNPs con PEG	42
6.3. Funcionalización de MNPs con CS	43
6.4. Funcionalización de MNPs con PEI	44
6.5. Caracterización con SEM	45
6.6. Caracterización de tamaños con DLS.....	49
6.7. Caracterización de potencial Z con DLS	54
6.8. Citotoxicidad de nanopartículas (MTT).....	56
6.9. Citotoxicidad nanopartículas (HyE).....	61

6.10. Pruebas de hemólisis	64
6.11. Resumen de las características de los nanosistemas	67
6.12. Adhesión de ADNp EN M-PEI	67
6.13. Adhesión de M-PEI con aptámero	70
6.14. Adhesión de M-PEI con ADNp y aptámero	71
VII. DISCUSIÓN.....	73
VIII. CONCLUSIONES	79
Referencias.....	80
Anexo 1: Síntesis de nanopartículas de magnetita	95
Anexo 2: Recubrimiento de nanopartículas de magnetita con PEG/Tween 80.....	96
Anexo 3: Recubrimiento de MNPs con CS/Tween 80	97
Anexo 4: Recubrimiento de MNPs con PEI.....	98
Anexo 5: Preparación de las muestras para análisis FT-IR	99
Anexo 6: Preparación de las muestras para análisis DLS	100
Anexo 7: Medios de cultivo para bacterias	101
Anexo 8: Mini Prep.....	103
Anexo 9: Caracterización del plásmido con enzimas	106

ÍNDICE DE TABLAS

1. Subtipos inmunohistoquímicos en CaMa.....	2
2. Caracterizaciones realizadas.....	31
3. Diseño de experimentos conjugación de ADNp + nanopartículas.....	37
4. Diseño de experimentos conjugación de M-PEI + aptámero.....	38
5. Diseño de experimentos conjugación de M-PEI + aptámero + ADNp.....	39
6. Características de aglomeración.....	53
7. Potenciales Z de las nanopartículas evaluadas.....	55
8. Resumen de las características de los nanosistemas.....	67

INDICE DE FIGURAS

1. Señalización de la activación de HER2.....	4
2. Señalización de TRAIL.....	8
3. Vectores en terapia génica.....	11
4. Terapia con genes inductores de muerte utilizando nanopartículas dirigidas.....	21
5. Esquema general de trabajo.....	26
6. Nanosistema propuesto en el presente trabajo.....	27
7. Espectros de las nanopartículas de magnetita.....	42
8. Espectros FTIR de magnetita recubierta con PEG 3350-Tween 80.....	43
9. Espectros FTIR de magnetita recubierta con CS-Tween 80.....	44
10. Espectros FTIR de magnetita recubierta con PEI.....	45
11. SEM de las nanopartículas de magnetita.....	46
12. SEM de magnetita recubierta con PEG 3350-Tween 80.....	47
13. SEM de magnetita recubierta con CS-Tween 80.....	48
14. SEM de magnetita recubierta con PEI.....	49
15. Tamaños de nanopartículas de magnetita por DLS.....	50
16. Tamaños de nanopartículas de magnetita por DLS.....	51
17. Tamaños de nanopartículas de magnetita por DLS.....	52
18. Tamaños de nanopartículas de magnetita por DLS.....	53
19. Estudios de citotoxicidad magnetita.....	56
20. Estudios de citotoxicidad magnetita recubierta con PEG.....	57
21. Estudios de citotoxicidad magnetita recubierta con CS.....	58
22. Estudios de citotoxicidad magnetita recubierta con PEI diferentes relaciones.....	59
23. Estudios de citotoxicidad magnetita recubierta con PEI 4:3.....	60
24. Imágenes 40x de HyE de células expuestas a nanopartículas de magnetita.....	61
25. Imágenes 40x de HyE de células expuestas a nanopartículas de M-PEG.....	62
26. Imágenes 40x de HyE de células expuestas a nanopartículas de M-CS.....	62
27. Imágenes 40x de HyE de células expuestas a nanopartículas de M-CS.....	63
28. Pruebas de hemólisis nanopartículas de magnetita.....	64
29. Pruebas de hemólisis nanopartículas M-PEG.....	65
30. Pruebas de hemólisis nanopartículas M-CS.....	66
31. Pruebas de hemólisis nanopartículas M-CS.....	66
32. Gel de digestión del plásmido pTracer/TRAIL.....	68
33. Gel de adhesión de ADNp a M-PEI.....	70
34. Gel de adhesión de ADNp a M-PEI.....	71
35. Gel de adhesión de ADNp a M-PEI y a aptámero.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNp	ADN plasmídico
CaMa	Cáncer de mama
CS	Quitano
ER	Receptor de Estrógenos
HER2	Receptor de Factor de Crecimiento Epidermal 2
MNPs	Nanopartículas magnéticas
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PR	Receptor de Progesterona

RESUMEN

M.C. Jorge Alberto Roacho Pérez

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: Diseño, construcción y evaluación in vitro de un nanosistema magnético para la inducción génica de apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama HER2+

Número de páginas: 121

**Candidato para el grado de Doctor en
Ciencias con Orientación en Biología
Molecular e Ingeniería Genética**

Área de estudio: Nanomedicina

Introducción: El subtipo de cáncer de mama HER2+ está asociado con una alta tasa de mortalidad. Los tratamientos actuales carecen de especificidad y producen efectos secundarios en el paciente. Es por ello por lo que se busca el desarrollo de nuevos métodos de terapia que sean específicos, como la administración del plásmido pTracer/*sTRAIL*, el cual causa apoptosis preferentemente en células cancerosas, evitando así el daño en células sanas y por lo consecuente disminuir los efectos secundarios que pudiera ocasionar. Para poder administrarlo es necesario el desarrollo de un vehículo como lo es una nanopartícula dirigida hacia la proteína de membrana HER2. La importancia del uso de nanopartículas radica en la mejora de la biodistribución del tratamiento. **Objetivos:** Diseñar, construir y evaluar la biocompatibilidad de un nanosistema dirigido contra células de cáncer de mama HER2+. **Metodología:** Se sintetizaron nanopartículas de magnetita por el método de co-precipitación química. Estas se recubrieron con PEG/Tween 80; CS/Tween 80 y con PEI. Los nanosistemas se caracterizaron para determinar la estructura cristalina con difractómetro de rayos X, la presencia de grupos funcionales con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, la morfología y tamaño de partícula por microscopía electrónica de barrido y el radio hidrodinámico así como el potencial Z por dispersión de luz dinámica. La citotoxicidad fue evaluada con la línea celular 3T3TL1 de fibroblastos de ratón por los métodos de MTT para la evaluación del metabolismo celular, tinción HyE para el análisis morfológico y medición de la hemólisis. Para las nanopartículas que cumplieron con los criterios de tamaños menores a 150 nm y potencial Z positivo se realizaron pruebas de adhesión con el plásmido pTracer/*sTRAIL* (previamente aislado y caracterizado) y con

aptámeros específicos contra HER2. **Resultados:** Se lograron obtener nanopartículas de magnetita monocristalinas con tamaños de partícula de aproximadamente 10 nm. Estas se recubrieron con éxito con los diferentes polímeros. Se caracterizaron los tamaños, formas y potencial Z de cada nanopartícula. Se determinaron las concentraciones óptimas donde las nanopartículas no ocasionaban citotoxicidad ni ruptura de glóbulos rojos. Las nanopartículas M-PEG/Tween 80 tienen tamaños aproximados de 100 nm con potencial Z negativo. Este potencial Z negativo evita que el ADNp se adhiera en la superficie por lo que hace de estas nanopartículas no funcionales para la aplicación que se buscaba. Las microesferas formadas M-CS/Tween 80 tienen tamaños aproximados de 1.4 μm , por lo que su tamaño no las hace óptimas para ser endocitadas por las células. Por lo tanto, esta segunda estructura tampoco es apta para la aplicación que se busca. Las nanopartículas que lograron todas las características deseadas fueron las nanopartículas de magnetita recubiertas con PEI. El plásmido pTracer/sTRAIL y el aptámero específico contra HER2 fueron unidos a las nanopartículas M-PEI con éxito. Se determinó la concentración óptima de nanopartículas, ADNp y aptámero donde la nanopartícula era saturada por completo por los ácidos nucleicos. **Conclusiones:** Se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron tres diferentes nanosistemas, siendo M-PEI el de las características requeridas para considerarse como vehículo para la administración de terapia génica dirigida contra HER2. Como perspectivas queda pendiente su evaluación *in vitro* en cultivos de células cancerosas.

Firma del asesor

Dra.C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CaMa) es una de las neoplasias malignas más frecuentes en México y el mundo. Los datos más recientes del INEGI y la OMS indican que en 2015 el cáncer provocó 8.8 millones de defunciones a nivel mundial, siendo la primera causa de mortalidad en todo el mundo, donde el CaMa se encuentra en quinto lugar con 571,000 muertes. En México, el CaMa representa la primera causa de mortalidad por tumores malignos en mujeres de 20 años y más (1). Una de las principales causas de la alta mortalidad por cáncer es la limitación de los tratamientos actuales, los cuales no son específicos sobre células cancerosas provocando en las pacientes efectos secundarios, por lo cual es importante mejorar los esquemas de tratamiento.

1.1. Subtipos en CaMa

El CaMa es una enfermedad heterogénea en cuanto a fenotipos y respuesta al tratamiento. Existen diferentes formas de clasificar al CaMa, una de las más utilizadas es la clasificación por inmunohistoquímica. En esta clasificación se busca la presencia de los marcadores de membrana: Receptor de Estrógenos (ER), Receptor de progesterona (PR) y Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2 (HER2) (2). La clasificación de los subtipos por inmunohistoquímica, así como su respuesta a los tratamientos actuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Subtipos inmunohistoquímicos en CaMa (2).

Subtipo	Receptores	Pronóstico
Luminal A+	ER+ PR+ HER2-	Bueno
Luminal B+	ER+ PR+ HER2+	Intermedio
HER2+	ER- PR- HER2+	Pobre
Triple Negativo	ER- PR- HER2-	Pobre

1.2. Respuesta al tratamiento

La clasificación del tipo de CaMa es un factor determinante para la decisión terapéutica. El buen pronóstico, es decir altas posibilidades de que la paciente sobreviva la enfermedad, de los subtipos luminal A y luminal B se debe a la respuesta hacia las actuales terapias hormonales, dirigidas a los receptores hormonales ER y PR. Los subtipos HER2+ y el triple negativo (los cuales representan alrededor del 30% de los casos) son los de peor pronóstico (bajas posibilidades de que la paciente se recupere de la enfermedad) al tratarse con quimioterapia, la cual resulta con efectos secundarios graves en las pacientes. Entre los efectos secundarios existen posibilidades de aparición de malignidades secundarias, cardiotoxicidad e infertilidad. Mientras que en el subtipo de CaMa triple negativo no se conoce un marcador de membrana específico, en el caso de HER2+ existe una sobreexpresión de la proteína de membrana HER2, lo cual se considera para el desarrollo de terapias dirigidas que pudieran mejorar el pronóstico de la enfermedad (3).

De los tratamientos actuales contra cáncer, el más eficaz es el uso de fármacos (4). Éste se ha preferido sobre otras terapias porque tienen una eficacia superior para matar células cancerosas, usualmente por inhibición de la replicación o inducción de apoptosis (4,5). A pesar de su eficiencia contra células cancerosas, los fármacos causan graves efectos secundarios en pacientes, debido a que estos actúan también sobre células sanas (2) y tejidos como la médula ósea, las células epiteliales y los folículos capilares (6). Las limitaciones del uso de fármacos incluyen falta de especificidad del tratamiento, biodisponibilidad reducida, depuración sanguínea rápida y baja solubilidad. Otras limitaciones importantes son la resistencia del paciente y reaparición de la enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar tratamientos eficientes que puedan ofrecer menos efectos secundarios en comparación con las terapias actuales (7).

1.2.1. Tratamiento del subtipo HER2+

El subtipo HER2+ carece de la expresión de ER y de PR, y por el contrario cuenta con una sobreexpresión de la proteína HER2. HER2 es una glicoproteína transmembranal, mediadora de la activación de vías intracelulares que conducen a la proliferación celular y su sobreexpresión desencadena características oncogénicas, como elevada tasa de proliferación, migración celular, pérdida de apoptosis y diseminación metastásica. Esta sobreexpresión se ha documentado en el 15 al 20% de las pacientes de CaMa en etapas tempranas (2). Este fenotipo se encuentra asociado con un comportamiento agresivo, metástasis en vísceras y cerebro, así como una esperanza de supervivencia baja aun en etapas tempranas (8). En la Figura 1 se observa la señalización de la proteína de membrana HER2.

Se observa que la activación de la proteína de membrana HER2 se da por los ligandos extracelulares, activando los segundos mensajeros como la proteína Ras, la Fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y proteínas AKT. Estos segundos mensajeros promueven la expresión génica de genes involucrados en proliferación, supervivencia celular, metástasis y angiogénesis. La sobreexpresión de HER2 culmina en la promoción de proliferación tumoral (9).

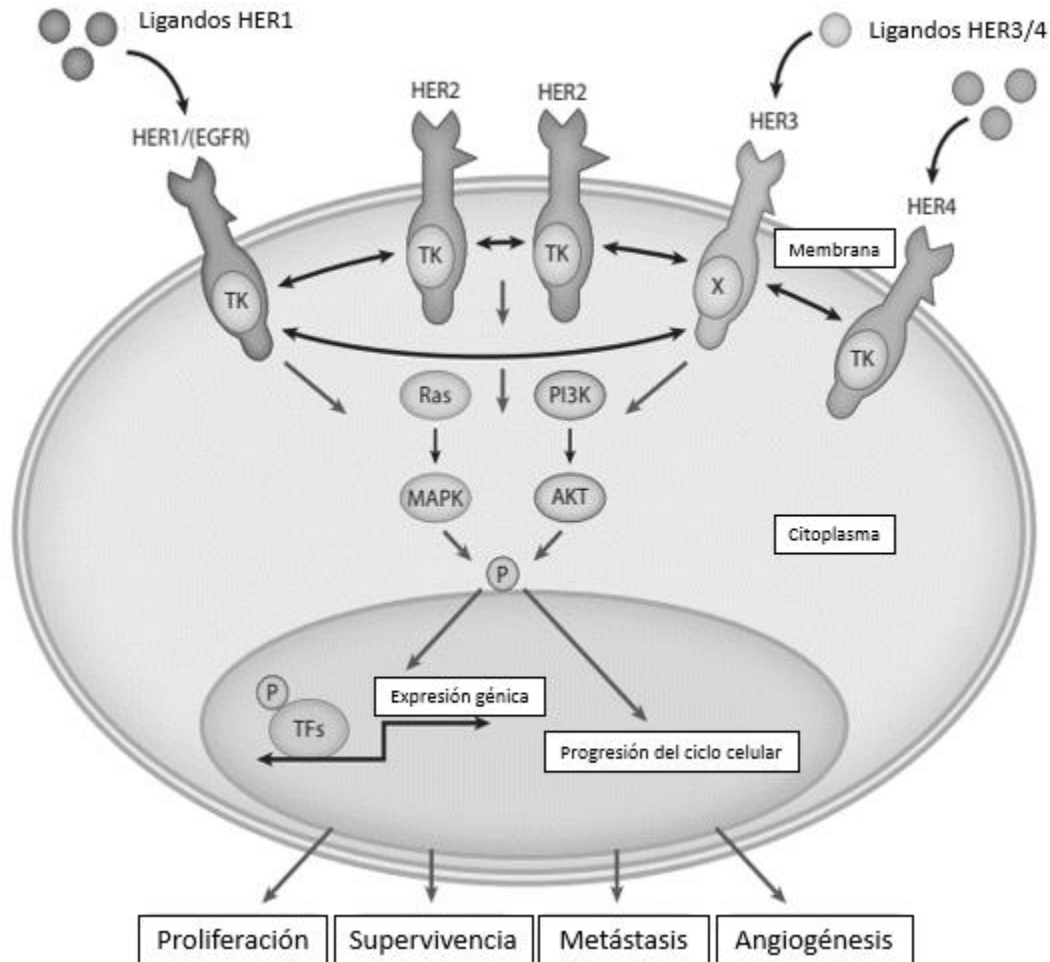


Figura 1. Señalización de la activación de HER2 (9). Al haber una sobreexpresión de HER2 hay una mayor activación de los segundos mensajeros Ras, PI3K, MAPK y AKT. Estos segundos mensajeros

generan promotores o factores de transcripción (TFs) que promueven la expresión génica de genes involucrados en proliferación, supervivencia celular, metástasis y angiogénesis.

El tratamiento contra CaMa HER2+ más utilizado, es la administración de quimioterapia con fármacos de la familia de las antraciclinas y ciclofosfamidias. Estos fármacos se unen al ADN e impiden su replicación, causando la muerte en las células cancerosas. Sin embargo, existe la posibilidad de reaparición de la enfermedad debido a la supervivencia de células cancerosas, además de que existen casos de resistencia al tratamiento por parte del paciente. Este tipo de tratamientos quimioterapéuticos no son dirigidos hacia células cancerosas, sino que atacan a células sanas y enfermas sin discriminación, produciendo efectos secundarios en el paciente debido a la alta toxicidad inespecífica (2).

Debido a los efectos secundarios, como alternativa al uso de quimioterapia, surge el desarrollo de la terapia dirigida con trastuzumab. Las terapias dirigidas en cáncer consisten en el desarrollo de agentes terapéuticos que sean específicos a receptores moleculares en la membrana celular del tejido canceroso. En el caso del CaMa HER2+ la molécula blanco es la proteína HER2. Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a HER2 y bloquea la señalización proveniente del exterior. El uso de este anticuerpo ha mejorado en la mayoría de los pacientes el tratamiento quimioterapéutico. Sin embargo, no todos los pacientes responden a este tratamiento, debido a que muchos generan resistencia debido a la subexpresión y sobreexpresión de diferentes genes. En algunas pacientes, incluso, se han presentado problemas de cardiotoxicidad

(3,10,11). Es por ello por lo que existe la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos eficientes que disminuyan o eliminen los efectos secundarios en comparación a las terapias actuales. Durante años recientes se ha trabajado en el desarrollo de tecnologías terapéuticas alternativas, basadas en la investigación y aplicación de la nanotecnología y la biología molecular (4,5,12,13).

1.3 Terapia con genes inductores de muerte celular

El desarrollo de la biología molecular permite la aplicación de técnicas de manipulación de ácidos nucleicos en el tratamiento de varias enfermedades incluyendo cáncer. La terapia génica consiste en la transferencia de material genético con efecto terapéutico al núcleo de una célula. Este material genético puede ser ADN o ARN, la secuencia genética completa, segmentos génicos o un oligonucleótido. Según los diferentes objetivos de la terapia génica del cáncer, existen dos clasificaciones principales: la terapia génica correctiva y la terapia génica inductora de muerte. La terapia génica correctiva desactiva los oncogenes o activa los genes supresores de tumores, restaurando las funciones celulares normales. La terapia génica inductora de muerte celular (14) no tiene como objetivo convertir las células cancerosas en células sanas, sino activar la muerte de los tejidos cancerosos mediante la activación de diferentes vías celulares de apoptosis o activación de células del sistema inmunológico (15).

La terapia génica inductora de muerte consiste en la destrucción de células tumorales a través de la transfección con ADN, generalmente ADN plasmídico (ADNp) (15), que contiene un gen que produce una proteína que induce la muerte

de las células cancerosas. Hay varias ventajas de usar ADNp frente a la proteína misma; la obtención de ADNp es menos costosa y requiere poco tiempo incluso para su producción a gran escala; el plásmido no desencadena una respuesta inmune; y las células tumorales no desarrollan resistencia al ADNp. Los plásmidos utilizados son moléculas de ADN circulares bicatenarias, y pueden replicarse y transcribirse una vez dentro del núcleo celular. El plásmido para esta aplicación necesita tener en su secuencia un promotor de transcripción eucariota, como CMV, SV40, AFPS o AFPL, para producir proteínas en células de mamíferos. Con el uso de enzimas modificadoras de ADN, como las enzimas de restricción y las ligasas, la secuencia del gen inductor de muerte puede agregarse al plásmido comercial. En el diseño de estos plásmidos se puede incluir genes reporteros como la secuencia que codifica a la proteína verde fluorescente (GFP) o la proteína luciferasa para monitorear por colorimetría la expresión del plásmido (16). Una vez dentro de la célula cancerosa, este ADNp por mecanismos naturales (transcripción y traducción) produce mRNA y posteriormente una proteína. Esta proteína producto del ADNp es la que causa la muerte a la célula cancerosa. El producto proteico de la expresión de este tipo de genes causa directamente la muerte celular mediante la activación de apoptosis o necrosis (15,17).

1.3.1. TRAIL: gen inductor de muerte

Ejemplo de este tipo de genes inductores de muerte mediante apoptosis es *TRAIL*. El gen *TNFSF10*, mejor conocido como *TRAIL*, codifica una citocina que induce apoptosis preferentemente en células transformadas y tumorales, sin causar daño aparente a células normales. Esta proteína se une a varios receptores de factores

de necrosis tumoral que desencadenan la activación de caspasa 8 y caspasa 3 (18). En la Figura 2 se observa la señalización de la activación de *TRAIL* (19).

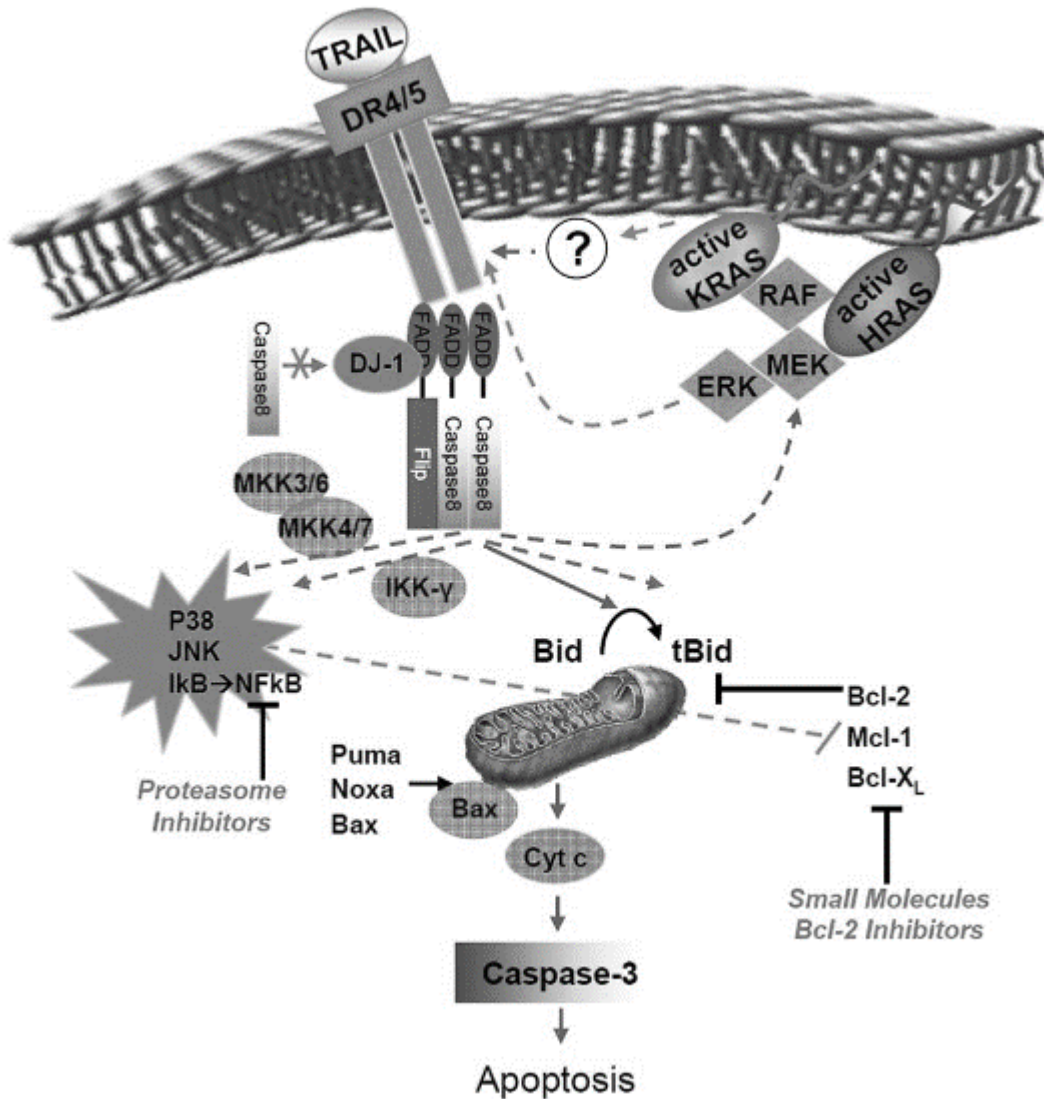


Figura 2. Señalización de TRAIL (19). Se observa que el ligando TRAIL activa al receptor de membrana DR4 o DR5. Este produce la activación de segundos mensajeros incluyendo la caspasa-3 la cual produce apoptosis.

1.3.2. Retos de la terapia con genes inductores de muerte

El uso de terapia génica inductora de muerte es una estrategia poco estudiada, sin embargo, es reportada como exitosa a nivel *in vitro* (15). Existe evidencia de estudios *in vitro* e *in vivo* de la eficiencia de esta técnica (14). En enero del 2015, el 7.7% de todos los protocolos experimentales aprobados para investigación en humanos en el mundo estaban enfocados al desarrollo de terapia con genes inductores de muerte, siendo el número más alto de proyectos de las demás variantes de terapia génica (17). A pesar del éxito de la investigación en etapa preclínica de estas terapias, aún no se han conseguido resultados significativos en la etapa clínica (20). Desde los primeros experimentos con genes inductores de muerte en 1984, sólo 45 protocolos han llegado a fase clínica de experimentación III, sólo uno a fase IV, y ninguno ha sido aprobado para la clínica. Uno de los puntos clave para la mejora de esta terapia, y así poder llevarla a la clínica, es evitar la expresión de los genes inductores de muerte en tejidos sanos (17). Existen dos estrategias para evitar toxicidad en tejido sano. La primera es utilizar genes cuyos productos proteicos sólo afecten a las células cancerosas, como ocurre con el gen *TRAIL*. La segunda estrategia es el uso de vectores de transfección que sean dirigidos, es decir, que reconozcan exclusivamente a las células cancerosas, y dirijan la terapia hacia éstas, sin dañar los tejidos sanos (14).

1.4. Vectores de transfección en terapia génica

La introducción de ADNp en las células tumorales ha sido un desafío para el desarrollo de esta terapia. A pesar de los buenos resultados presentados en sistemas *in vitro*, la administración de ADNp *in vivo* no es eficiente puesto que el

ADNp posee una vida media corta en la circulación sanguínea, debido a la degradación causada por las nucleasas circulantes en plasma sanguíneo. La eliminación rápida hace que no esté disponible para la aplicación intravenosa en la clínica. Otra propiedad del ADNp es su alta carga negativa, igual que la membrana celular, que disminuye la efectividad de la transfección por simple difusión pasiva debido a la repelencia de las cargas eléctricas, imposibilitándole atravesar epitelios y membranas celulares para ser endocitada por la célula cancerosa (21,22). Estos inconvenientes se resuelven con un vector de transfección. Un vector de transfección es una estructura que funciona como un vehículo que transporta ADN a través de la circulación sanguínea protegiéndolo, y lo distribuye hasta que una célula lo endocita (5). Los vectores de transfección utilizados en terapia génica se catalogan en dos grupos: vectores virales y vectores no virales. como se muestra en la Figura 3 (23).

1.4.1. Vectores virales

Los vectores virales fueron los primeros en ser utilizados como vector de transfección en terapia génica. Hasta el año 2012, se aprobaron en el mundo 1,714 protocolos experimentales para investigación en humanos sobre terapia génica. De estos protocolos aproximadamente el 70% involucraban el uso de vectores virales debido a su alta tasa de transfección. Estos vectores consisten en un virus, generalmente adenovirus, retrovirus, virus adenoasociados, lentivirus o virus herpes simple. La estructura de un virus consiste en un genoma rodeado por una capa proteica. Para la replicación viral, el virus necesita insertar su material genético en una célula huésped para usar la máquina de replicación y transcripción del huésped.

Para construir el vector viral, a estos virus se les extrae su material genético virulento, remplazándolo por el material genético terapéutico que se desea incorporar a la célula diana, haciéndolo inofensivo. La eficacia de la transfección de los virus es superior a la de otros métodos, pero existen varias desventajas, como el reconocimiento inmunitario de la mayoría de los virus, la interacción mutagénica de retrovirus y lentivirus y la toxicidad inflamatoria del adenovirus, lo cual es un riesgo para el paciente (5,20).

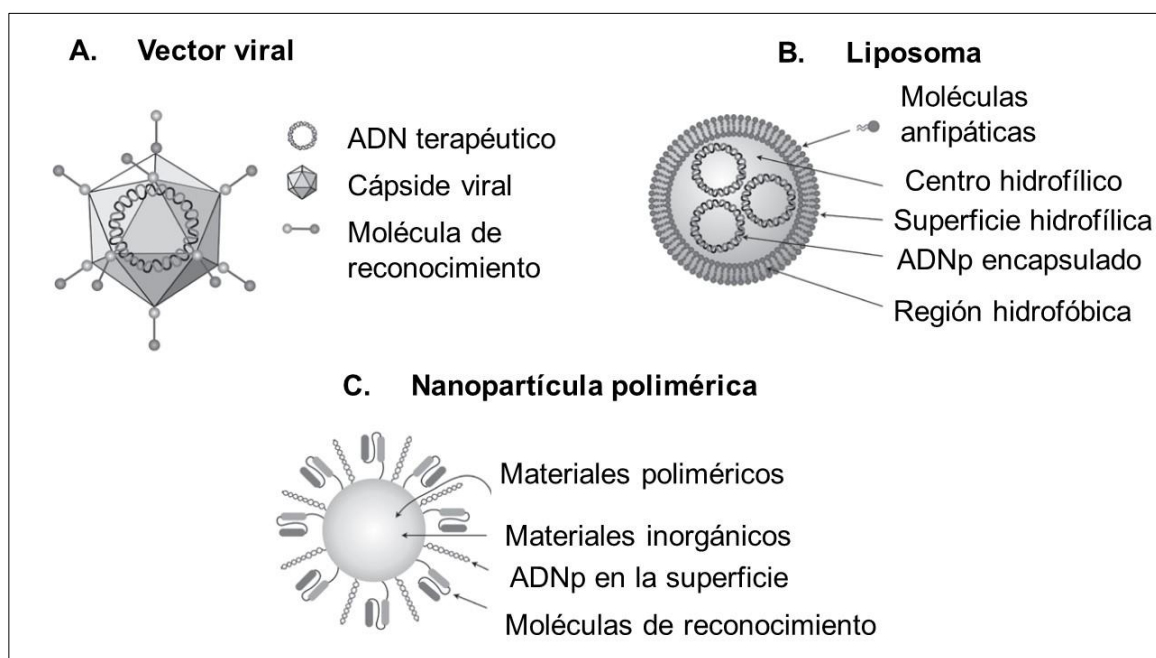


Figura 3. Vectores en terapia génica (24). Se describen los componentes de los vectores virales (A) y no virales (B y C) comúnmente utilizados en terapia génica (24).

1.4.2. Vectores no virales

Una alternativa a los vectores virales es el desarrollo de vectores no virales. Estos se dividen en tres categorías: ADN desnudo, métodos físicos y nanopartículas catiónicas.

- El ADN desnudo se administra normalmente en forma de plásmido. Sin embargo, la internalización celular de éste es baja, además de que es degradado rápidamente por las nucleasas en sangre.
- Los métodos físicos como métodos hidrodinámicos, “gene gun” y electroporación tienen buenos resultados *ex vivo*, aumentando la eficiencia de transfección del material genético. Sin embargo, aún tienen que ser perfeccionados debido al daño que generan *in vivo* (20).
- Las nanopartículas son vectores basados en principios químicos y tienen propiedades que los convierten en un vector prometedor para la transfección de ADNp. Una característica esencial es que las nanopartículas utilizadas posean carga de superficie catiónica. El ADNp tiene carga negativa, por lo que las nanopartículas catiónicas generan interacciones de atracción electrostática con ADNp. El ADNp y las nanopartículas catiónicas interactúan por fuerzas de atracción, y el ADNp se carga en la superficie de las nanopartículas creando un complejo. Este complejo se toma fácilmente dentro de la célula en comparación con el ADNp desnudo. Otra característica del ADNp unido a las nanopartículas es la protección contra la degradación por las nucleasas sanguíneas, mejorando la biodisponibilidad del agente terapéutico (25,26).

1.5. Nanopartículas

La nanotecnología se define como el diseño, la fabricación y la aplicación de nanopartículas. Al menos una de sus dimensiones debe estar en la escala nanométrica para ser considerado un nanomaterial. Por lo tanto, los nanomateriales se pueden formar de unos pocos cientos a millones de átomos. Debido a su pequeño tamaño, las propiedades de las nanopartículas varían de su forma de bulto. Se pueden controlar diferentes características químicas, físicas y biológicas, únicas en nanopartículas, durante su síntesis para utilizarlas en aplicaciones biomédicas. Varias propiedades fisicoquímicas hacen de las nanopartículas una herramienta prometedora en medicina, tales como el tamaño, la forma, la carga superficial, las interacciones hidrofílicas, el magnetismo y las características eléctricas, así como la falta de capacidad para producir una reacción inmunológica indeseable (27).

La implementación más reciente de vectores en terapia génica es el uso de nanopartículas poliméricas o inorgánicas, que tienen propiedades biológicas y fisicoquímicas (forma, tamaño, carga superficial y tasa de biodegradación) que les permiten transportar el ADNp a la célula tumoral. Las nanopartículas catiónicas son más seguras para el paciente en comparación con los vectores virales, pues están sintetizadas con materiales biocompatibles que son fáciles de sintetizar, manipular y caracterizar (5). La función de estas nanopartículas es proteger al material genético de la degradación y conducirlo a las células diana (5,18,20). Sin embargo, incluso cuando hay antecedentes sobre el uso de nanopartículas en la clínica, no hay protocolos clínicos aprobados para muerte inducida (o programada) por terapia génica. Desde 1995, la FDA aprobó el uso de algunas nanopartículas por

administración oral, local, tópica y sistémica para tratamiento para el cáncer. Estas son estructuras que llevan un agente quimioterapéutico a través de todo el cuerpo del paciente (28). A pesar de la falta de estudios clínicos de nanopartículas en terapia génica, hay evidencia de la eficiencia preclínica de estos nanosistemas (29–32). Las empresas tienen un interés comercial en la producción de nanopartículas, debido a su fácil producción a gran escala. Las técnicas más eficientes para la producción a gran escala de nanopartículas de grado farmacéutico son emulsificación, difusión de solventes y precipitación química. Estas técnicas permiten la formación de partículas de forma y tamaño uniforme y controlada (33). Según su composición se pueden dividir en liposomas, nanopartículas inorgánicas y nanopartículas poliméricas.

1.5.1. Liposomas

Hasta el 2012, de los 1,714 protocolos experimentales de investigación en humanos sobre terapia génica, el 6.4% involucraba el uso de liposomas, siendo estos las nanopartículas más utilizadas. Los liposomas son vesículas formadas por una bicapa lipídica de fosfolípidos anfifílicos. Los liposomas tienen una excelente capacidad de transfección in vitro, sin embargo, tienen algunas deficiencias in vivo debido a su alta carga positiva. Esta alta carga positiva induce hemotoxicidad que es causada por los agregados producidos debido a la interacción entre liposomas y proteínas sanguíneas. También, estos agregados promueven una baja tasa de transfección. Otros problemas con los liposomas es que son de baja estabilidad, problemas con la producción a nivel industrial y dificultades en la esterilización (20).

Si comparamos tanto a las nanopartículas poliméricas e inorgánicas contra los liposomas, las primeras pueden ser fácilmente modificadas para reducir los excesos de cargas positivas. Debido a ésto son consideradas por varios autores más prometedoras que los liposomas, y que los demás vectores de transfección mencionados (34).

1.5.2. Nanopartículas poliméricas

Actualmente, las nanopartículas poliméricas biodegradables son de las más estudiadas. Son estables, esterilizables, con reproducibilidad de su síntesis a gran escala, la biodegradación es controlable, poseen baja inmunogenicidad y no son tóxicas. Es importante que los polímeros que se seleccionen en la síntesis sean biocompatibles y biodegradables (5). La ventaja de usar polímeros biodegradables es su degradación controlada. Esta degradación libera el plásmido en el citoplasma celular una vez que el nanosistema está dentro de la célula. La propiedad catiónica de los polímeros utilizados permite la unión del ácido nucleico a la superficie de las nanopartículas. Dentro de las ventajas de su diseño están la habilidad de encapsular al agente terapéutico, la degradación controlada al liberar el plásmido, además de excelente biocompatibilidad tanto *in vitro* como *in vivo*. También brindan gran protección a los ácidos nucleicos de la degradación por nucleasas. Se pueden utilizar polímeros naturales o sintéticos (18,35,36). Algunos ejemplos de polímeros son la albúmina (37), y los polisacáridos como quitosano (38–40) o alginato (41). Ejemplos de polímeros sintéticos utilizados son la polietilamina (PEI) (42), policaprolactona (PLC) (43), ácido poliláctico (PLA) (44), polietilenglicol (PEG) (45) o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) (44).

1.5.3. Nanopartículas inorgánicas

Las nanopartículas inorgánicas por su parte son de fácil manipulación de tamaño, forma, composición y propiedades químicas. Son fáciles de preparar, se producen a gran escala, son fácilmente funcionalizadas y tienen alto grado de transfección. Ejemplos de este tipo de nanopartículas son los nanotubos de carbono , nanopartículas de fosfatos de calcio, de oro, de sílica, y las nanopartículas magnéticas (18,35). A estas últimas, se les puede aplicar un campo electromagnético externo para dirigir de forma localizada la liberación del plásmido. Aunque se han presentado casos de éxito en estudios clínicos, se ha limitado al uso en patologías cercanas a la superficie del cuerpo, ya que la nanopartícula se internaliza en el paciente y la distancia entre el campo magnético y la nanopartícula se incrementa. En terapia génica, al proceso de dirigir ácidos nucleicos con apoyo de campos magnéticos se le conoce como magnetofección. La eficiencia de transfección aumenta al momento de aplicar un campo electromagnético externo, ya que se acelera la absorción en la superficie celular promoviendo fagocitosis (14,46).

1.6. Diseño del nanosistema

Aunque existen diferentes modelos de nanosistemas administrados en terapia génica con genes inductores de muerte, la mayoría de los nanosistemas diseñados en terapia se pueden distinguir tres elementos básicos: un plásmido recombinante con el gen inductor de muerte, una nanopartícula como vehículo, y moléculas de reconocimiento en la superficie (14). Se requiere del uso de nanopartículas catiónicas, es decir con cargas positivas en su superficie, debido a que éstas

interaccionan con las cargas negativas del ADN, inmovilizándolo sobre su superficie. Posteriormente, una vez dentro de la célula, la nanopartícula se degrada liberando el ADN terapéutico (20,26).

Debido a que el nanosistema es un cuerpo ajeno al organismo, este debe evitar ser reconocido inmediatamente por el sistema inmunológico ya que sería rápidamente desechado. El primer paso para ser desechado de circulación es la opsonización, que es la absorción de proteínas del suero, como albumina e inmunoglobulinas, sobre la superficie del nanosistema. Esta unión es producida por las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, como la carga electrostática en la superficie de nanopartículas. Una vez rodeada de estas proteínas el sistema inmunológico es capaz de reconocerlo y eliminarlo (21). Es por eso por lo que se requieren de ciertas propiedades importantes para evitar la eliminación del nanosistema en un corto tiempo y asegurar su correcto funcionamiento en la célula, mismas que son mencionadas a continuación (13):

- **Biodegradación.** Se requiere de materiales biodegradables ya que no se desea la permanencia de la nanopartícula en el sistema de manera indeterminada, sino que se degrade y sea eliminada una vez cumplida su acción. Una vez dentro del citoplasma celular se realizará una liberación controlada debido a la capacidad de biodegradación de las nanopartículas utilizadas. Al mejorar el sistema de entrega del material genético, mejora la biodisponibilidad (5,20). Los materiales seleccionados para la construcción de la nanopartícula al degradarse serán eliminados por el organismo

mediante las vías de excreción normales, o pueden ser integrados en las vías metabólicas normales de la célula. La biodegradabilidad está relacionada con la microestructura, composición e interacción con el entorno fisiológico externo. Ejemplos de estos materiales incluyen polímeros, cerámicas y compuestos (22).

- **Tamaño.** Usualmente son estructuras esféricas de escala nanométrica, de los 10 a los 100 nm (14,22,47). Se requiere de un tamaño en escala nanométrica para que el sistema pueda atravesar las barreras biológicas, tales como epitelios, siendo las nanopartículas con dimensiones menores a los 150 nm capaces de realizar tal acción. Estas dimensiones también son las óptimas para ser endocitadas por las células diana. Sin embargo, si el tamaño es demasiado pequeño, las nanopartículas son desechadas de inmediato por los riñones e hígado. Esto se ha reportado en tamaños menores de los 30 nm. Las nanopartículas con dimensiones mayores a los 30 nm no pueden pasar el filtrado glomerular por lo que permanecen en la sangre. Dentro de la escala de 30 a 150 nm, entre más pequeño sea el tamaño hay un mayor tiempo de vida en sangre, ya que las partículas más grandes son más fácilmente reconocidas por los macrófagos del sistema inmunológico (5,22). En cuanto a su excreción, una vez degradada la nanopartícula a unidades más pequeñas es filtrada por riñón, sin embargo, tamaños de 30 a 150 nm que no pueden ser filtrados, tienden a acumularse en médula ósea, corazón, riñón, hígado y estómago (5,21).
- **Interacciones con el agua.** Las nanopartículas hidrofílicas retardan el proceso de opsonización, mientras que las nanopartículas hidrofóbicas son

desechadas rápidamente por el sistema inmunológico debido a la rápida opsonización que presentan (21).

- **Carga eléctrica superficial.** La carga superficial de nanopartículas tiene que ser positiva para ser atraída con cargas negativas de la superficie de las membranas celulares. El potencial Z de las nanopartículas, que es una medida utilizada para caracterizar cargas superficiales, debe ser alrededor de +25 mV que es cuando las nanopartículas tienden a ser estables. Esto es debido a que la propia repulsión de las cargas evita los agregados. Las nanopartículas con un potencial Z muy bajo tienden a formar agregados debido a la falta de repulsión electrostática. Sin embargo, si las cargas son excesivamente positivas existe la posibilidad de problemas de hemocompatibilidad debido a la interacción con los componentes celulares sanguíneos, ocasionando hemólisis y agregación plaquetaria. Además, entre mayor sea la carga superficial más interacción con las proteínas sanguíneas, ocasionando opsonización y por ende su eliminación por el sistema inmunológico (21,47,48).
- **Pegilación.** Para poder inmovilizar los ácidos nucleicos en la superficie de las nanopartículas, éstas deben poseer una carga positiva. Una estrategia ampliamente utilizada para eliminar el exceso de cargas positivas es la funcionalización con polietilenglicol (PEG) el cual es un polímero que regula el exceso de cargas positivas en el nanosistema brindando estabilidad a los coloides en la circulación en sangre al no presentar agregados con proteínas sanguíneas, lo cual mejora la hemocompatibilidad (20,48–53).

1.7. Terapias dirigidas

Uno de los puntos clave para mejorar la terapia génica inductora de muerte es evitar la expresión de genes suicidas en tejidos sanos. El mayor desafío de los tratamientos novedosos es liberar selectivamente, de manera controlada y en un lugar específico, el agente terapéutico en los tejidos cancerosos. En enfermedades como el cáncer, las células tumorales generalmente expresan ciertas proteínas receptoras exclusivas de tejido canceroso, o sobreexpresan proteínas de membrana que se encuentran en una cantidad normal en tejidos sanos (14). Un ejemplo de estas proteínas en el CaMa es HER2 (8). Estas proteínas de membrana son fácilmente identificables por moléculas de reconocimiento como anticuerpos, aptámeros, proteínas y péptidos (54). La superficie de las nanopartículas puede funcionalizarse con estas moléculas de reconocimiento de marcadores moleculares en la superficie de las células tumorales. La unión entre la nanopartícula y la célula tumoral induce endocitosis específica, evitando la toxicidad en las células sanas (24).

Para una endocitosis selectiva es necesario, en primera instancia, administrar el nanosistema, usualmente por vía intravenosa (22). El nanosistema deberá recircular por el sistema sanguíneo, evadiendo los mecanismos naturales de eliminación de organismo, como la opsonización y la posterior fagocitosis. Por esta razón, es necesario que el nanosistema esté diseñado con las características físicas necesarias para que dure el mayor tiempo posible en circulación por sangre (21). El nanosistema tiene las propiedades para poder interactuar y atravesar los epitelios hasta llegar al tumor (22). Una vez localizado el tumor, en el esquema presentado

en la Figura 4 podemos observar el proceso celular del mecanismo de terapia con genes inductores de muerte utilizando nanopartículas dirigidas.

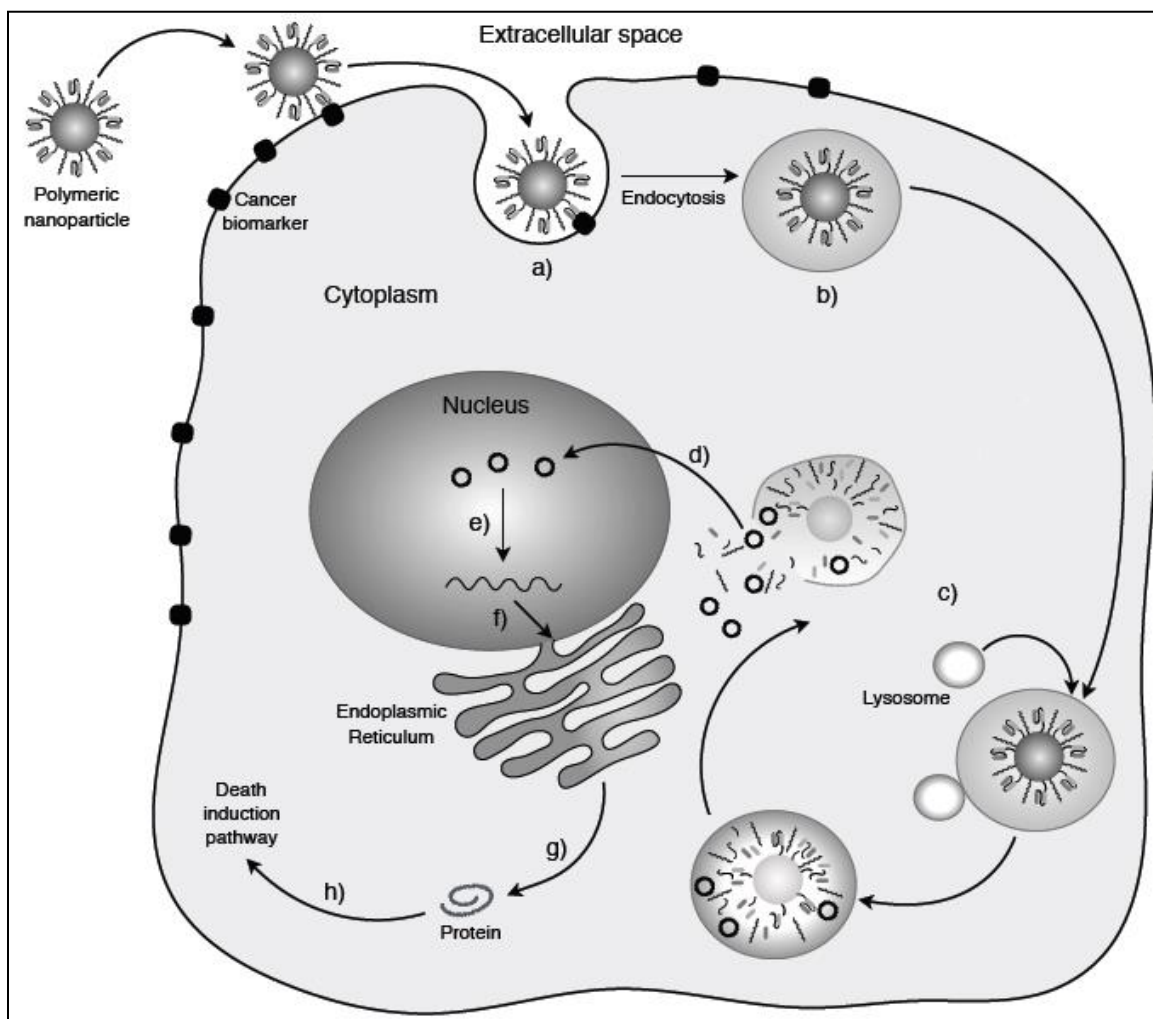


Figura 4. Terapia con genes inductores de muerte utilizando nanopartículas dirigidas (24). a) El nanosistema reconoce a la célula diana mediante la unión de la molécula de conocimiento con los receptores de membrana. b) El nanosistema se internaliza dentro de la célula en una vesícula generada por la misma membrana celular. c) La vesícula entra al sistema endosomal celular donde es degradada. El nanosistema es liberado al citoplasma donde comienza a degradarse y va liberando todos sus componentes al medio. Los residuos del nanosistema son eliminados de la célula mediante los mecanismos normales de excreción, o son incorporados a las rutas metabólicas celulares

dependiendo de su naturaleza. d) El plásmido recombinante entra al núcleo por medio de los poros nucleares. e) Una vez dentro es reconocido por el sistema de transcripción. Este plásmido contiene la secuencia del gen inductor de muerte. f) Comienza la síntesis de RNAm del gen inductor de muerte. y posteriormente sale del núcleo. g) Este es traducido a proteína. h) Estas proteínas desencadenan diferentes vías celulares terminando en apoptosis celular (24).

Una vez localizado el tejido diana, las moléculas de reconocimiento en la superficie del nanosistema identifican los marcadores moleculares de membrana del tumor generando un ligando (55). El proceso de endocitosis se lleva a cabo gracias a que el ligando genera una señal, la cual permite la endocitosis al sistema, generando una vesícula constituida a partir de la membrana plasmática. Esta vesícula que contiene al nanosistema es transportada a lo largo del sistema endosomal, donde termina en digestión, liberando los agentes terapéuticos al medio (21). Una vez que se degradó la nanopartícula, el plásmido queda libre y es transportado al núcleo donde ocurre la transcripción. El mRNA generado es llevado al citoplasma, donde es traducido por los ribosomas, terminando en una proteína citotóxica que dependiendo de su naturaleza, desencadena diversas vías apoptóticas (56). Los residuos de la degradación de las nanopartículas son eliminados o integrados en las vías metabólicas celulares (22).

II. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

En el año 2013, durante la tesis del estudiante de maestría Jesús Borrego (57) se desarrolló un plásmido recombinante que causa apoptosis en células cancerígenas en el Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la UANL. Se utilizó el plásmido comercial de expresión en mamífero *pTracer-CMV2* el cual contiene en su secuencia el gen reportero GFP. Este plásmido fue editado insertándole la secuencia de los genes apoptóticos Trail soluble e IFN β . Los datos de muerte celular fueron correlacionados con la medición de la expresión de los genes apoptóticos por rt-PCR y ELISA. Estos estudios se realizaron utilizando el agente transfectante comercial lipofectamina, el cual produce transfección *in vitro*, sin embargo, debido a una alta citotoxicidad se ha mostrado incapaz de poder ser utilizado en estudios *in vivo*. El grupo de trabajo sugiere el desarrollo de nanopartículas como un agente de transfección, el cual sea funcional tanto *in vitro* como *in vivo*.

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, las terapias hormonales utilizadas contra el CaMa funcionan en pacientes que sobreexpresan ER y PR. Sin embargo, no todos los tipos de CaMa sobreexpresan estos receptores, como es el caso del subtipo HER2+ que se presenta alrededor del 15 al 20% de los casos. Este subtipo de CaMa es tratado con quimioterapia o con quimioterapia en combinación con MAb. Estas terapias no son eficaces en todas las pacientes, pues algunas tienden a recaídas por la reaparición de la enfermedad, muestran resistencia al tratamiento o sufren de efectos secundarios adversos como infertilidad, cardiopatías y malignidades secundarias. Es debido a estas circunstancias por las que se propone trabajar en el desarrollo de terapias alternativas hacia el CaMa HER2+. Una forma alternativa al tratamiento con fármacos es el uso de nanosistemas. Estos sistemas son diseñados con diferentes elementos estructurales que les confieren la habilidad para hacer distinción entre células sanas y células enfermas. Este reconocimiento se basa en el uso de moléculas de reconocimiento sobre la superficie del nanosistema. En este tipo de nanosistemas las células cancerosas ejercen un ligando con los nanosistemas, y posteriormente mediante endocitosis mediada por ligando, los nanosistemas se internalizan en el citoplasma celular. Una vez dentro de la célula, los nanosistemas ejercen su efecto terapéutico contra el tejido canceroso. El uso de estos nanosistemas promete mejorar la eficiencia de los tratamientos actuales, mejorar la calidad de vida de los pacientes disminuyendo los efectos secundarios, y posiblemente a largo plazo la disminución de la mortalidad de la enfermedad.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Desarrollar y evaluar *in vitro* un nanosistema MNPs@polímero funcionalizado con pTracer/*sTRAIL* y un aptámero dirigido contra células de CaMa HER2+.

4.2. Objetivos específicos

1. Diseñar, sintetizar y caracterizar las propiedades físicas del nanosistema compuesto por nanopartículas de magnetita (MNPs) recubiertas con PEG, CS y PEI.
2. Caracterizar la citotoxicidad *in vitro* de las MNPs y nanosistema.
3. Optimizar la inmovilización del plásmido pTracer/*TRAIL* y de un aptámero sobre la superficie del nanosistema.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Esquema general de trabajo

En la Figura 5 se muestra el esquema general de trabajo y en la Figura 6 se representa el nanosistema propuesto. Este proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y el Hospital Universitario José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el número de registro de BI17-00001. Todos los donadores humanos fueron tratados de acuerdo con los estándares éticos.

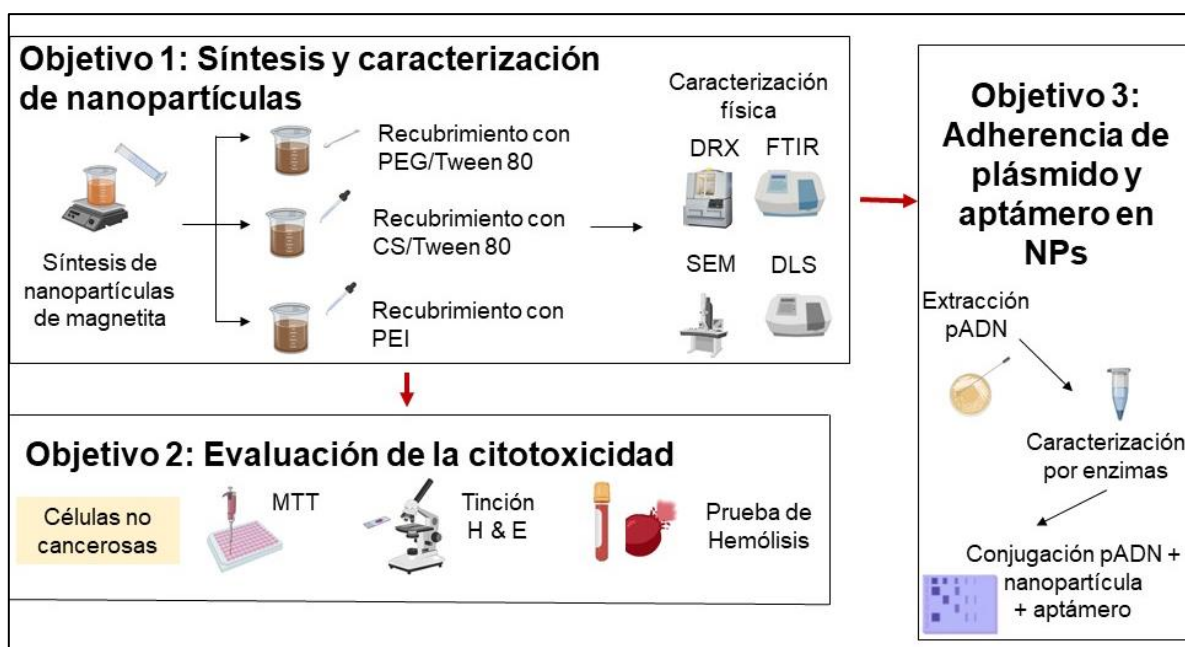


Figura 5. Esquema general de trabajo. Se ilustra el esquema metodológico por objetivos.

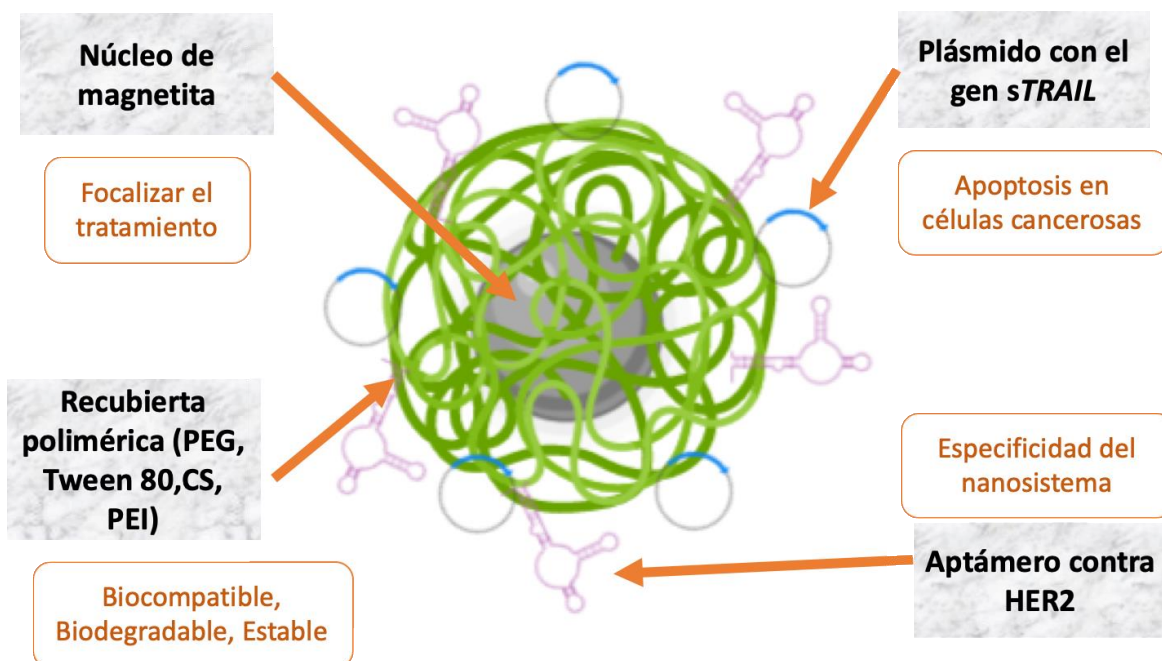


Figura 6. Nanosistema propuesto en el presente trabajo. Se especifica cada uno de sus componentes: un núcleo de magnetita, una recubierta polimérica, un plásmido pTracer/TRAIL en la superficie, así como un aptámero específico contra HER2.

5.2. Materiales

5.2.1. Equipos

Los equipos especiales utilizados fueron:

- Procesador ultrasónico (Fisher Scientific)
- Difractómetro de rayos X (XDR D2 PHASER, Bruker)
- Espectroscopio Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR NICOLET 6700, Thermo Fisher Scientific)
- Microscopio electrónico de barrido (FE-SEM SU5000, HITACHI)
- Microscopio electrónico de barrido (SEM JSM-7000F, JEOL)

- Equipo de Dispersión Dinámica de Luz (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments)
- Equipo de Dispersión Dinámica de Luz (Nanotrack Wave II, Microtrac)
- Espectroscopio Uv-Vis (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific)
- Lector de ELISA (Cytation 3 lector de imágenes, Bio Tek)
- Microscopio óptico (Microscopio Invertido CKX41, Olympus)
- Cámara de electroforesis horizontal (Accesolab)
- Campana de cultivo nivel II de bioseguridad (Labconco)
- Incubadora de CO₂ (VWR)
- Pipetas automáticas de diferentes volúmenes 2 µl -1 ml (Eppendorf)
- Fotodocumentador (UVP)

5.2.2. Material de laboratorio

Los materiales especiales utilizados fueron:

- Celdilla Universal (ZEN 1002, Malvern Instruments)
- Tubo heparinizado (Becton Dickinson)

5.2.3. Reactivos

Los reactivos especiales utilizados fueron:

- Cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃·6H₂O, Thermo Fisher Scientific)
- Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄·7H₂O, Thermo Fisher Scientific)
- Hidróxido de amonio (NH₄OH, CTR Scientific)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich)

- PEG 3350 (Thermo Fisher Scientific)
- Quitosano de peso molecular medio (Sigma-Aldrich)
- Ácido acético glacial (Thermo Fisher Scientific)
- PEI 25 kDa (Sigma-Aldrich)
- Ácido cítrico (Sigma-Aldrich)
- DMEM (Thermo Fisher Scientific)
- Suero fetal bovino (Thermo Fisher Scientific)
- Penicilina-Estreptomicina (Thermo Fisher Scientific)
- MTT (Sigma-Aldrich)
- Kit de proliferación celular I (Roche)
- Aptámero comercial dirigido contra HER2 (IDT)

5.2.4. Material Biológico

- Cultivo primario de células madre mesenquimales (Donadas por Laboratorio de Terapia Celular, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, UANL)
- Línea celular 3T3L1 (ATCC)
- Cepa de *Escherichia coli* Top 10 portadora de plásmido pTracer/*TRAIL*
- Sangre heparinizada

5.3. Síntesis de nanopartículas de magnetita

Las nanopartículas de magnetita se sintetizaron mediante coprecipitación química basándonos en la metodología modificada de Chapa-González (58). La

metodología a detalle se encuentra en Anexo 1. Se utilizaron dos soluciones precursoras: 100 ml de cloruro férrico hexahidratado 0.01 M y 100 ml de sulfato ferroso heptahidratado 0.05 M. Se añadió por inyección rápida 100 ml de hidróxido de amonio. El aumento del pH en el medio propició la precipitación de las nanopartículas de magnetita.

5.3.1. Funcionalización de las MNPs con PEG/Tween 80

Debido a que PEG tiene dos grupos hidroxilo en sus extremos, este puede adherirse a casi cualquier estructura (59). Según varios autores, el recubrimiento de las nanopartículas magnéticas con PEG mejora su circulación sanguínea y su biocompatibilidad; reduce su carga superficial sin afectar sus propiedades magnéticas (59–61). Tween 80 también se ha propuesto para el suministro de medicamentos a células cancerosas, se ha utilizado como un recubrimiento para nanopartículas metálicas, y es ampliamente utilizado en cosméticos, alimentos y farmacia (62). La metodología a detalle se encuentra en Anexo 2. Se dispersaron las nanopartículas de magnetita con PEG (1:1 v/v) en una solución de Tween 80 al 7%. El pH se ajustó hasta alcanzar un pH de 9 y posteriormente se llevó a pH 7.

5.3.2. Funcionalización de las MNPs con CS/tween 80

El quitosano, el cual es obtenido después de la desacetilación alcalina de la quitina, es un polisacárido policatiónico natural sensible al pH. Algunas propiedades atractivas del quitosano son su bajo costo, carga catiónica, biocompatibilidad y estabilidad química (77). La metodología a detalle se encuentra en Anexo 3. Se dispersaron las nanopartículas de magnetita en una solución Tween 80 al 7%. Se

agregó por goteo una solución de CS en ácido acético. El pH se ajustó con hidróxido de amonio hasta que alcanzó un pH de 5.5 para inducir la protonación del CS.

5.3.3. Funcionalización de las MNPs con PEI

Uno de los polímeros catiónicos más utilizados para la transfección de genes *in vitro* es la polietilenimina (PEI), ya que esta posee una alta carga positiva, la cual se conjuga con la carga negativa del ácido nucleico a transfectar. La metodología a detalle se encuentra en Anexo 4. La funcionalización con PEI se basa en la modificación de la metodología de Megías (63). La funcionalización se realizó en una relación 4:3 peso-peso de nanopartículas de magnetita/PEI. Se dispersaron las nanopartículas de magnetita en una solución de ácido cítrico 0.1 N. Se ajustó el pH a 7. Se agregó 18.75 mg de PEI. Las MNPs-PEI se recuperaron atrayéndolas al fondo del vaso con un imán.

5.4 Caracterización de las nanopartículas

La caracterización de las partículas sintetizadas se realizó mediante cuatro técnicas, las cuales se resumen en la siguiente tabla y se describen a continuación:

Tabla 2. Caracterizaciones realizadas.

Técnica	Propiedad medible
Difractómetro de rayos X (DRX)	Espectro característico de la estructura cristalina
Espectroscopía infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)	Presencia de grupos funcionales característicos

Microscopio electrónico de barrido (SEM)	-Morfología de las nanopartículas
Dispersión dinámica de luz (DLS)	-Tamaño de partícula -Carga eléctrica superficial (potencial Z)

5.4.1. Caracterización con DRX

Se realizó un análisis de difracción de rayos X (DRX) para las MNPs. El patrón DRX de la muestra se registró con un detector LYNXEYE XE-T en el rango de 2θ de 10° – 90° a una velocidad de exploración de $0.05^\circ/0.5$ s empleando radiación Cu-K α ($1.5408 \text{ \AA}$). La fase formada se analizó utilizando una tarjeta JCPDS PDF número 01-088-0315 correspondiente a magnetita (Fe_3O_4). La determinación del tamaño promedio de cristal se estimó mediante la ecuación de Debye-Scherrer:

$$D = 0.9\lambda / \beta \cos(\theta)$$

En esta ecuación λ es la longitud de onda, β es la anchura máxima a la mitad del pico más intenso y θ es el ángulo de difracción del pico.

5.4.2. Caracterización con FTIR

La funcionalización de MNPs con PEG, CS y PEI se evaluó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para analizar los grupos funcionales presentes en las muestras preparadas. Las medidas se llevaron a cabo en el rango de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} . El procesamiento de las muestras se detalla en el Anexo 5.

5.4.3. Caracterización con SEM

La morfología de todas las nanopartículas y su distribución del tamaño se examinó con microscopía electrónica de barrido (SEM). Se dispersó una muestra de 3 mg de nanopartículas en 3 ml de agua ultrapura usando el procesador ultrasónico. Se extendió una gota de solución de nanopartículas en un portaobjetos cubierto con cinta de carbón. La muestra se secó a 50°C durante toda la noche. Una vez que la muestra se secó, se tomaron las micrografías.

5.4.4. Caracterización con DLS

El tamaño y potencial zeta de todas las nanopartículas se midieron con la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Las mediciones realizadas en el equipo Zetasizer Nano ZS90 se llevaron a cabo a 25 °C utilizando una celda de inmersión universal. Para evitar la aglomeración de las nanopartículas, las muestras se prepararon inmediatamente antes de su análisis. El procesamiento de las muestras se detalla en el Anexo 6.

5.5 Evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas

Para la evaluación cuantitativa de la capacidad de las nanopartículas de causar la muerte celular se realizó un ensayo MTT y la tinción de HyE.

5.5.1 Ensayo MTT

El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) es una técnica colorimétrica que evalúa la actividad metabólica de las células, específicamente la actividad de las enzimas oxidoreductasas encontradas en las mitocondrias. Las

nanopartículas evaluadas se esterilizaron por exposición a luz UV durante 15 minutos. Estas se dispersaron en condiciones de esterilidad en un medio DMEM complementado (10% SFB y 1% estreptomicina-penicilina) a concentraciones de 1 a 10,000 µg/ml. Por otra parte, se sembraron un total de 5,000 células no cancerosas (cultivo primario de células madre mesenquimales y línea celular 3T3L1) por pocillo en una microplaca de 96 pocillos. Ambos tipos celulares se cultivaron con DMEM complementado. Después de 24 h, una vez que las células ya estaban adheridas a la microplaca, se retiró el medio y las células se expusieron por cuadruplicado con las nanopartículas. La muerte celular se midió después de 24 h de exposición. Para el ensayo MTT, a las células se les retiró el medio con nanopartículas y se incubaron con una solución MTT (100 µg/ml en DMEM complementado) durante 4 h. Después de la incubación, se retiró el medio y el formazán presente en el fondo de la placa se disolvió en 50 µl de isopropanol a pH 3. Se leyó la absorbancia a 570 nm en lector de microplaca. El control negativo, las cuales fueron células sin exponer a ningún agente, se tomó como un 100% de viabilidad, realizando el cálculo matemático correspondiente para determinar el porcentaje de viabilidad de las muestras problema. Se espera que las concentraciones no tóxicas no tengan una diferencia significativa respecto al control.

5.5.2 Tinción de HyE

En esta técnica se combina la tinción de hematoxilina, la cual tiñe estructuras ácidas (como el núcleo) en un tono púrpura; esto en combinación de la tinción con eosina que tiñe componentes celulares básicos (como el citoplasma) en tonos rosados.

Para la tinción con hematoxilina-eosina, se prepararon las nanopartículas a evaluar de igual forma que para el estudio de MTT. Se sembraron un total de 5,000 células de la línea celular 3T3L1 por pocillo en una microplaca de 96 pocillos y se cultivaron con DMEM complementado. Después de 24 h se retiró el medio y las células se expusieron con las nanopartículas. Los cambios en la morfología celular se analizaron después de 24 h de exposición. Se retiró el medio y las células se lavaron con PBS tres veces. Para la fijación de las células, cada pocillo se incubó a -20 °C con 50 µl de metanol frío durante 10 min. Las células se lavaron nuevamente con PBS 3 veces. Para la tinción de las células, los pasos fueron: 5 minutos en hematoxilina, lavado con agua corriente, lavado con HCl al 0.5% en etanol, segundo lavado con agua corriente, lavado con agua destilada, 5 min en eosina y finalmente un tercer lavado con agua corriente. La morfología de las células se analizó en microscopio óptico. Se espera no observar cambios morfológicos en las concentraciones no citotóxicas.

5.5.3 Evaluación de la hemólisis

La prueba de hemólisis mide la lisis de los glóbulos rojos expuestos a un agente ambiental. Esta lisis produce la liberación del contenido intracelular del eritrocito debido a la ruptura de su membrana. La molécula liberada medida fue la hemoglobina, que es una proteína predominante en los eritrocitos. Para medir el impacto de las nanopartículas en la lisis de eritrocitos, se realizó una prueba de hemólisis por cuadruplicado de acuerdo con la metodología de Macías-Martínez (64). Las nanopartículas se dispersaron a diferentes concentraciones, desde 1 hasta 1,000 µg/ml, en PBS. Por otra parte, se colectó en tubo heparinizado un total

de 5 ml de sangre de un donante sano. Los eritrocitos se separaron por centrifugación (3000 rpm durante 4 minutos) y se lavaron tres veces en PBS. De acuerdo a la metodología de Macías-Martínez, las nanopartículas y los eritrocitos se incubaron en una relación de 1:99 eritrocitos:nanopartículas v/v, durante 30 minutos, a 37 °C en agitación a 400 rpm. Para los controles positivos y negativos, se utilizó una suspensión de eritrocitos con agua destilada y PBS, respectivamente (relación 1:99 v/v). Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 4 minutos. La hemoglobina liberada en el sobrenadante se midió por espectroscopía UV-Vis a 415 nm. El control positivo con agua destilada se consideró como hemólisis al 100%. Se realizó una relación matemática para determinar el porcentaje de hemólisis de las muestras problema. Se espera que las muestras no hemolíticas no presenten más del 2% de hemólisis como marca la norma para la evaluación de las propiedades hemolíticas de los materiales, ASTM F756-17, la actividad hemolítica de los materiales se clasifica en 3 tipos: materiales no hemolíticos (0 a 2% de hemólisis), materiales con bajo grado hemolítico (2 a 5% de hemólisis) y materiales de alto grado hemolítico (más del 5% de hemólisis) (64).

5.6 Conjugación de MNPs-PEI + ADN

Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* TOP10 donada por el laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular. Esta cepa ya se encontraba transformada con el plásmido recombinante pTracer/*TRAIL*.

5.6.1 Extracción de pTracer/TRAIL

La cepa donada se descongeló y se sembró en un agar Luria Bertani adicionado con ampicilina a 100 µg/ml. Se cultivó a 37° C. A las 18 horas se seleccionó una de las colonias formadas y se cultivó en 3 ml de Luria Bertani líquido, adicionado con ampicilina a 100 µg/ml, a 37° C y 300 rpm durante 18 horas. Los medios utilizados en cultivo bacteriano, así como la forma de preservar los cultivos se encuentran en el Anexo 7. El ADNp se extrajo de la muestra utilizando la técnica manual de Miniprep (Anexo 8). El ADNp se caracterizó en gel de electroforesis con las enzimas *Bam* HI y *Not* I (Anexo 9).

5.6.2 Conjugación del ADNp + nanopartículas

Para determinar la eficiencia de las nanopartículas M-PEI para cargar ADNp, estas se dispersaron en PBS pH 7.4 a una concentración desde 4,000 hasta 500 µg/ml. La preparación del PBS se detalla en el anexo 10. La dispersión se llevó a cabo usando un ultrasonificador con amplitud del 85% durante 5 minutos. En tubos de 0.5 ml se realizaron las mezclas reportadas en la tabla 3.

Tabla 3. Diseño de experimentos conjugación de M-PEI + ADNp.

Tubo 1	Control pADN	4.25 µL de PBS 1x	4.25 µL de ADNp a 500 ng/µl
Tubo 2	Control nanopartículas	8.5 µL de M-PEI a 4,000 µg/ml	
Tubo 3	1:8 w/w (ADNp:nanopartículas)	4.25 µL de M-PEI a 4,000 µg/ml	4.25 µL de ADNp a 500 ng/µl
Tubo 4	1:7 w/w (ADNp:nanopartículas)	4.25 µL de M-PEI a 3,500 µg/ml	4.25 µL de ADNp a 500 ng/µl
Tubo 5	1:6 w/w (ADNp:nanopartículas)	4.25 µL de M-PEI a 3,000 µg/ml	4.25 µL de ADNp a 500 ng/µl

Tubo 6	1:5 w/w (ADNp:nanopartículas)	4.25 µL de M-PEI a 2,500 µg/ml	4.25 µL de ADNp a 500 ng/µl
Tubo 7	1:4 w/w (ADNp:nanopartículas)	4.25 µL de M-PEI a 2,000 µg/ml	4.25 µL de ADNp a 500 ng/µl
Tubo 8	1:3 w/w (ADNp:nanopartículas)	4.25 µL de M-PEI a 1,500 µg/ml	4.25 µL de ADNp a 500 ng/µl
Tubo 9	1:2 w/w (ADNp:nanopartículas)	4.25 µL de M-PEI a 1,000 µg/ml	4.25 µL de ADNp a 500 ng/µl
Tubo 10	1:1 w/w (ADNp:nanopartículas)	4.25 µL de M-PEI a 500 µg/ml	4.25 µL de ADNp a 500 ng/µl

Las mezclas se dejaron incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se mezclaron con buffer de carga y Gel Red para visualizar el ADN, y se corrió un gel de agarosa al 0.8%, 90 V, por 2 h. Se visualizó en un fotodocumentador para determinar la interacción entre ADNp y M-PEI.

5.6.3 Conjugación del aptámero + nanopartículas

Para determinar la eficiencia de las nanopartículas M-PEI para cargar un aptámero específico contra la proteína HER2, las nanopartículas se dispersaron en PBS pH 7.4 a una concentración de 2,500 µg/ml. La dispersión se llevó a cabo usando un ultrasonicador con amplitud del 85% durante 5 minutos. En tubos de 0.5 ml se realizaron las mezclas reportadas en la tabla 4.

Tabla 4. Diseño de experimentos conjugación de M-PEI + aptámero.

Tubo 1	Control aptámero	6.92 µL de PBS 1x	2.08 µL de aptámero a 5 µM
Tubo 2		3.59 µL de PBS 1x	3.33 µL de M-PEI a 1,000 µg/ml
Tubo 3		3.59 µL de PBS 1x	3.33 µL de M-PEI a 800 µg/ml

Tubo 4		3.59 μ L de PBS 1x	3.33 μ L de M-PEI a 600 μ g/ml	2.08 μ L de aptámero a 5 μ M
Tubo 5		3.59 μ L de PBS 1x	3.33 μ L de M-PEI a 400 μ g/ml	2.08 μ L de aptámero a 5 μ M

Las mezclas se dejaron incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Se corrió un gel de agarosa al 2%, 90 V, teñido con Gel Red y analizado en un fotodocumentador para determinar la interacción entre M-PEI con el aptámero.

5.6.4 Conjugación del ADNp + nanopartículas + aptámero

Finalmente, para determinar la eficiencia de las nanopartículas M-PEI para cargar al mismo tiempo el aptámero y el ADN plasmídico las nanopartículas se dispersaron en PBS pH 7.4 a una concentración de 2,500 μ g/ml. La dispersión se llevó a cabo usando un ultrasonificador con amplitud del 85% durante 5 minutos. En tubos de 0.5 ml se realizaron las mezclas reportadas en la tabla 5.

Tabla 5. Diseño de experimentos conjugación de M-PEI + aptámero + ADNp.

		PBS 1X	M-PEI 2,500 μ g/mL	ADNp 500 ng/ μ L	Aptámero 5 μ M	Volumen total
Tubo 1	Control ADNp	5.68 μ L		3.33 μ L		9 μ L
Tubo 2	Control aptámero	6.92 μ L			2.08 μ L	9 μ L
Tubo 3	Control M-PEI	5.68 μ L	3.33 μ L			9 μ L
Tubo 4	M-PEI / ADNp / aptámero	0.26 μ L	3.33 μ L	3.33 μ L	2.08 μ L	9 μ L

Las mezclas se dejaron incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se corrió un gel de agarosa al 0.8%, 90 V, teñido con Gel Red y visualizado en un

fotodocumentador para determinar la interacción entre M-PEI con el ADNp y el aptámero. M-PEI, así como una concentración final de 200 nM del aptámero.

5.7 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey's HSD (diferencia honestamente significativa), con un intervalo de confianza del 95% para determinar diferencias significativas entre el grupo de control y las muestras de prueba. Se esperaba que las muestras problemas no fueran diferentes significativamente en comparación a los controles negativos donde no se expuso a ningún agente peligroso.

VI. RESULTADOS

6.1. Síntesis de las nanopartículas de magnetita

La magnetita (Fe_3O_4) es un mineral de hierro que está constituido por una combinación de óxido Fe^{2+} y Fe^{3+} . La síntesis de nanopartículas de magnetita se realizó mediante el método de nanoprecipitación, donde la reacción química que tiene lugar para la formación de magnetita se representa mediante la ecuación:



Para determinar la correcta síntesis de las MNPs se procedió a analizar las caracterizaciones. El patrón de DRX se empleó para determinar la estructura cristalina y el tamaño de cristal de las MNPs sintetizadas. La Figura 7a muestra el patrón de DRX de las MNPs y su descripción. Esta imagen confirma la formación de la estructura cubica de la magnetita en una fase pura, esto porque el patrón no muestra picos diferentes a la fase de magnetita. Utilizando la ecuación de Debye-Scherrer para la determinación del tamaño promedio de cristal se sustituyó λ por la longitud de onda ($1.5408 \text{ \AA}$), β por la anchura máxima a la mitad del pico más intenso ($3\ 1\ 1$) y θ por el ángulo de difracción del pico ($3\ 1\ 1$) (35.61 grados). El tamaño promedio de cristal de la muestra calculado es de 9.49 nm .

El espectro FTIR de las MNPs y su descripción se muestra en la Figura 7b. Este análisis se realizó para verificar la presencia de la banda característica de magnetita.

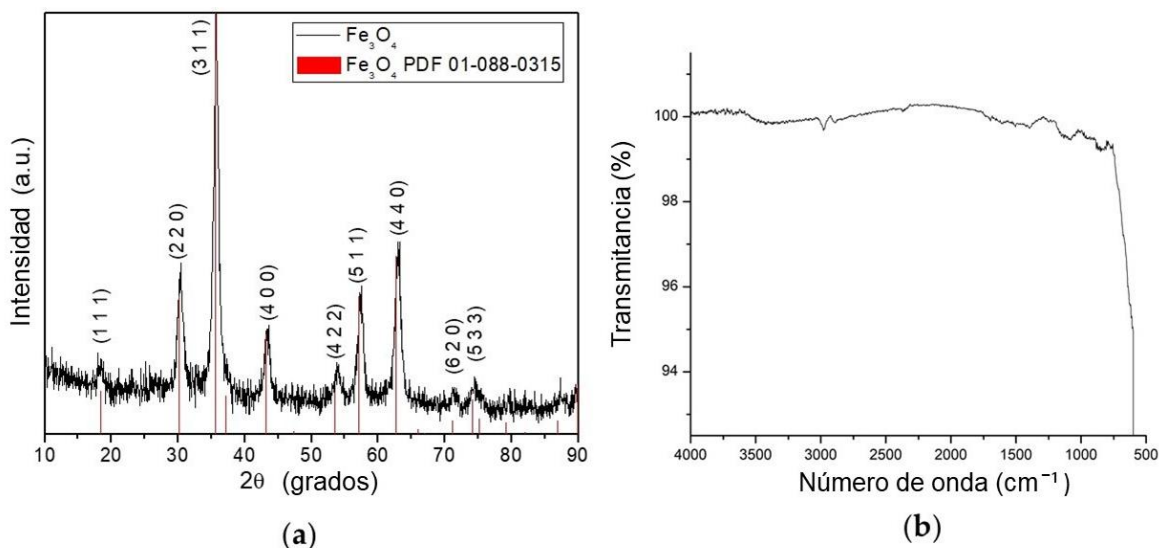


Figura 7. Espectros de las nanopartículas de magnetita. **(a)** DRX. El patrón DRX de las nanopartículas de magnetita muestra nueve picos de difracción observados a valores de 2θ de 18.29° , 30.13° , 35.61° , 43.26° , 53.84° , 57.32° , 63.13° , 71.15° y 74.17° que coinciden con la tarjeta de referencia PDF 01-088-0315. Esos picos se indexan a los planos (1 1 1), (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), (4 4 0), (6 2 0), (5 3 1) respectivamente. **(b)** Espectro FTIR de las nanopartículas de magnetita. La magnetita muestra una banda alrededor de los 634 cm^{-1} , que está relacionada con el estiramiento de Fe-O en el sitio octaédrico de la estructura cristalina de la magnetita.

6.2. Funcionalización de MNPs con PEG

El espectro de FTIR de magnetita recubierta con PEG/Tween 80 (Figura 8) muestra la presencia de la magnetita así como de los polímeros utilizados para recubrir. El análisis con FTIR se realizó para verificar la presencia de bandas características del polímero PEG y de Tween 80 en la superficie de las MNPs. El espectro muestra las bandas correspondientes a los modos de vibración de magnetita, PEG 3350 y Tween 80.

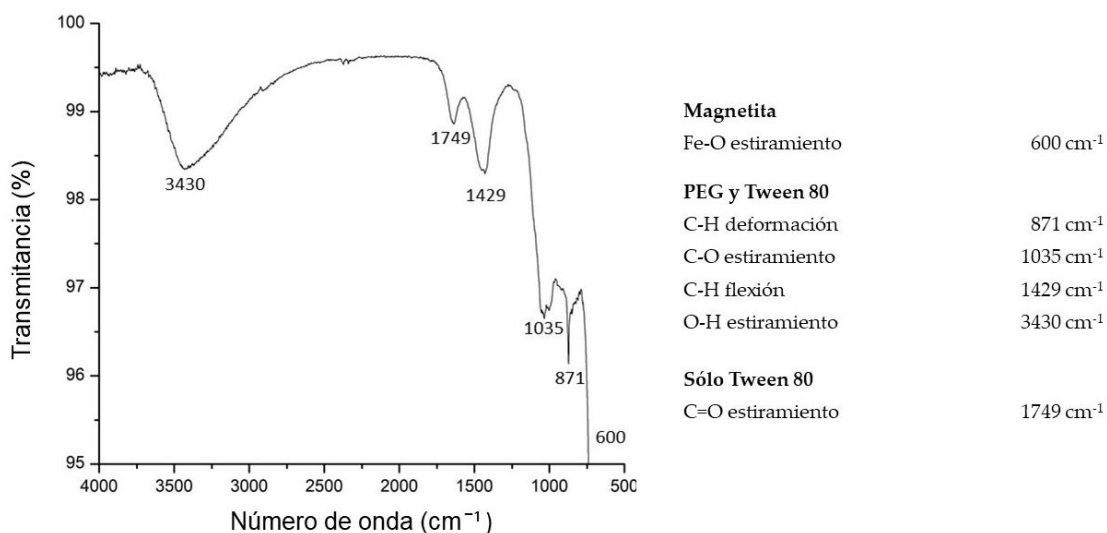


Figura 8. Espectros FTIR de magnetita recubierta con PEG 3350-Tween 80. Las bandas obtenidas corresponden a enlaces encontrados en PEG 3350 y en Tween 80: deformación (871 cm^{-1}) y flexión (1429 cm^{-1}) de C-H; estiramiento de C-O (1035 cm^{-1}); y estiramiento de O-H (3430 cm^{-1}). Las muestras presentan el estiramiento Fe-O (600 cm^{-1}) proveniente de la magnetita y el estiramiento C=O (1749 cm^{-1}) del Tween 80.

6.3. Funcionalización de MNPs con CS

El espectro FTIR de la magnetita recubierta con quitosano/Tween 80 (M-CS/Tween 80) se muestra en la Figura 9. Este análisis se realizó para verificar la presencia de bandas características de magnetita y del quitosano/Tween 80. El espectro tiene las bandas que corresponden a la magnetita, así como a los diferentes grupos funcionales presentes en el quitosano y Tween 80.

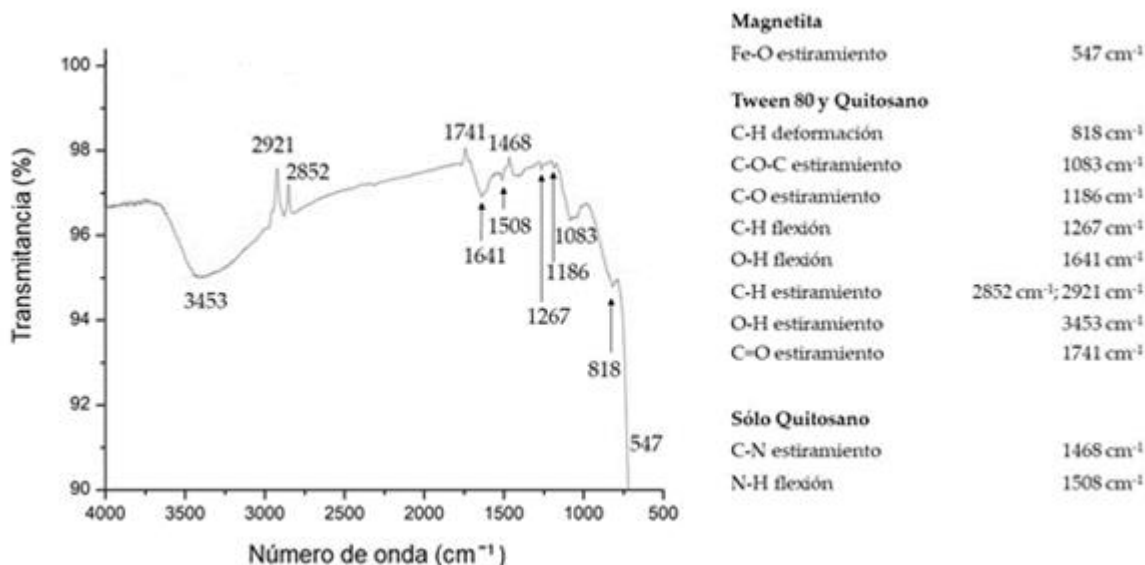


Figura 9. Se muestra el espectro FTIR de las nanopartículas de M-CS/Tween 80. La magnetita muestra una banda Fe-O alrededor de 634 cm^{-1} . Las bandas de quitosano y Tween 80 a 3453 cm^{-1} y 1637 cm^{-1} corresponden a los modos de flexión y estiramiento del grupo hidroxilo; las bandas de estiramiento del C-H corresponden a 2921 cm^{-1} (asimétrico) y 2852 cm^{-1} (simétrico); la banda a 1267 cm^{-1} está relacionada con el modo de flexión C-H; la banda a 1186 cm^{-1} está relacionada con el estiramiento del enlace C-O; la banda observada a 1083 cm^{-1} corresponde al estiramiento asimétrico del enlace C-O-C; y finalmente, la banda a 818 cm^{-1} corresponde a una deformación de C-H. La banda en 1741 cm^{-1} indica estiramiento del C=O proveniente del Tween 80 así como de los residuos de acetyl que no son eliminados de la quitina provenientes del quitosano. Las bandas que corresponden solo al quitosano son el estiramiento de C-N observado a 1468 cm^{-1} y el modo de flexión de N-H a 1508 cm^{-1} .

6.4. Funcionalización de MNPs con PEI

En cuanto al espectro de magnetita recubierta con PEI (Figura 10) se pueden apreciar las bandas características de ambos compuestos (42,65), así como del ácido cítrico que se utilizó para dispersar, del cual quedaron remanentes en las nanopartículas.

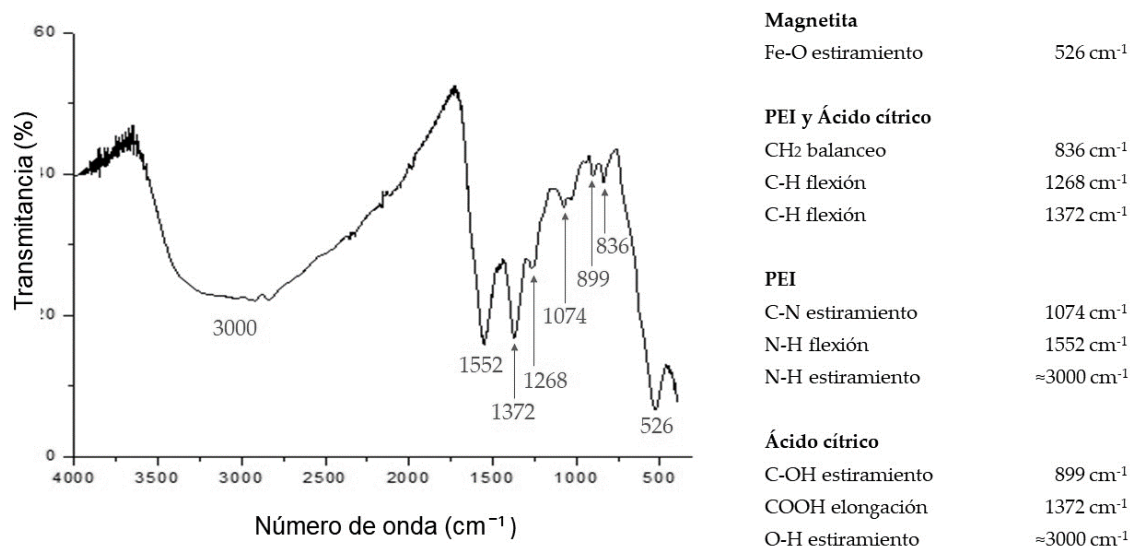


Figura 10. Espectro FTIR de MNPs-PEI. Se observa la banda característica del enlace Fe-O de la magnetita a 526 cm⁻¹. Las bandas correspondientes al PEI se muestran en los 1074 cm⁻¹ (estiramiento de C-N), 1552 cm⁻¹ (flexión de N-H) y alrededor de los 3000 cm⁻¹ (estiramiento de N-H). Se muestran también la banda principal correspondiente al ácido cítrico, elongación de los grupos carboxilo, en 1372 cm⁻¹.

6.5. Caracterización con SEM

Las micrografías de SEM se analizaron para determinar la morfología de cada una de las nanopartículas. Los análisis de las nanopartículas de magnetita (Figura 11) mostraron nanopartículas con tamaños aproximados de 10 nm, sin embargo, el tamaño exacto no se pudo obtener debido a la calidad de las imágenes (los tamaños exactos se tomaron con la técnica de DLS). En las imágenes de SEM de las nanopartículas de magnetita también se puede observar evidencia de aglomeración.

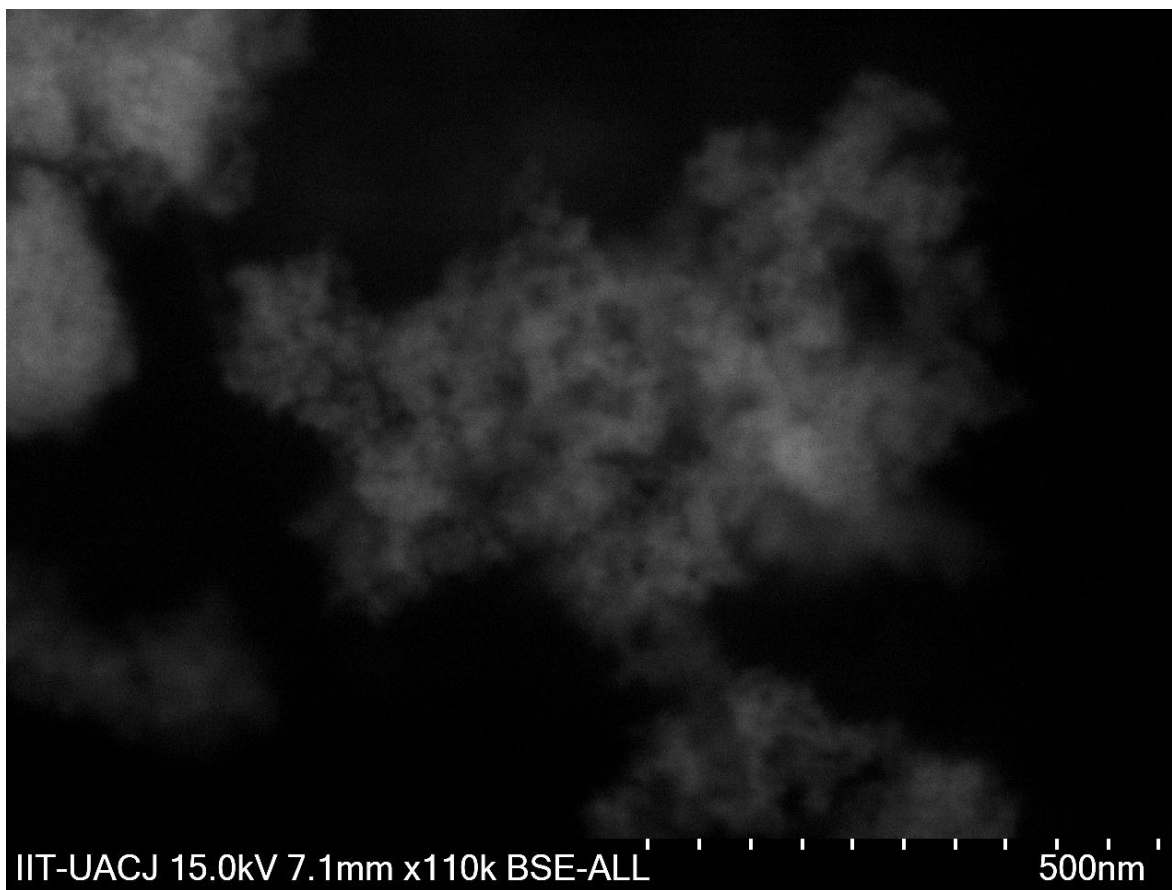


Figura 11. SEM de las nanopartículas de magnetita. Imágenes de las nanopartículas por SEM muestra aglomeración.

La Figura 12 muestra las imágenes de SEM de las nanopartículas de magnetita recubiertas con PEG y Tween 80. Las nanopartículas mostraron una forma esférica muy definida, con dimensiones en el orden de los nanómetros con tamaños de partículas que van desde los 80 hasta los 200 nm.



Figura 12. Imágenes SEM de nanopartículas de magnetita recubiertas con PEG/Tween 80 a diferentes magnificaciones. Todas las muestras mostraron formas esféricas. A diferencia de las nanopartículas de magnetita desnudas, en las recubiertas con PEG 3350-Tween 80 la separación entre una nanopartícula y otra se hace más evidente, mostrando una disminución en el grado de aglomeración.

Como se puede observar en la Figura 13, las nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano/Tween 80 generaron estructuras en el orden de los micrómetros, con tamaños que van desde 1 a 1.5 μm , con morfologías esféricas bien definidas. La imagen muestra las nanopartículas de magnetita dentro de las microesferas de quitosano/Tween 80.

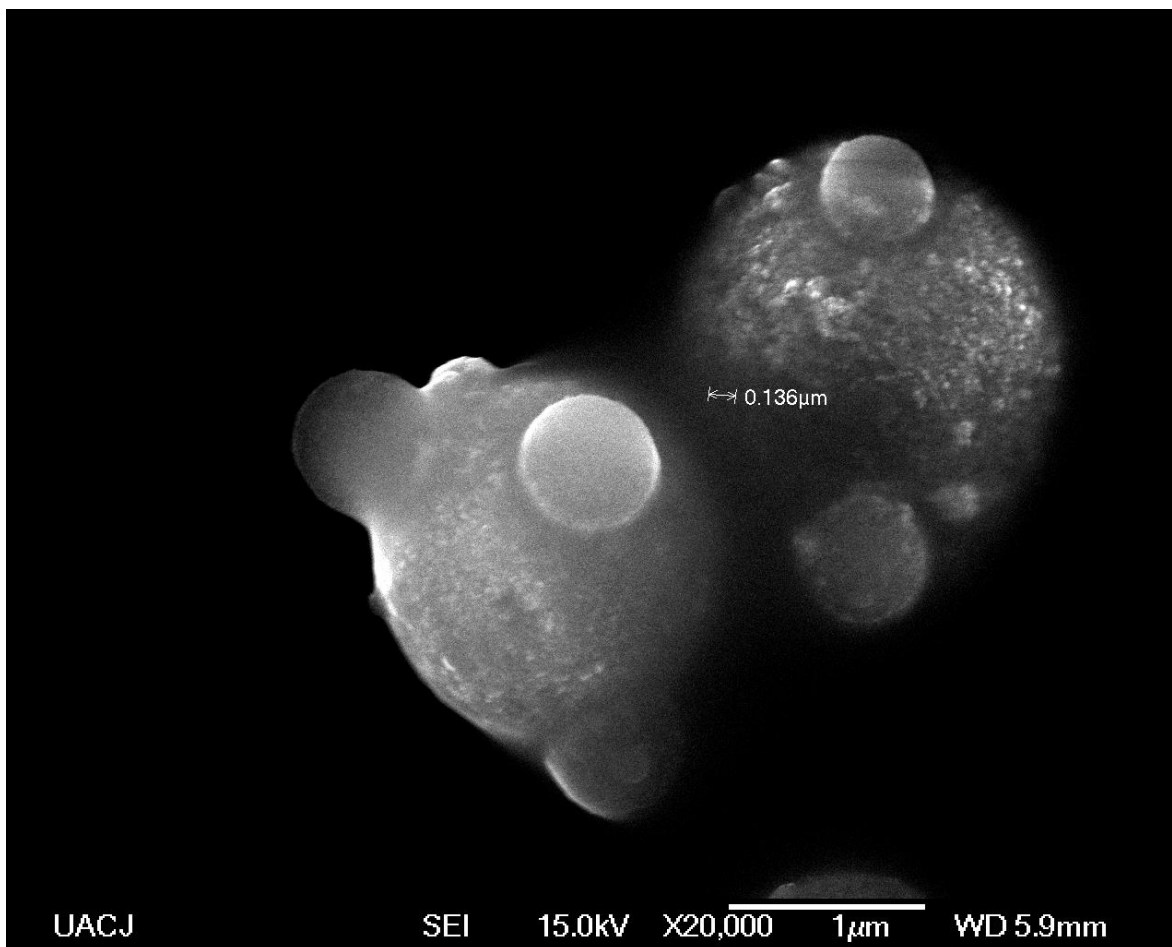


Figura 13. Imagen SEM de nanopartículas de magnetita recubiertas con CS/Tween 80. Todas las muestras mostraron formas esféricas en escalas micrométricas.

Las nanopartículas de magnetita recubiertas con PEI (Figura 14) mostraron tamaños aproximados de 100 nm, con morfología semi-esférica, similares a las obtenidas por Megías et al (63).

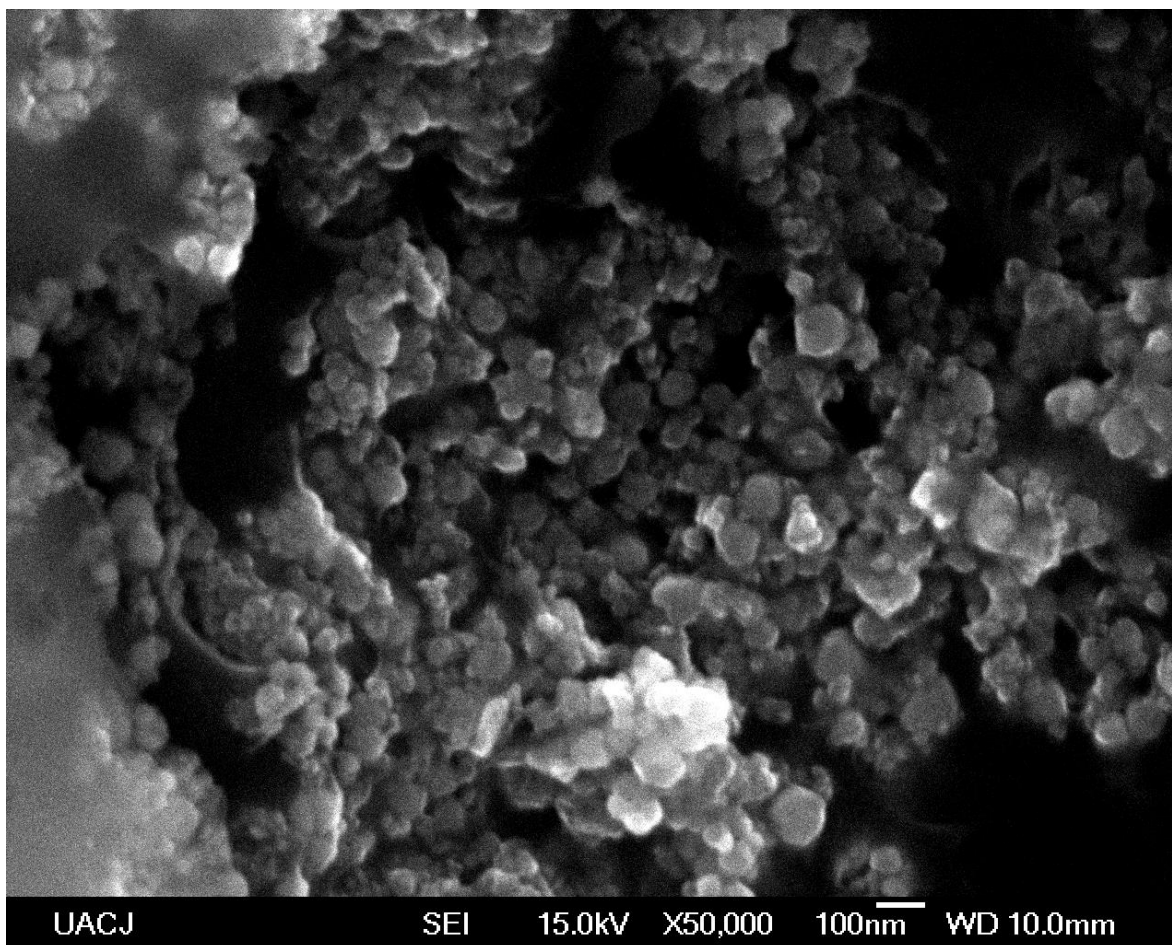


Figura 14. Imágenes SEM de nanopartículas de magnetita recubiertas con PEI. Las muestras mostraron formas esféricas semi-amorfas en escalas micrométricas.

6.6. Caracterización de tamaños con DLS

El análisis DLS de la magnetita desnuda (Figura 15) muestra un tamaño promedio de partícula de 10.51 nm y aglomerados de 527.8 y 4367 nm. El tamaño de las nanopartículas magnéticas es consistente con el método utilizado para su síntesis, que en este caso fue coprecipitación química por inyección rápida, que forma tamaños de nanopartículas menores de 15 nm (58). Los tamaños de las nanopartículas de magnetita corresponden al tamaño promedio de cristal de 9.49 nm que obtuvimos por DRX, por lo que esto evidencia que las nanopartículas

generadas son monocristalinas. Aunque solo el 2.6% de la muestra genera aglomerados de casi 4.4 μm , los aglomerados más grandes pueden causar varios problemas si son administrados por sangre al paciente. Estos resultados obtenidos concuerdan con las imágenes obtenidas por SEM, donde se aprecian nanopartículas individuales de alrededor de 10 nm.

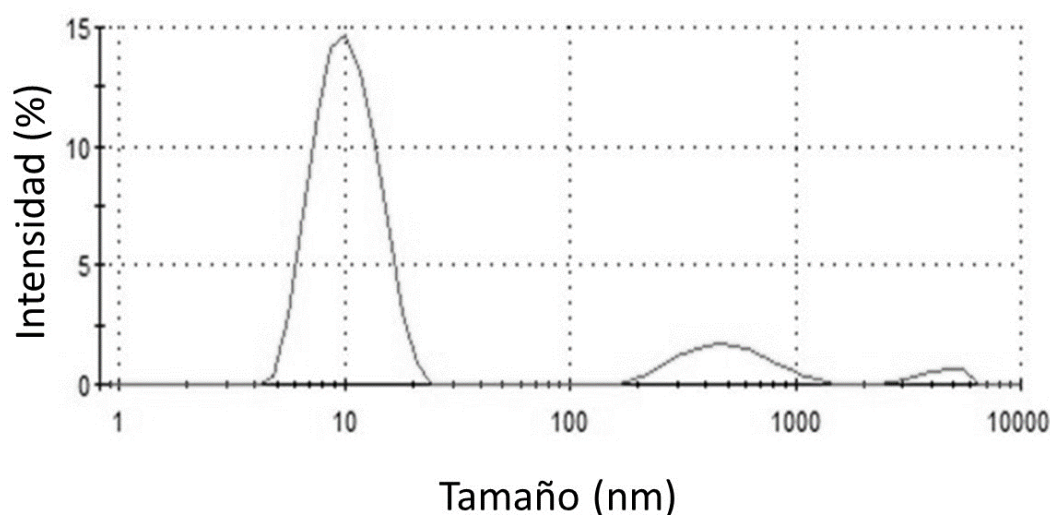


Figura 15. Resultados de tamaños de nanopartículas de magnetita por dispersión dinámica de luz (DLS). Con un tamaño promedio de 10.51 nm, el 83.8% de las nanopartículas no generan aglomerados. El 13.6% de las nanopartículas genera aglomerados de 527.8 nm y el otro 2.6% genera aglomerados de 4,367 nm.

Los resultados DLS de las nanopartículas de magnetita recubiertas con PEG/Tween 80 (Figura 16) muestran un tamaño promedio de partículas individuales de 119.2 nm y un tamaño promedio de aglomerados de 785.6 nm. Aunque, los aglomerados generados por nanopartículas recubiertas están en una proporción mayor que las nanopartículas desnudas, los tamaños de los aglomerados más grandes de nanopartículas recubiertas (2.7 μm) son aproximadamente 2.3 veces más pequeño

que el tamaño de los aglomerados de nanopartículas desnudas ($6.4\ \mu\text{m}$). Los tamaños de partícula individual se correlacionan con las imágenes obtenidas por SEM.

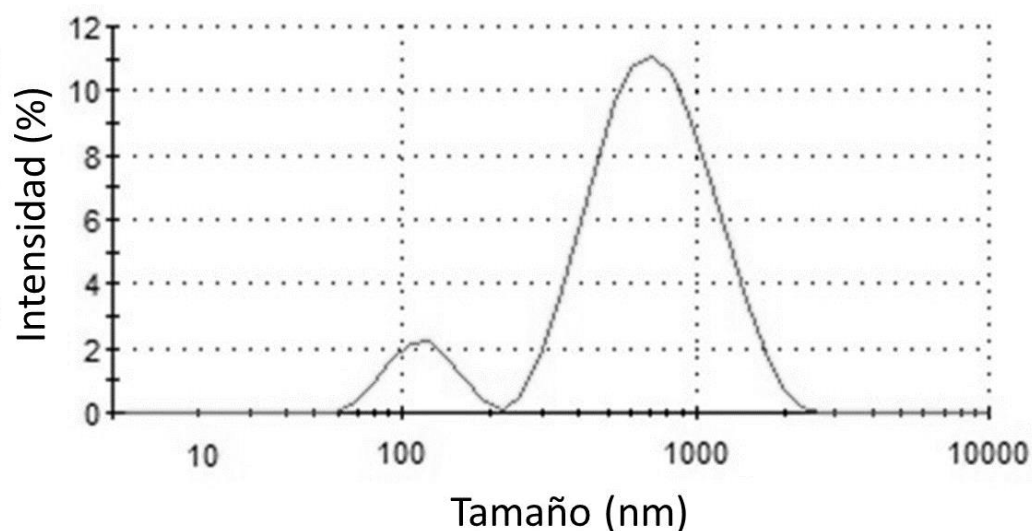


Figura 16. Distribución de tamaños DLS de nanopartículas de magnetita recubiertas con PEG 3350-Tween 80. Con un tamaño promedio de 119.2 nm 10.3% de las nanopartículas no generan aglomerados. El 89.7% de las nanopartículas generan aglomerados de 785.6 nm.

La distribución del tamaño de las microesferas de magnetita recubierta con quitosano/Tween 80 (Figura 17) se obtuvieron también con la técnica DLS. El tamaño promedio del 98.8% de las microesferas M-CS/Tween 80 es $1.431\ \mu\text{m}$. Solo el 1.2% de las microesferas formadas muestran tamaños promedio de $6\ \mu\text{m}$.

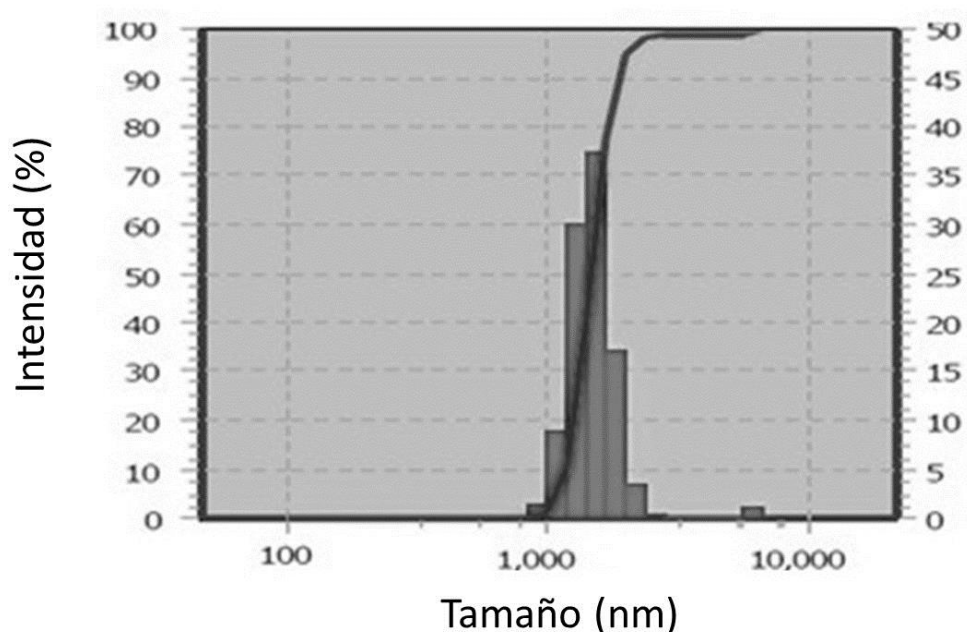


Figura 17. Distribución de tamaño de microesferas M-CS/Tween 80. El 98.8% de las partículas miden 1.431 μm , mientras que las demás forman agregados de 6 μm . Se muestran partículas con una distribución de tamaño homogénea, con un error mínimo del 1.2%.

El tamaño de las nanopartículas de magnetita recubiertas con PEI (Figura 18) se mostró homogéneo en los resultados del DLS. Todas las nanopartículas corresponden a una sola distribución de tamaños con un promedio de tamaño de partícula de 951 nm. Sin embargo, al comparar con las imágenes SEM nos percatamos que el tamaño dado por el DLS no corresponde al tamaño individual de cada nanopartícula, sino a los aglomerados que éstas generan. Se espera que cada nanopartícula por individual pueda ingresar dentro de las células diana una vez dada la aplicación de las nanopartículas.

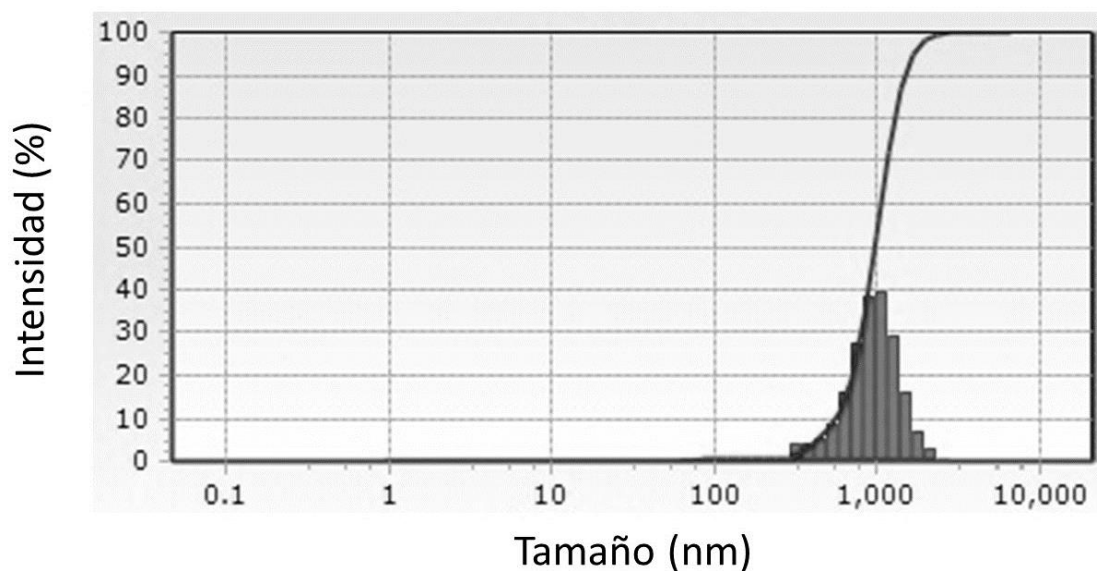


Figura 18. Distribución de tamaño de nanopartículas de magnetita recubiertas con PEI. Se muestran los tamaños de los aglomerados generados en líquido, con un tamaño homogéneo promedio de 951 nm.

Se espera que, como muestra la tabla 6, tanto las nanopartículas de magnetita recubiertas con PEG 3350-Tween 80 y las recubiertas con PEI son lo suficientemente grandes como para no ser eliminados del torrente sanguíneo debido a la excreción renal, pero son lo suficientemente pequeños como para cruzar epitelios y no ser eliminados rápidamente por los macrófagos.

Tabla 6. Tamaños de las nanopartículas evaluadas.

	Tamaño promedio de nanopartícula	Tamaño de aglomerado	Interpretación
Nanopartículas de magnetita	10.51 nm	527.8 nm 4.3 μm	Tamaños tan pequeños son desechados rápidamente por el organismo.

			• Aglomerados muy grandes podrían causar problemas en circulación.
M-PEG/Tween 80	• 119.2 nm	• 785.6 nm	• A pesar de la existencia de aglomerados se espera que los tamaños de nanopartícula sean los óptimos para su uso <i>in vivo</i>.
M-CS/Tween 80	• 1.431 μm	• 6 μm	• Los tamaños de partícula son tan grandes que no podrían ingresar a las células. • Aglomerados muy grandes podrían causar problemas en circulación. • No se recomienda para la aplicación propuesta en este proyecto, pero podría ser utilizado en tratamientos dermatológicos, por ejemplo.
M-PEI	• Tamaños aproximados alrededor de 100 nm	• 951 nm	• A pesar de la existencia de aglomerados se espera que los tamaños de nanopartícula sean los óptimos para su uso <i>in vivo</i>.

6.7. Caracterización de potencial Z con DLS

Los resultados de potencial Z de las diferentes partículas se resumen en la tabla 7. Los resultados esperados son nanopartículas con carga positiva, en las cuales se puedan adherir moléculas de ADN de carga negativa. De las caracterizaciones realizadas, aquellas con potencial Z compatible son las recubiertas con PEI. Por lo que se espera estas sean las que mejor puedan adherir ADN en su superficie.

Tabla 7. Potenciales Z de las nanopartículas evaluadas.

	Potencial Z	Interpretación
Nanopartículas de magnetita	-3.41 mV	• No es posible adherirle ADN por unión electrostática debido a la repulsión de cargas.
M-PEG/Tween 80	-4.13 mV	• El PEG es un polímero sin carga formal, por lo que la carga total del complejo no se ve afectada por este. • No es posible adherirle ADN por unión electrostática debido a la repulsión de cargas.
M-CS/Tween 80	+0.5 mV	• CS es un polímero con carga positiva, por lo que la carga total del complejo es positiva.
M-PEI	+7.5 mV	• PEI es un polímero con carga positiva, por lo que la carga total del complejo es positiva. • Es posible unirle ADNp por unión electrostática debido a la repulsión de cargas.

Las nanopartículas de magnetita recubiertas con PEG/Tween 80 no son viables para una aplicación como acarreador de ADNp, cargándolo por medio de cargas electrostáticas. Por lo tanto, la única nanopartícula a la cual se le evaluó su capacidad de adherir ADNp fue la nanopartícula de M-PEI. Sin embargo, las nanopartículas de M-PEG/Tween 80 tienen los tamaños adecuados para ser internalizadas dentro del organismo, por lo que se continuará su evaluación biológica en progreso para determinar su actividad biológica.

6.8. Citotoxicidad de nanopartículas (MTT)

Nanopartículas de magnetita. Los resultados de citotoxicidad de las nanopartículas de magnetita desnuda se muestran en la Figura 19. A concentraciones desde 1 $\mu\text{g/ml}$ a 1,000 $\mu\text{g/ml}$ no hay diferencia significativa respecto al control ($p=0.05$) por lo que se toman como concentraciones no dañinas para las células. En cuanto a la concentración de 10,000 $\mu\text{g/ml}$ existe una diferencia significativa, por lo que se prefiere evitar esta alta concentración al representar un riesgo para la célula.

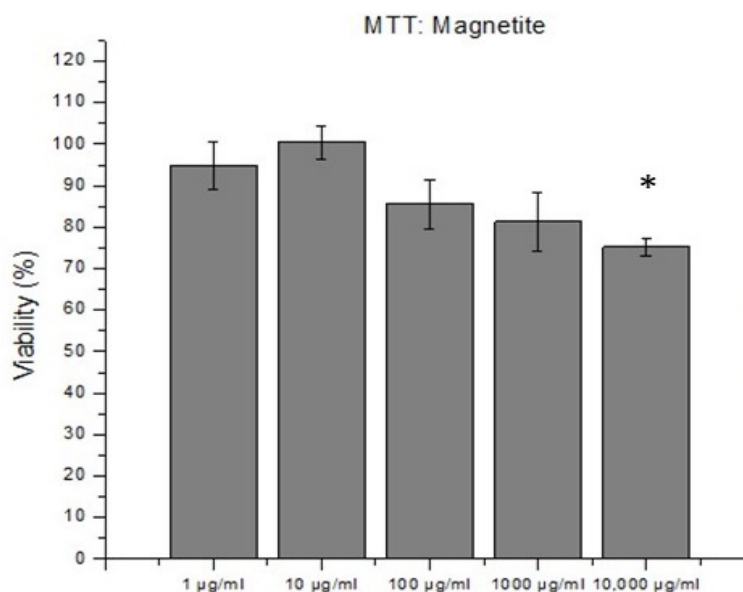


Figura 19. Estudios de citotoxicidad magnetita. Se muestran los resultados del MTT a las 24 horas. Sólo las concentraciones de 10,000 $\mu\text{g/ml}$ no son seguras para usarse en una aplicación biomédica.

Nanopartículas M-PEG/Tween 80. Los resultados de magnetita recubierta con PEG mostraron un comportamiento similar, como muestra la Figura 20. En

concentraciones de 1 a 1,000 $\mu\text{g/ml}$ no existen diferencias significativas ($p=0.05$) contra el control negativo. A estas dosis no hay daño en el metabolismo celular y las nanopartículas no se consideran una sustancia peligrosa. Por otro lado, los análisis estadísticos han demostrado que a concentraciones de 10,000 $\mu\text{g/ml}$, la magnetita PEGilada, al igual que la desnuda, existe una diferencia significativa con respecto al control negativo ($p = 0.05$). Por lo tanto, no es seguro usar estas nanopartículas en concentraciones de 10,000 $\mu\text{g/ml}$ y superiores.

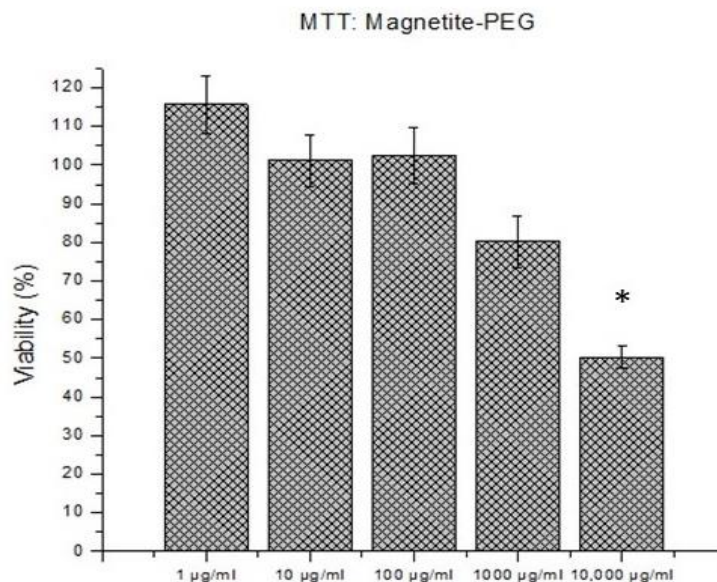


Figura 20. Estudios de citotoxicidad magnetita recubierta con PEG. Se muestran los resultados del MTT a las 24 horas. Sólo las concentraciones de 10,000 $\mu\text{g/ml}$ no son seguras para usarse en una aplicación biomédica.

Microesferas M-CS/Tween 80. La evaluación de las nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano se realizó después de 24, 48 y 72 horas de exposición, tal como muestra la Figura 21. El grado de citotoxicidad va en aumento conforme al

tiempo y conforme a las concentraciones según las diferencias significativas encontradas ($p=0.05$). Siendo las concentraciones de 1,000 a 10,000 $\mu\text{g/ml}$ las más tóxicas. En este caso se pudo evaluar a diferentes tiempos y se encontró además que las concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ son tóxicas únicamente a una exposición prolongada, y la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ no resultó tóxica a los tiempos de exposición evaluados.

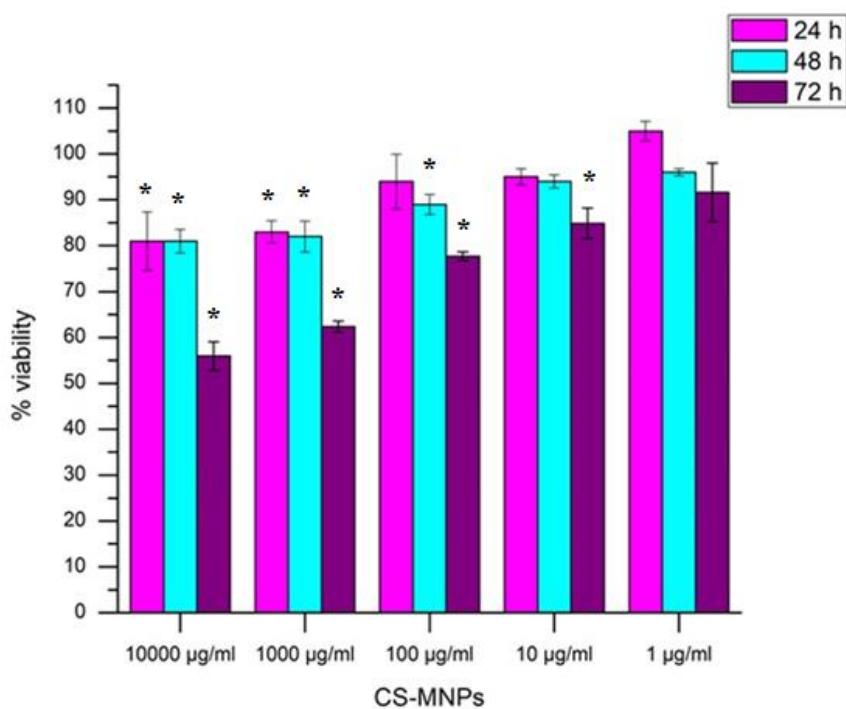


Figura 21. Estudios de citotoxicidad magnetita recubierta con CS. Se muestran los resultados del MTT a las 24, 48 y 72 horas. Sólo las concentraciones de 1,000 a 10,000 $\mu\text{g/ml}$ no son seguras para usarse en una aplicación biomédica. Concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ no son seguras a tiempos prolongados, mientras que la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ es segura para una aplicación biomédica.

Nanopartículas M-PEI. En cuanto a la evaluación de las nanopartículas recubiertas con PEI se evaluaron tres tipos diferentes de nanopartícula, cada una con una

diferente relación de magnetita:PEI durante su síntesis. Las relaciones evaluadas fueron 4:3, 4:2 y 4:1 magnetita:PEI w/w. Se observó que entre más PEI contenía la relación, mayor era el grado de dispersión de la nanopartícula. Sin embargo, al ser PEI reportado como citotóxico por la literatura, es importante conocer hasta qué grado se le puede añadir PEI a la nanopartícula sin que cause algún daño en las células. Los resultados de la citotoxicidad de magnetita recubierta con PEI en varias relaciones se muestran en la Figura 22. Se puede observar que a concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ todas las partículas analizadas son seguras al no haber diferencia significativa ($p=0.05$). En cuanto a las concentraciones de 100 y 1,000 $\mu\text{g/ml}$, existe una diferencia significativa ($p=0.05$) que indica un daño celular. No existe diferencia significativa ($p=0.05$) entre las diferentes relaciones (4:3, 4:2, 4:1), por lo que se continúa utilizando 4:3 en las evaluaciones posteriores, al ser el de mayor grado de dispersión.

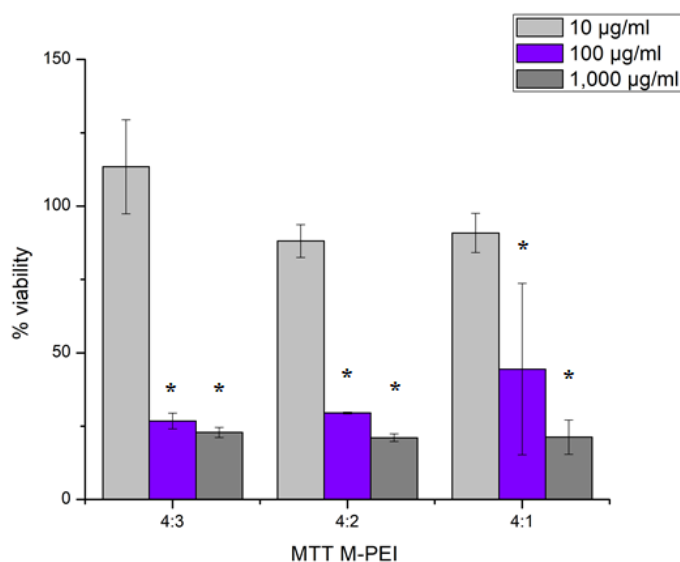


Figura 22. Estudios de citotoxicidad magnetita recubierta con PEI diferentes relaciones. Se muestran los resultados del MTT a las 48 horas. Sólo la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ es segura para usarse en una aplicación biomédica.

Una vez seleccionada la relación 4:3 se amplificó el rango de concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ para seleccionar la dosis más alta que no cause un daño en las células. Las concentraciones de 20 a 80 $\mu\text{g/ml}$ muestran una diferencia significativa ($p=0.05$) respecto al control, por lo que son consideradas como citotóxicas. Se concluye que la dosis más alta considerada como no dañina es la de 10 $\mu\text{g/ml}$ presentada en la Figura 23.

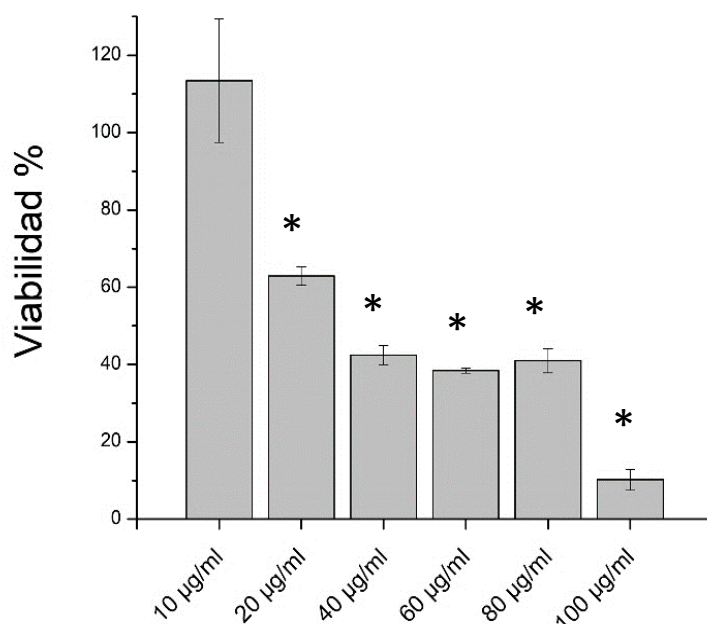


Figura 23. Estudios de citotoxicidad magnetita recubierta con PEI 4:3. Se muestran los resultados del MTT a las 24 horas. Todas las concentraciones evaluadas muestran ser citotóxicas para las células.

6.9. Citotoxicidad nanopartículas (HyE)

Nanopartículas de magnetita. La tinción con hematoxilina-eosina de las células expuestas a las nanopartículas de magnetita desnudas muestran que no hay cambios en la morfología de las células expuestas, tal como indica la Figura 24. A concentraciones no citotóxicas (según el estudio de MTT), de 1 a 1,000 $\mu\text{g/ml}$, no hay evidencia de cambios en el tamaño o la forma ni en núcleo ni en citoplasma. A concentraciones más altas, se puede observar aglomeración de nanopartículas magnéticas en las células. Con los experimentos realizados no podemos dilucidar el mecanismo molecular que las nanopartículas siguen para ingresar a la célula, pero las imágenes sugieren que las nanopartículas atraviesan la membrana celular pero no la membrana del núcleo.

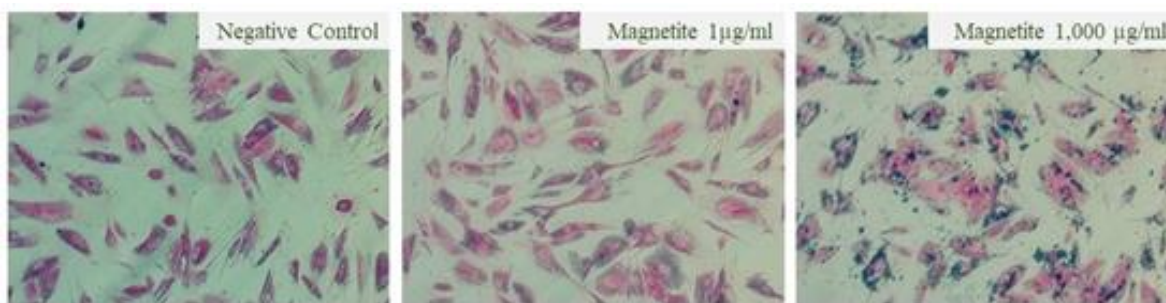


Figura 24. Imágenes 40x de HyE de células expuestas a nanopartículas de magnetita. Se puede apreciar que no hay cambios en la morfología de las células una vez expuestas a las nanopartículas durante las primeras 24 horas.

Nanopartículas M-PEG/Tween 80. Las imágenes de HyE de las células expuestas a las nanopartículas de M-PEG tampoco muestran cambios celulares en morfología

y tamaño. La Figura 25 muestra las imágenes de las células expuestas a las concentraciones no citotóxicas de 1 y 1,000 $\mu\text{g/ml}$.

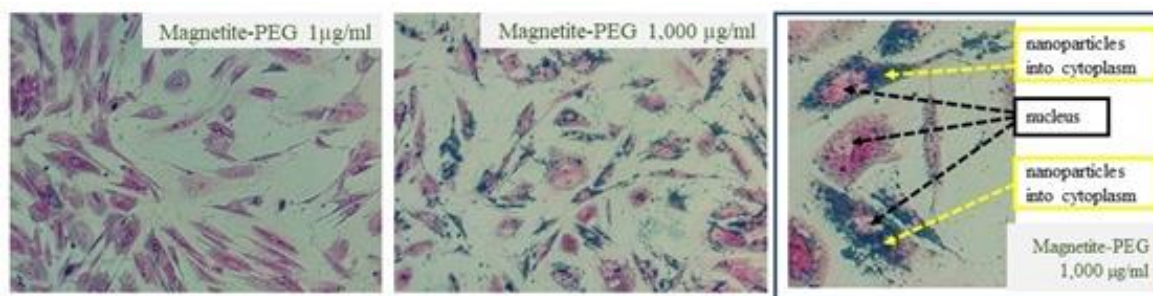


Figura 25. Imágenes 40x de HyE de células expuestas a nanopartículas de M-PEG. Se puede apreciar que no hay cambios en la morfología ni tamaño de las células durante las primeras 24 horas.

Microesferas M-CS/Tween 80. La Figura 26 muestra imágenes de las células expuestas a las nanopartículas de M-CS. Se observaron cambios en la morfología celular a concentraciones de 1,000 $\mu\text{g/ml}$, corroborando citotoxicidad al igual que el ensayo de MTT. A esta misma concentración las nanopartículas de magnetita desnudas y las recubiertas con PEG no causan citotoxicidad. Posiblemente la citotoxicidad del quitosano esté dada por las cargas positivas que este tiene. A la concentración 1 $\mu\text{g/ml}$ no hay cambios morfológicos en el citoplasma ni en el núcleo.

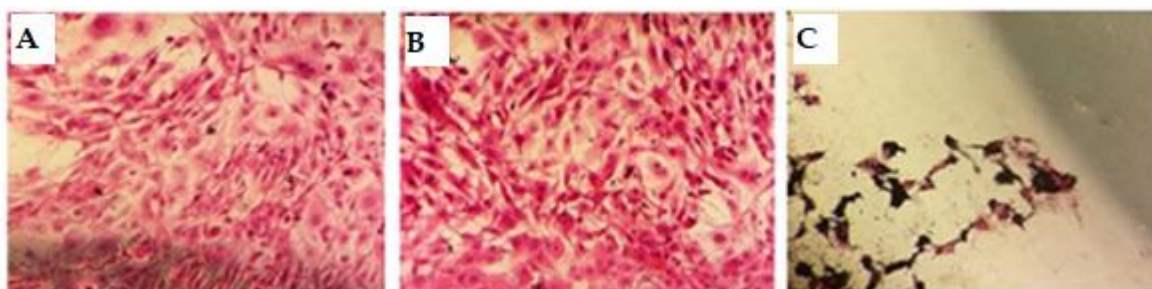


Figura 26. Imágenes 40x de HyE de células expuestas a nanopartículas de M-CS durante 24 horas. **A)** 1 $\mu\text{g/ml}$, **B)** 10 $\mu\text{g/ml}$ y **C)** 1,000 $\mu\text{g/ml}$. Se puede apreciar que no hay cambios en la morfología ni tamaño de las células durante las primeras 24 horas a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, mientras que a 1,000 $\mu\text{g/ml}$ se observa evidente daño celular.

Nanopartículas M-PEI. En la Figura 27 se muestran las imágenes de las microscopías de las células expuestas a diferentes concentraciones de M-PEI. Aunque el daño morfológico no es tan evidente, existe disminución de tamaño de citoplasma y de cantidad de células adheridas a la placa a las concentraciones más altas de M-PEI. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos por la técnica de MTT.

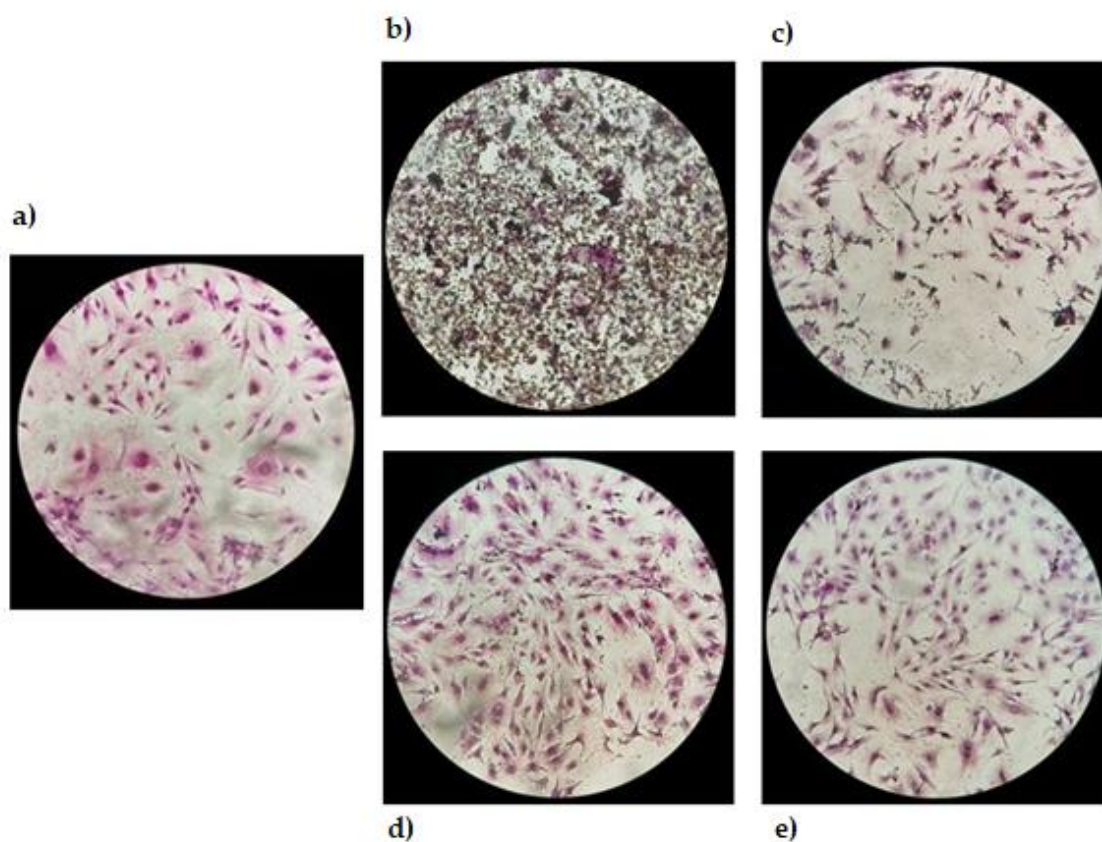


Figura 27. Imágenes 40x de HyE de células expuestas a nanopartículas de M-PEI. **a)** Control, **b)** 1,000 $\mu\text{g/mL}$, **c)** 100 $\mu\text{g/mL}$, **d)** 10 $\mu\text{g/mL}$, **e)** 1 $\mu\text{g/mL}$. Se puede apreciar que hay cambios en el tamaño de citoplasma y número de células adheridas al pozo a concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ y mayor.

6.10. Pruebas de hemólisis

Nanopartículas de magnetita. Como se muestra en la Figura 28, las nanopartículas de magnetita desnudas muestran un comportamiento no hemolítico en todas las concentraciones probadas (de 1 a 1,000 $\mu\text{g/ml}$) al presentar una hemólisis por debajo del 2%.

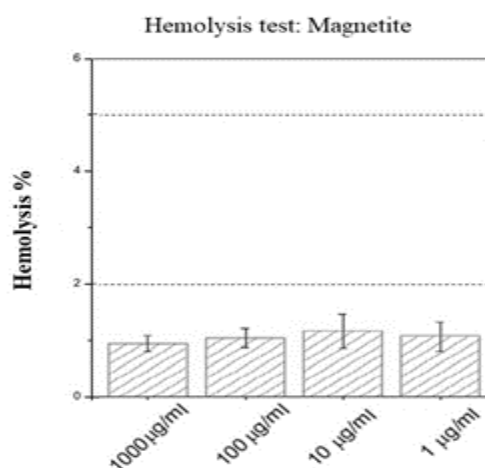


Figura 28. Pruebas de hemólisis nanopartículas de magnetita. Se observa que a concentraciones de 1 a 1,000 $\mu\text{g/ml}$ no hay hemólisis.

Nanopartículas M-PEG/Tween 80. Por otro lado, las nanopartículas de magnetita PEGilada son seguras solo a concentraciones inferiores a 100 $\mu\text{g/ml}$, tal como se muestra en la Figura 29. La concentración evaluada de 1,000 $\mu\text{g/ml}$ supera el 5%

de hemólisis que la norma ASTM F756-17 marca como segura, siendo este un material hemolítico.

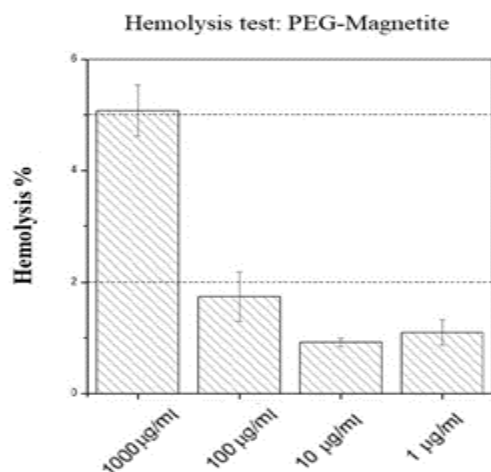


Figura 29. Pruebas de hemólisis MNPs M-PEG. Se observa que a concentraciones de 1 a 100 µg/ml no hay hemólisis. A concentraciones de 1,000 µg/ml se observa un grado de hemólisis alto.

Microesferas M-CS/Tween 80. Como se muestra en la Figura 30, las microesferas de M-CS se consideran como un material no hemolítico en todas las concentraciones analizadas, desde 1 a 10,000 µg/ml. Si bien, a concentraciones de incluso 1,000 µg/ml las nanopartículas M-CS causaban daño celular a nivel metabólico (refiriéndose a los resultados de MTT), estas no tienen la capacidad de dañar la integridad de la membrana celular.

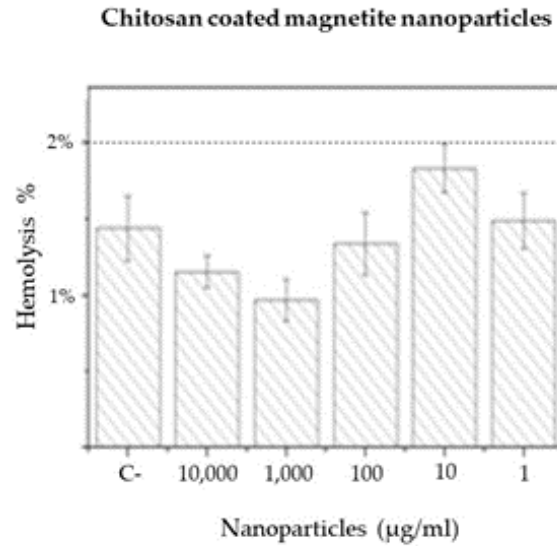


Figura 30. Pruebas de hemólisis nanopartículas M-CS. Se observa que a concentraciones de 1 a 10,000 µg/ml no hay hemólisis.

Nanopartículas M-PEI. Para las nanopartículas de magnetita recubiertas con PEI se evaluaron concentraciones de 10 a 40 µg/ml. Los resultados mostrados en la Figura 31 demostraron que todas las concentraciones evaluadas se encuentran por debajo del 2% de hemólisis.

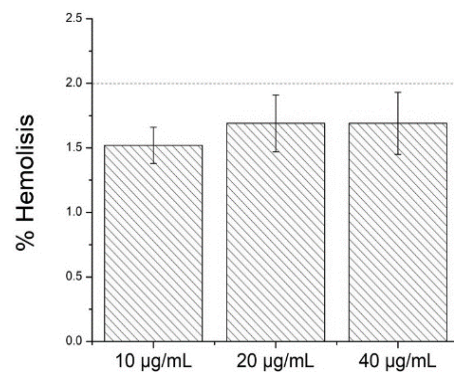


Figura 31. Pruebas de hemólisis nanopartículas M-PEI. Se observa que a todas las concentraciones evaluadas la hemólisis es menor del 2%.

6.11. Resumen de las características de los nanosistemas

En la siguiente tabla se muestra las características de un sistema ideal para la aplicación deseada (24), y el resumen de los resultados encontrados en los nanosistemas diseñados. Como podemos observar, únicamente las NMPs-PEI cumplen con todas las características, por lo que pasaron a la fase de unión de ADN.

Tabla 8. Resumen de las características de los nanosistemas.

Características ideales		M	M-PEG/Tween 80	M-CS/Tween 80	M-PEI
Tamaño de partícula	≈ 100 nm (24)	10.51 nm	119.2 nm	1,431 nm	≈ 100 nm
Potencial Z	Positivo	-3.41 mV ✗	-4.13 mV ✗	+ 0.5 mV ✓	+ 7.5 mV ✓
Citotoxicidad		1000 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL
Dosis máxima no citotóxica					
Hemólisis		No hemolíticas a dosis de 1000 µg/mL o menor	No hemolíticas a dosis de 100 µg/mL o menor	No hemolíticas a ninguna dosis evaluada	No hemolíticas a ninguna dosis evaluada

6.12. Adhesión de ADNp EN M-PEI

Antes de comenzar con los ensayos de adhesión se verificó que los plásmidos extraídos eran los que contenían el inserto *TRAIL*. Se muestra en la Figura 32 el gel

de la digestión del plásmido con las enzimas BamH1 y Not1. En el carril 1 se observa el plásmido corriendo de manera normal a través del gel de agarosa. En los carriles 2 y 3 el plásmido fue linealizado por las enzimas por separado. En ambos carriles se observa que el plásmido migra de manera diferente respecto al carril 1 debido a la linealización. En el carril 4 se observa la digestión con el par de enzimas, observando la banda del fragmento *sTRAIL* de 687 pb.

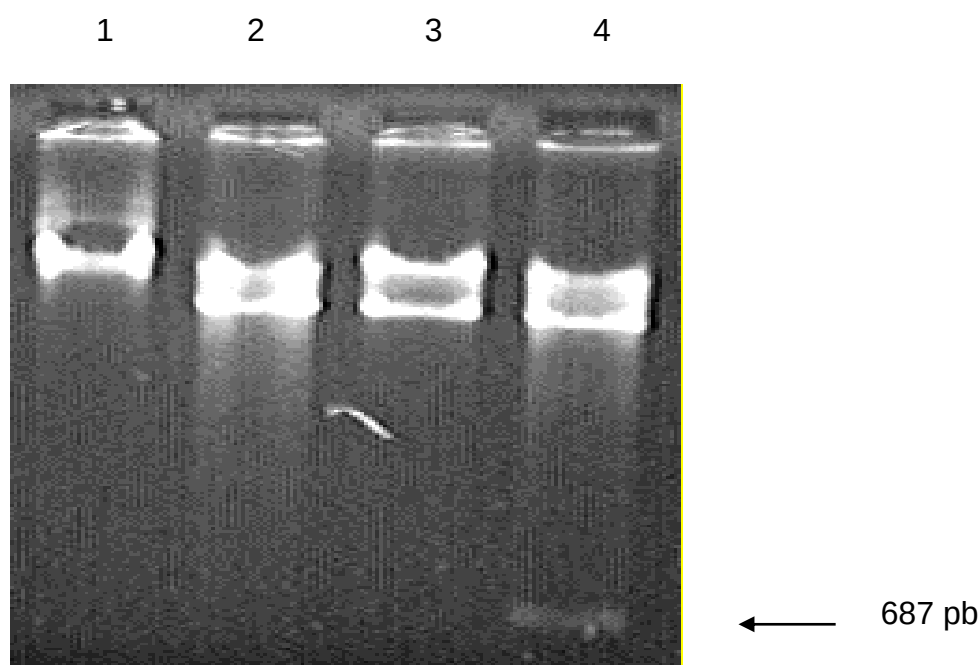


Figura 32. Gel de digestión del plásmido pTracer/*TRAIL*. Se utilizaron las enzimas BamH1 y Not1. **1)** Plásmido sin digerir. **2)** Plásmido linealizado con BamH1. **3)** Plásmido linealizado con Not1. **4)** Plásmido digerido por BamH1 y Not1. Se aprecia el inserto *TRAIL*.

Los resultados de la optimización de la adherencia de ADNp en M-PEI se muestran en la Figura 33. Los resultados muestran lo siguiente:

- En el control de sólo ADNp (carril 1) se observan las tres conformaciones estructurales naturales del plásmido, las cuales cada una migra a diferentes

velocidades en el gel debido a que diferente enrollamiento afecta a la migración a través de los poros del gel.

- La muestra con sólo nanopartículas (carril 2) no presenta bandas debido a que no tenía ADNp.
- Las muestras que contenían un exceso de nanopartículas (carriles 3 a 6) lograron inmovilizar todo el ADNp de la muestra. Esto se evidencia ya que el ADNp no migró a través del gel, sino que se quedó atrapado a la altura del pozo del gel debido al tamaño que el complejo presenta.
- En las muestras con poca cantidad de nanopartículas (carriles 7 a 10) parte de la muestra de ADNp se logró inmovilizar en las nanopartículas, quedando a la altura del pozo. Sin embargo, parte del ADNp quedó sin adherir por lo que migró de forma similar al control (carril 1) al no formar complejos.
- Se toma la concentración 1:5 w/w (ADNp:M-PEI), apreciada en el carril 6, como aquella óptima donde se utiliza la menor cantidad de nanopartículas para adherir todo el ADNp de la muestra.

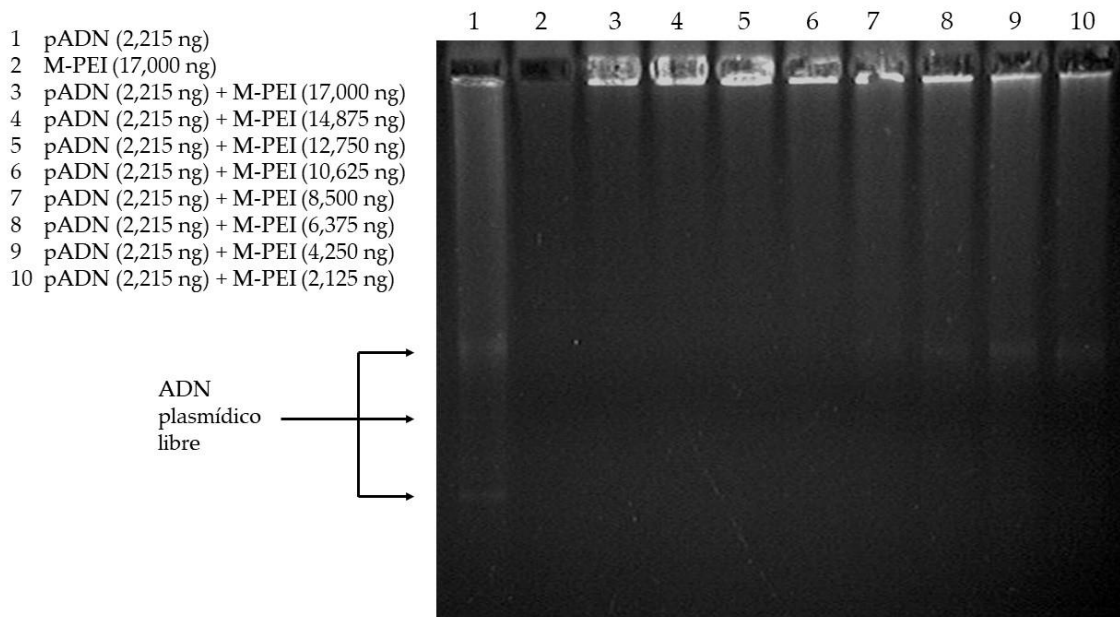


Figura 33. Gel de agarosa para evaluar la de adhesión de ADNp a M-PEI. **1)** Plásmido desnudo. **2)** Nanopartículas sin ADNp. **3)** Plásmido adherido a nanopartículas en las relaciones: 1:8 w/w (ADNp:M-PEI) **4)** 1:7 w/w (ADNp:M-PEI), **5)** 1:6 w/w (ADNp:M-PEI), **6)** 1:5 w/w (ADNp:M-PEI), **7)** 1:4 w/w (ADNp:M-PEI), **8)** 1:3 w/w (ADNp:M-PEI), **9)** 1:2 w/w (ADNp:M-PEI) y **10)** 1:1 w/w (ADNp:M-PEI). Se aprecia la concentración 1:5 como aquella donde se utiliza la menor cantidad de nanopartículas para inmovilizar todo el ADNp.

6.13. Adhesión de M-PEI con aptámero

Los resultados de la optimización de la adherencia del aptámero en M-PEI se muestran en la Figura 34. Los resultados muestran:

- El aptámero migra a través del gel de manera esperada (carril 1).
- En los carriles 2 y 3 hay un exceso de nanopartículas por lo que no se observa aptámero libre migrando a través del gel.
- En el carril 5 hay un exceso de aptámero por lo que se observa una banda de aptámero que migra de manera similar al control del carril 1.

- La concentración óptima nanopartícula-aptámero se encuentra en el carril 4, mostrando una banda a la altura del pozo, donde la concentración presentada es de 3.33 μL de nanopartículas M-PEI 600 $\mu\text{g/mL}$ con 2.08 μL de aptámero 5 μM . Este fenómeno se debe a que la cantidad adecuada de aptámero se inmoviliza en la superficie de la nanopartícula, saturándola.

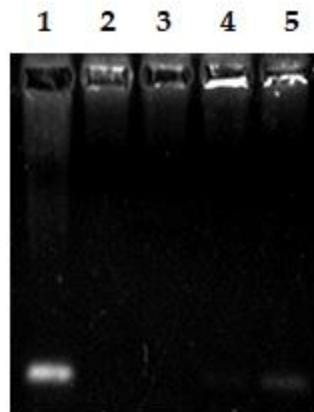


Figura 34. Gel de agarosa para evaluar la de adhesión de aptámero a M-PEI. **1)** aptámero 5 μM **2)** aptámero 5 μM + NPs 1000 $\mu\text{g/mL}$ **3)** aptámero 5 μM + NPs 800 $\mu\text{g/mL}$ **4)** aptámero 5 μM + NPs 600 $\mu\text{g/mL}$ **5)** Carril 5: aptámero 5 μM + NPs 400 $\mu\text{g/mL}$.

6.14. Adhesión de M-PEI con ADNp y aptámero

Los resultados de la optimización de la adherencia del aptámero y de plásmido en M-PEI se muestran en la Figura 35, en donde se observa que se logró funcionalizar las nanopartículas con el aptámero y con el ADNp.

- En el carril 1 se observa el plásmido migrando de manera normal, mostrando tres bandas que corresponden a las tres diferentes configuraciones estructurales del plásmido.

- En el carril 2 se observa el aptámero migrando de manera normal a través del gel.
- En el carril 3 se corrieron las nanopartículas solas, las cuales no dan señal fluorescente.
- En el carril 4 se observa la combinación de los tres elementos, el plásmido y el aptámero inmovilizados en la superficie de las nanopartículas, todos a la altura del pozo debido a su incapacidad de migrar a través del gel debido a sus cargas y tamaños.

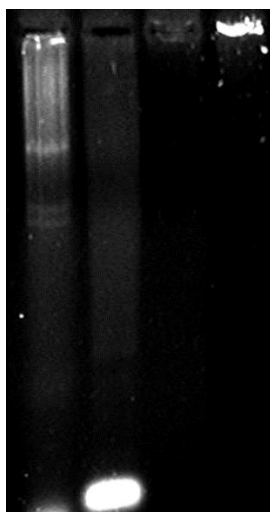


Figura 35. Se muestra en el Carril 1: ADNp 500 $\mu\text{g/mL}$; Carril 2: aptámero 12.5 μM ; Carril 3: NPs 2500 $\mu\text{g/mL}$; Carril 4: NPs 2500 $\mu\text{g/mL}$ + aptámero 12.5 μM + ADNp 500 $\mu\text{g/mL}$.

VII. DISCUSIÓN

Síntesis MNPs. En el análisis de la caracterización DRX de las MNPs, según la literatura consultada, los picos de difracción corresponden a la estructura de espinela cúbica de magnetita (Fe_3O_4). Otros autores reportan los mismos picos de difracción para la magnetita elaborada mediante coprecipitación (66–71). El tamaño obtenido es comparable con las referencias (70,71).

La caracterización FTIR se basa en las vibraciones de los enlaces químicos de la muestra analizada. Significa que FTIR evidencia los grupos funcionales presentes en la muestra (72). Las MNPs muestran una banda principal, también mostrada por otros autores (69,71), correspondiente a la banda Fe-O. Por limitaciones del equipo no se pudieron observar las bandas correspondientes a los 500 nm. Tanto el análisis XDR como el análisis FTIR proporcionan información sobre una metodología confiable para la síntesis de MNPs. El método elegido de síntesis se basó principalmente en la obtención de nanopartículas esféricas en tamaños de alrededor de 10 nm (58).

Caracterización física de las nanopartículas. Las características físicas de las nanopartículas son importantes para estimar la eficiencia de un nanosistema. Una propiedad que afecta a la eficiencia de la internalización de las nanopartículas en las células es la morfología geométrica de las nanopartículas. En 2006, Champion et al. analizaron la fagocitosis de nanopartículas con diferentes formas mediante

macrófagos alveolares. Encontraron que la morfología de las nanopartículas determina la complejidad de la estructura de actina que debe crear el macrófago sobre la superficie de la nanopartícula para iniciar la fagocitosis. Además, la forma de las nanopartículas se correlaciona con el tiempo de vida en la circulación sanguínea (73). En 2007, Geng et al. demostraron que las micelas poliméricas filamentosas, que duran una semana en la circulación sanguínea, tienen una vida útil más larga que las micelas poliméricas esféricas que duran de 2 a 3 días en circulación (74). Por otro lado, las formas esféricas en las nanopartículas se prefieren a las nanopartículas con morfologías afiladas porque no pueden dañar los vasos sanguíneos más pequeños mientras están en circulación (24).

En 2007, Choi et al. demostraron que el tamaño de las nanopartículas afecta a su eliminación del organismo. Encontró que las nanopartículas con un diámetro menor a 5.5 nm dan lugar a una rápida excreción urinaria. Su hallazgo nos motiva a diseñar nanopartículas mayores de 5.5. nm, sin embargo, nanopartículas muy grandes también tienen sus desventajas. Braet et al. demostraron, con técnicas de imagen del tejido hepático, que el endotelio funciona como una barrera biológica para las nanopartículas más grandes, desfavoreciendo a las nanopartículas con tamaños más grandes para cruzar las membranas y los epitelios. Además, otra desventaja de las partículas más grandes es que son reconocidas fácilmente por los macrófagos del sistema inmunológico, por lo que los mayores tamaños tienen un menor tiempo de circulación en la sangre (24). En 2011, Cabral et al. concluyeron que los tamaños de 30 a 100 nm son los ideales para penetrar en tumores altamente permeables (75). La técnica DLS se utilizó para analizar el tamaño de las

nanopartículas. Esta técnica mide el tamaño de las nanopartículas dispersas en una solución acuosa, por lo que si las nanopartículas generan aglomerados, el tamaño dado se correlaciona con el tamaño de los aglomerados (63). Mediante esta técnica se demostró que los nanosistemas de PEG/Tween 80 y con PEI tienen un tamaño cercano a los 100 nm, lo cual las hace ideales para permanecer en torrente sanguíneo y no ser excretadas rápidamente por los riñones o ser reconocidas por los macrófagos para su eliminación.

En cuanto al análisis del potencial Z las nanopartículas con carga positiva, además, son más susceptibles a ser internalizadas en las células cancerosas (76). Sin embargo, es importante evaluar la citotoxicidad de estas nanopartículas, ya que las nanopartículas con altas cargas positivas están correlacionadas con inducción de citotoxicidad y hemólisis.

Caracterización biológica de las nanopartículas. Debido a que en la literatura hay varios hallazgos de nanopartículas dañinas que afectan los sistemas circulatorio, digestivo, endocrino, inmune, integumentario, nervioso, reproductivo, respiratorio y urinario (77), es una prioridad analizar la citotoxicidad de las nanopartículas y el tipo de daño que causan. puede causar. Las células sanas que están expuestas al reactivo MTT lo reducen a cristales de formazán que son insolubles en agua y de color púrpura (78). Los estudios demuestran un rango útil de concentración para emplearlas con baja citotoxicidad en todas las nanopartículas probadas, por lo que estas pueden ser sugeridas en otro tipo de aplicaciones biomédicas que no involucre cargar ADNp en su superficie.

En cuanto a las tinciones de hematoxilina y eosina es necesario saber dónde están interaccionando las nanopartículas y que tipo de daños morfológicos pudieran ocasionar. Por ejemplo, la interacción entre las nanopartículas y el ADN celular, que se encuentra en el núcleo, puede causar varias lesiones en la molécula de ADN. Estas lesiones incluyen ruptura de doble cadena de ADN, mutaciones puntuales, una distribución incorrecta del ADN en la mitosis y aberraciones cromosómicas (79). Para determinar los mecanismos exactos en los que las nanopartículas ingresan a la célula, así como para determinar si existe una interacción entre el ADN de las células y las nanopartículas, se deben realizar más experimentos.

Determinar si las nanopartículas pueden causar lisis de eritrocitos en un modelo *ex vivo* es importante porque cuando la hemólisis ocurre *in vivo* puede causar anemia, ictericia y otras afecciones patológicas. Además, la hemoglobina liberada puede tener un efecto tóxico en el sistema renal y vascular.

Recubrimiento de MNPS con PEG/Tween 80. El polietilenglicol (PEG) es un polímero lineal sin carga formal, no tóxico y no electrostático (24) que ya se ha utilizado para recubrir nanopartículas de magnetita. Otro material que se puede combinar con nanopartículas de magnetita es el polisorbato tensioactivo no iónico Tween 80. Los modos de vibración identificados en el espectro FTIT de PEG y Tween 80 también se describen en otros informes (69,80–84), lo cual asegura una correcta funcionalización.

Además, el Tween 80 ha sido propuesto por algunos autores, como recubrimiento de nanopartículas debido a su capacidad de ser dirigido al cerebro después de una inyección intravenosa. Tween 80 es un surfactante no iónico biocompatible que se une con la lipoproteína plasmática Apo-E, que se une a receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en las células endoteliales microvasculares del cerebro. Esta propiedad confiere a las nanopartículas la propiedad de que puedan ser utilizadas para transportar sustancias, como por ejemplo: fármacos, al cerebro (85,86). Esta propiedad lo hace utilizable en otras aplicaciones diferentes a las propuestas en este proyecto. Las nanopartículas obtenidas en este proyecto tienen una carga ligeramente negativa, lo cual se debe a la carga de la magnetita. Esta carga casi neutra podría repercutir en la aglomeración de las mismas.

Recubrimiento de MNPS con CS/Tween 80. El espectro FTIR de MNPS-CS/Tween 80 muestra los modos de vibración correspondientes al quitosano, Tween 80 y el modo de vibración correspondiente a la magnetita (62,71,83,87,88). De acuerdo con la literatura consultada, los tamaños microscópicos obtenidos de estas nanopartículas no son viables para una aplicación en donde se desee ingresar la nanoestructura dentro de la célula, sin embargo, estas micropartículas pueden ser propuestas para una posible aplicación tópica en tratamientos dermatológicos. El quitosano combinado con nanopartículas magnetitas tiene un amplio campo de aplicación, pero especialmente han sido objeto de investigación en el suministro de medicamentos, proteínas, péptidos, genes, ADN y otros. Varios grupos de investigación han estudiado y desarrollado microesferas de quitosano como agente

hemostático (89), antibacteriano (90) y antiinflamatorio (91), así como un vehículo para la administración de fármacos (92) y vacunas (93).

Recubrimiento de MNPS con PEI. Las bandas obtenidas del FTIR coinciden con lo reportado por otros autores (63,94). Estas nanopartículas tuvieron todas las características físicas necesarias para ser empleadas en la aplicación deseada. Estas tienen tamaños nanométricos, de aproximadamente 100 nm. Su potencial Z fue positivo por lo cual fue posible adherirle tanto el plásmido terapéutico como el aptámero para dirigir el sistema a las células cancerosas. Se sugiere la evaluación de este nanosistema en células sanas y células provenientes de cáncer de mama HER2+.

VIII. CONCLUSIONES

Durante el presente proyecto se logró diseñar, sintetizar y caracterizar tres diferentes nanosistemas. El primer nanosistema compuesto por nanopartículas de magnetita recubiertas con PEG 3350/Tween 80, el segundo de microesferas de quitosano/Tween 80 cargadas con nanopartículas de magnetita, y el tercero de nanopartículas de magnetita recubiertas con PEI. Los componentes de cada sistema fueron analizados por XDR, EDS y FTIR. Se caracterizó la forma y tamaño de cada uno de los nanosistemas con los análisis SEM y DLS. Se caracterizó la citotoxicidad de todos los sistemas en células no cancerosas con la técnica de MTT, tinción de hematoxilina y eosina, así como con pruebas de hemólisis. Se obtuvieron las concentraciones a las cuales los nanosistemas son seguros de usar. Los autores consideran que debido a sus características físicas, el sistema MNPs-PEI presentó las propiedades requeridas para considerarse cómo vehículo para la administración de terapia dirigida contra HER2. A este se le logró optimizar la funcionalización en la superficie con un aptámero contra HER2, así como con el plásmido pTracer/*sTRAIL*. De este proyecto se publicaron los artículos que se adjuntan al final de los anexos, cada uno correspondiente a los diferentes nanosistemas.

Referencias

1. Instituto Nacional De Estadística y Geografía. "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)". INEGI México. 2018;1–13.
2. van Ramshorst MS, van Werkhoven E, Honkoop AH, Dezentjé VO, Oving IM, Mandjes IA, et al. Toxicity of dual HER2-blockade with pertuzumab added to anthracycline versus non-anthracycline containing chemotherapy as neoadjuvant treatment in HER2-positive breast cancer: The TRAIN-2 study. *Breast*. 2016;29:153–9.
3. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015;5(10):2929–43.
4. Qin SY, Zhang AQ, Cheng SX, Rong L, Zhang XZ. Drug self-delivery systems for cancer therapy. *Biomaterials* [Internet]. 2017;112:234–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.016>
5. Sun N feng, Liu Z ao, Huang W bai, Tian A ling, Hu S yuan. The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2014;89(3):352–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.10.006>
6. Vago R, Collico V, Zuppone S, Prosperi D, Colombo M. Nanoparticle-mediated delivery of suicide genes in cancer therapy. *Pharmacol Res* [Internet]. 2016;111:619–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.007>
7. Banerjee SM, MacRobert AJ, Mosse CA, Periera B, Bown SG, Keshtgar

- MRS. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. Breast [Internet]. 2017;31:105–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2016.09.016>
8. Ahmed S, Sami A, Xiang J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. Breast Cancer. 2015;22(2):101–16.
 9. Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. Targeting HER2 for the Treatment of Breast Cancer. Annu Rev Med. 2015;66(1):111–28.
 10. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to trastuzumab in breast cancer. Clin Cancer Res. 2009;15(24):7479–91.
 11. Zardavas D, Fouad TM, Piccart M. Optimal adjuvant treatment for patients with HER2-positive breast cancer in 2015. Breast [Internet]. 2015;24:S143–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.034>
 12. Sun N feng, Liu Z ao, Huang W bai, Tian A ling, Hu S yuan. The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy. Vol. 89, Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2014. p. 352–7.
 13. Sun T, Zhang YS, Pang B, Hyun DC, Yang M, Xia Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. Angew Chemie - Int Ed. 2014;53(46):12320–64.
 14. Vago R, Collico V, Zuppone S, Prosperi D, Colombo M. Nanoparticle-mediated delivery of suicide genes in cancer therapy. Pharmacol Res [Internet]. 2016;111:619–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.007>
 15. Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. Mol Cell Ther [Internet]. 2014;2(1):27. Available from:

<http://molcelltherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/2052-8426-2-27>

16. Lazarus GG, Singh M. In vitro cytotoxic activity and transfection efficiency of polyethyleneimine functionalized gold nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2016;145:906–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.072>
17. Karjoo Z, Chen X, Hatefi A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99:113–28.
18. Wang K, Kievit FM, Zhang M. Nanoparticles for cancer gene therapy: Recent advances, challenges, and strategies. *Pharmacol Res* [Internet]. 2016;114:56–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.016>
19. Oikonomou E, Pintzas A. The TRAIL of oncogenes to apoptosis. *BioFactors.* 2013;39(4):343–54.
20. Duarte S, Carle G, Faneca H, Lima MCP de, Pierrefite-Carle V. Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now? *Cancer Lett.* 2012;324(2):160–70.
21. Sun T, Zhang YS, Pang B, Hyun DC, Yang M, Xia Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew Chemie - Int Ed.* 2014;53(46):12320–64.
22. Xu X, Ho W, Zhang X, Bertrand N, Farokhzad O. Cancer nanomedicine: From targeted delivery to combination therapy. *Trends Mol Med* [Internet]. 2015;21(4):223–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2015.01.001>
23. Badrinath N, Heo J, Yoo SY. Viruses as nanomedicine for cancer. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:4835–47.

24. Roacho-Perez J, Gallardo-Blanco H, Sanchez-Dominguez M, Garcia-Casillas P, Chapa-Gonzalez C, Sanchez-Dominguez C. Nanoparticles for death-induced gene therapy in cancer (Review). *Mol Med Rep* [Internet]. 2017;1413–20. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2017.8091>
25. Zou W, Liu C, Chen Z, Zhang N. Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA. *Nanoscale Res Lett*. 2009;4(9):982–92.
26. Raju D, Vishwakarma RK, Khan BM, Mehta UJ, Ahmad A. Biological synthesis of cationic gold nanoparticles and binding of plasmid DNA. *Mater Lett* [Internet]. 2014;129:159–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2014.05.021>
27. Sanchez-Dominguez CN, Gallardo-Blanco HL, Rodriguez-Rodriguez AA, Vela-Gonzalez A V, Sanchez-Dominguez M. Nanoparticles vs cancer: a multifunctional tool. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2014;14(5):664–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444160>
28. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic. *Bioeng Transl Med*. 2016;1(1):10–29.
29. Gebremedhin S, Singh A, Koons S, Bernt W, Konopka K, Duzgunes N. Gene delivery to carcinoma cells via novel non-viral vectors: Nanoparticle tracking analysis and suicide gene therapy. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2014;60:72–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2014.03.003>
30. Gao S, Tian H, Xing Z, Zhang D, Guo Y, Guo Z, et al. A non-viral suicide gene delivery system traversing the blood brain barrier for non-invasive

- glioma targeting treatment. J Control Release [Internet]. 2016;243:357–69.
Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.10.027>
31. Eslaminejad T, Nematollahi-Mahani SN, Ansari M. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of the plasmid EGFP-p53 loaded on pullulan-spermine magnetic nanoparticles. J Magn Magn Mater [Internet]. 2016;402:34–43. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.11.037>
 32. McBride JW, Massey AS, McCaffrey J, McCrudden CM, Coulter JA, Dunne NJ, et al. Development of TMTP-1 targeted designer biopolymers for gene delivery to prostate cancer. Int J Pharm [Internet]. 2016;500(1–2):144–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.039>
 33. Wang K, Kievit FM, Zhang M. Nanoparticles for cancer gene therapy: Recent advances, challenges, and strategies. Pharmacol Res [Internet]. 2016;114:56–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.016>
 34. Guo J, O'Driscoll CM, Holmes JD, Rahme K. Bioconjugated gold nanoparticles enhance cellular uptake: A proof of concept study for siRNA delivery in prostate cancer cells. Int J Pharm [Internet]. 2016;509(1–2):16–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.027>
 35. Dizaj SM, Jafari S, Khosroushahi AY. A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors. Nanoscale Res Lett. 2014;9(1):1–9.
 36. Masood F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. Mater Sci Eng C [Internet]. 2016;60:569–78. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.067>
 37. Tirkey B, Bhushan B, Uday Kumar S, Gopinath P. Prodrug encapsulated

- albumin nanoparticles as an alternative approach to manifest anti-proliferative effects of suicide gene therapy. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2017;73:507–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.108>
38. Carrillo C, Suñé JM, Pérez-Lozano P, García-Montoya E, Sarrate R, Fàbregas A, et al. Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery systems: Determination of loading efficiency. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(6):775–83.
 39. Bor G, Mytych J, Zebrowski J, Wnuk M, Şanlı-Mohamed G. Cytotoxic and cytostatic side effects of chitosan nanoparticles as a non-viral gene carrier. *Int J Pharm*. 2016;513(1–2):431–7.
 40. Pourmortazavi SM, Sahebi H, Zandavar H, Mirsadeghi S. Fabrication of Fe₃O₄ nanoparticles coated by extracted shrimp peels chitosan as sustainable adsorbents for removal of chromium contaminates from wastewater: The design of experiment. *Compos Part B Eng* [Internet]. 2019;175(July):107130. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.107130>
 41. Zhou J, Deng W, Wang Y, Cao X, Chen J, Wang Q, et al. Cationic carbon quantum dots derived from alginate for gene delivery: One-step synthesis and cellular uptake. *Acta Biomater* [Internet]. 2016;42:209–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.021>
 42. Peng SF, Hsu HK, Lin CC, Cheng YM, Hsu KH. Novel PEI/Poly-γ-glutamic acid nanoparticles for high efficient siRNA and plasmid DNA co-delivery. *Molecules*. 2017;22(1):1–16.

43. Shi S, Shi K, Tan LW, Qu Y, Shen GB, Chu BY, et al. The use of cationic MPEG-PCL-g-PEI micelles for co-delivery of Msurvivin T34A gene and doxorubicin. *Biomaterials* [Internet]. 2014;35(15):4536–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.010>
44. Gaspar VM, Baril P, Costa EC, De Melo-Diogo D, Foucher F, Queiroz JA, et al. Bio-reducible poly(2-ethyl-2-oxazoline)-PLA-PEI-SS triblock copolymer micelles for co-delivery of DNA minicircles and Doxorubicin. *J Control Release* [Internet]. 2015;213:175–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.07.011>
45. Frede A, Neuhaus B, Klopffleisch R, Walker C, Buer J, Müller W, et al. Colonic gene silencing using siRNA-loaded calcium phosphate/PLGA nanoparticles ameliorates intestinal inflammation in vivo. *J Control Release*. 2016;222:86–96.
46. Sun J, Shi Z, Jia S, Zhang P. The force analysis for superparamagnetic nanoparticles-based gene delivery in an oscillating magnetic field. *J Magn Magn Mater* [Internet]. 2017;427(June 2016):85–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.018>
47. Yang Y, Yu C. Advances in silica based nanoparticles for targeted cancer therapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2016;12(2):317–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.018>
48. Islam MA, Park TE, Singh B, Maharjan S, Firdous J, Cho MH, et al. Major degradable polycations as carriers for DNA and siRNA. *J Control Release* [Internet]. 2014;193:74–89. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.055>

49. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;99:28–51. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
50. Casettari L, Vllasaliu D, Castagnino E, Stolnik S, Howdle S, Illum L. PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. *Prog Polym Sci* [Internet]. 2012;37(5):659–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.10.001>
51. Rivera-González H, Torres-Pacheco L, Álvarez-Contreras L, Olivas A, Guerra-Balcázar M, Valdez R, et al. Synthesis of Pd–Fe₃O₄ nanoparticles varying the stabilizing agent and additive and their effect on the ethanol electro-oxidation in alkaline media. *J Electroanal Chem* [Internet]. 2019;835(December 2018):301–12. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.01.044>
52. Li X, Meng F, Zhang S, Zhang M, Zeng Y, Zhong Q. The effect of polyethylene glycol modification on CrOx/TiO₂ catalysts for NO oxidation. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2019;578(April).
53. Ayubi M, Karimi M, Abdpour S, Rostamizadeh K, Parsa M, Zamani M, et al. Magnetic nanoparticles decorated with PEGylated curcumin as dual targeted drug delivery: Synthesis, toxicity and biocompatibility study. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2019;104(June):109810. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109810>
54. Sun L, Wu Q, Peng F, Liu L, Gong C. Strategies of polymeric nanoparticles

- for enhanced internalization in cancer therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015;135:56–72.
55. Xiangbao Y, Linqun W, Mingwen H, Fan Z, Kai W, Xin Y, et al. Humanized anti-VEGFR-2 ScFv-As₂O₃-stealth nanoparticles, an antibody conjugate with potent and selective anti-hepatocellular carcinoma activity. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2014;68(5):597–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2014.04.006>
 56. Glinka EM. Eukaryotic expression vectors containing genes encoding plant proteins for killing of cancer cells. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2013;37(6):1014–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2013.09.013>
 57. Borrego J. Células madre mesenquimales humanas modificadas genéticamente para expresar TRAIL e interferon B con efecto antitumoral in vitro. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2014.
 58. Chapa Gonzalez C, Roacho Pérez JA, Martínez Pérez CA, Olivas Armendáriz I, Jimenez Vega F, Castrejon Parga KY, et al. Surface modified superparamagnetic nanoparticles: Interaction with fibroblasts in primary cell culture. *J Alloys Compd* [Internet]. 2015;615(S1):S655–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.01.155>
 59. Veronese FM, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs*. 2008;22(5):315–29.
 60. Mohammed L, Gomaa HG, Ragab D, Zhu J. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology* [Internet]. 2017;30:1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.partic.2016.06.001>

61. Múzquiz-Ramos EM, Guerrero-Chávez V, Macías-Martínez BI, López-Badillo CM, García-Cerda LA. Synthesis and characterization of maghemite nanoparticles for hyperthermia applications. *Ceram Int* [Internet]. 2014;41(1):397–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.08.083>
62. Khan Y, Durrani SK, Siddique M, Mehmood M. Hydrothermal synthesis of alpha Fe₂O₃ nanoparticles capped by Tween-80. *Mater Lett* [Internet]. 2011;65(14):2224–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2011.04.068>
63. Megías R, Arco M, Ciriza J, Saenz del Burgo L, Puras G, López-Viota M, et al. Design and characterization of a magnetite/PEI multifunctional nanohybrid as non-viral vector and cell isolation system. *Int J Pharm* [Internet]. 2017;518(1–2):270–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.042>
64. Macías-Martínez BI, Cortés-Hernández DA, Zugasti-Cruz A, Cruz-Ortíz BR, Múzquiz-Ramos EM. Heating ability and hemolysis test of magnetite nanoparticles obtained by a simple co-precipitation method. *J Appl Res Technol* [Internet]. 2016;14(4):239–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jart.2016.05.007>
65. Xie S, Zhang B, Wang L, Wang J, Li X, Yang G, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with different polymers and their MRI contrast effects in the mouse brains. *Appl Surf Sci* [Internet]. 2015;326:32–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.11.099>
66. Aghazadeh M, Ganjali MR. One-step electro-synthesis of Ni²⁺-doped

- magnetite nanoparticles and study of their supercapacitive and superparamagnetic behaviors. *J Mater Sci Mater Electron* [Internet]. 2018;29(6):4981–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10854-017-8459-0>
67. Habibi N. Preparation of biocompatible magnetite-carboxymethyl cellulose nanocomposite: Characterization of nanocomposite by FTIR, XRD, FESEM and TEM. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 2014;131:55–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.039>
 68. Gao M, Li W, Dong J, Zhang Z, Yang B. Synthesis and Characterization of Superparamagnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ Core-Shell Composite Nanoparticles. *World J Condens Matter Phys* [Internet]. 2011;01(02):49–54. Available from: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/wjcmp.2011.12008>
 69. Sarkar T, Rawat K, Bohidar HB, Solanki PR. Electrochemical immunosensor based on PEG capped iron oxide nanoparticles. *J Electroanal Chem* [Internet]. 2016;783:208–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.11.019>
 70. Lal M, Verma SR. Synthesis and Characterization of Poly Vinyl Alcohol Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. *Macromol Symp* [Internet]. 2017;376(1):1700017. Available from: <https://doi.org/10.1002/masy.201700017>
 71. Anbarasu M, Anandan M, Chinnasamy E, Gopinath V, Balamurugan K.

- Synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) coated Fe₃O₄ nanoparticles by chemical co-precipitation method for biomedical applications. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 2015;135:536–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.07.059>
72. Khalil MI. Co-precipitation in aqueous solution synthesis of magnetite nanoparticles using iron(III) salts as precursors. *Arab J Chem* [Internet]. 2015;8(2):279–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.02.008>
 73. Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006;103(13):4930–4. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0600997103>
 74. Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, et al. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol* [Internet]. 2007 Mar 25;2:249. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2007.70>
 75. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol* [Internet]. 2011 Oct 23;6:815. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.166>
 76. Thurston G, McLean JW, Rizen M, Baluk P, Haskell a, Murphy TJ, et al. Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 1998;101(7):1401–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=508718&tool=pmc>

entrez&rendertype=abstract

77. Jiang Z, Shan K, Song J, Liu J, Rajendran S, Pugazhendhi A, et al. Toxic effects of magnetic nanoparticles on normal cells and organs. *Life Sci* [Internet]. 2019;220(February):156–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.056>
78. Gomez Perez M, Fourcade L, Mateescu MA, Paquin J. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Anal Biochem* [Internet]. 2017;535:43–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.027>
79. George JM, Magogotya M, Vetten MA, Buys A V., Gulumian M. An investigation of the genotoxicity and interference of gold nanoparticles in commonly used in vitro mutagenicity and genotoxicity assays. *Toxicol Sci*. 2017;156(1):149–66.
80. Khanna L, Verma NK. Study on novel, superparamagnetic and biocompatible PEG/KFeO₂nanocomposite. *J Appl Biomed* [Internet]. 2015;13(1):23–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jab.2014.05.003>
81. Zargar T, Kermanpur A, Labbaf S, Houreh AB, Esfahani MHN. PEG coated Zn_{0.3}Fe_{2.7}O₄nanoparticles in the presence of α -Fe₂O₃phase synthesized by citric acid assisted hydrothermal reduction process for magnetic hyperthermia applications. *Mater Chem Phys* [Internet]. 2018;212:432–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.03.054>
82. Wu X, Wang W, Li F, Khaimanov S, Tsidaeva N, Lahoubi M. PEG-assisted hydrothermal synthesis of CoFe₂O₄nanoparticles with enhanced selective

adsorption properties for different dyes. Appl Surf Sci [Internet].

2016;389:1003–11. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.08.053>

83. Fu X, Kong W, Zhang Y, Jiang L. RSC Advances Novel solid – solid phase change materials with biodegradable trihydroxy surfactants for thermal energy storage. 2015;68881–9.
84. Atabaev TS. PEG-Coated Superparamagnetic Dysprosium-Doped Fe₃O₄ Nanoparticles for Potential MRI Imaging. 2018;299–303.
85. Yadav M, Parle M, Sharma N, Dhingra S, Raina N. Brain targeted oral delivery of doxycycline hydrochloride encapsulated Tween 80 coated chitosan nanoparticles against ketamine induced psychosis : behavioral , biochemical , neurochemical and histological alterations in mice. Drug Deliv [Internet]. 2017;0(0):1429–40. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1377315>
86. Huang L. Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on PCL-Tween 80 copolymer for cancer treatment. 2011;2679–88.
87. Lotfi S, Ghaderi F, Bahari A, Mahjoub S. Preparation and Characterization of Magnetite–Chitosan Nanoparticles and Evaluation of Their Cytotoxicity Effects on MCF7 and Fibroblast Cells. J Supercond Nov Magn. 2017;30(12):3431–8.
88. Hern A, Jaramillo-martínez S, Vargas-requena C, Rodríguez-g C. Heliyon Effect of extrapallial protein of *Mytilus californianus* on the process of in vitro biomineralization of chitosan scaffolds. 2019;5(December 2018):0–7.
89. Liu L, Lv Q, Zhang Q, Zhu H, Liu W, Deng G, et al. Preparation of

Carboxymethyl Chitosan Microspheres and Their Application in Hemostasis.

Disaster Med Public Health Prep. 2017;11(6):660–7.

90. Shen J, Jin B, Qi Y cheng, Jiang Q ying, Gao X feng. Carboxylated chitosan/silver-hydroxyapatite hybrid microspheres with improved antibacterial activity and cytocompatibility. Mater Sci Eng C [Internet]. 2017;78:589–97. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.100>
91. Cosco D, Failla P, Costa N, Pullano S, Fiorillo A, Mollace V, et al. Rutin-loaded chitosan microspheres: Characterization and evaluation of the anti-inflammatory activity. Carbohydr Polym [Internet]. 2016;152:583–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.039>
92. Yu HL, Feng ZQ, Zhang JJ, Wang YH, Ding DJ, Gao YY, et al. The Evaluation of Proanthocyanidins/Chitosan/Lecithin Microspheres as Sustained Drug Delivery System. Biomed Res Int. 2018;2018.
93. Arthanari S, Mani G, Peng MM, Jang HT. Chitosan-HPMC-blended microspheres as a vaccine carrier for the delivery of tetanus toxoid. Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol. 2016;44(2):517–23.
94. Coleman AW, Miele P. Reversible multi polyelectrolyte layers on gold nanoparticles. 2012;(June).

Anexo 1: Síntesis de nanopartículas de magnetita

1. Pesar 1.623 gr de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y disolverlo con imán en 90 mL de agua destilada
2. Pesar 0.76 gr de $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y disolverlo con imán en 90 mL de agua destilada
3. A cada una de las dos soluciones anteriores se les lleva a 100 mL con agua destilada en matraz aforado.
4. En vaso de precipitado de 500 mL se mezclan las dos soluciones anteriores y se agitan con imán en platina de calentamiento encendida. Con termómetro de mercurio se revisa el aumento de temperatura.
5. Al llegar a 50° C, se agrega por inyección rápida 100 ml de hidróxido de amonio.
6. Se sigue agitando y calentando hasta que el termómetro marque 80° C.
7. Se retiran las nanopartículas de la platina y se dejan enfriar a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. El precipitado de las nanopartículas de magnetita se lava tres veces con agua destilada y se recupera por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos.
9. Se revisa el pH del sobrenadante del último lavado con tiras para medir pH. Los lavados se repiten hasta que el pH final del sobrenadante sea de 7.
10. El precipitado final se seca a 50 °C durante 24 horas.
11. Las nanopartículas se pulverizan en mortero de ágata y se guardan para su funcionalización.

Anexo 2: Recubrimiento de nanopartículas de magnetita con PEG/Tween 80

1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar 1.75 mL de Tween 80 en 25 ml de agua destilada.
2. Usar el procesador ultrasónico para dispersar 25 mg de nanopartículas de magnetita en la solución de Tween 80 al 7% preparada en el paso anterior. La dispersión se lleva a cabo durante 10 minutos a una amplitud del 80%.
3. Añadir 50 mg de PEG 3350. Continuar con la dispersión en procesador ultrasónico por 5 minutos más (amplitud del 80%).
4. Se ajusta el pH a 9.
 - Se mide el pH utilizando potenciómetro (la punta del potenciómetro nunca se deja dentro de la solución cuando el procesador ultrasónico este encendido).
 - El pH se eleva agregando gotas de hidróxido de amonio. Estas gotas se agregan con el procesador ultrasónico encendido, para homogenizar el pH inmediatamente una vez que la gota de hidróxido de amonio toca la solución de nanopartículas.
5. Las nanopartículas se centrifugan a 3000 rpm durante 5 minutos.
6. El precipitado de las nanopartículas se lava tres veces con agua destilada y se recupera por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos.
7. Se revisa el pH del sobrenadante del último lavado con tiras para medir pH. Los lavados se repiten hasta que el pH final del sobrenadante sea de 7.
8. El precipitado final se seca a 50 °C durante 24 horas.

Anexo 3: Recubrimiento de MNPs con CS/Tween 80

Ácido acético glacial al 2% (100 mL)

- En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar 2 mL de ácido acético glacial en 90 mL de agua destilada. Llevar a 100 mL en matraz aforado.

Recubrimiento de nanopartículas de magnetita con CS/Tween 80

1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar 3.15 mL de Tween 80 en 45 mL de agua destilada.
2. Usar el procesador ultrasónico para dispersar 90 mg de nanopartículas de magnetita en la solución de Tween 80 al 7% preparada en el paso anterior. La dispersión se lleva a cabo durante 10 minutos a una amplitud del 80%.
3. Por otra parte, disolver hasta la homogenización en platina de agitación con ayuda de un imán, 90 mg de CS peso molecular medio en 45 mL de ácido acético glacial al 2%.
4. La solución de CS se añade gota a gota a la solución de las nanopartículas de magnetita. Para mejorar la dispersión del quitosano, mientras las gotas de quitosano son agregadas, la solución de nanopartículas es mezclada con el procesador ultrasónico (amplitud 80%).
5. Se ajusta el pH a 5.5.
 - Se mide el pH utilizando potenciómetro (la punta del potenciómetro nunca se deja dentro de la solución cuando el procesador ultrasónico este encendido).
 - El pH se eleva agregando gotas de hidróxido de amonio. Estas gotas se agregan con el procesador ultrasónico encendido, para homogenizar el pH inmediatamente una vez que la gota de hidróxido de amonio toca la solución de nanopartículas.
6. Las nanopartículas se centrifugan a 14,000 rpm durante 10 minutos.
7. El precipitado de las nanopartículas se lava tres veces con agua destilada y se recupera por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos.
8. Se revisa el pH del sobrenadante del último lavado con tiras para medir pH. Los lavados se repiten hasta que el pH final del sobrenadante sea de 7.
9. El precipitado final se seca a 50 °C durante 24 horas.

Anexo 4: Recubrimiento de MNPs con PEI

HCl 0.5 N (100 mL)

- En una platina de agitación con imán, homogenizar 4.166 mL de HCl en 90 mL de agua destilada. Llevar a 100 mL en matraz aforado.

Ácido cítrico 0.1 N (100 ml)

- En una platina de agitación con imán, homogenizar 0.6404 gr de ácido cítrico en 90 mL de agua destilada. Llevar a 100 mL en matraz aforado.

PEI 50 mg/mL (100 mL)

1. Pesar en balanza un vaso de precipitado. Ajustar su peso a cero.
2. El PEI tiene una consistencia viscosa, por lo que se tomará con espátula una porción de PEI y se colocará en el vaso de precipitado para pesarlo.
 - En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar el PEI en x mL de agua destilada. Siendo $x = (\text{gr de PEI}) / 50$

Recubrimiento de las nanopartículas de magnetita con PEI

1. Dispersar 25 mg de nanopartículas de magnetita en 30 mL de ácido cítrico 0.1 N, usando el procesador ultrasónico (amplitud 80%) durante 40 minutos.
2. Se ajustó el pH a 7.
 - Se mide el pH utilizando potenciómetro (la punta del potenciómetro nunca se deja dentro de la solución cuando el procesador ultrasónico este encendido).
 - El pH se baja agregando gotas de HCl 0.5 N. Estas gotas se agregan con el procesador ultrasónico encendido, para homogenizar el pH inmediatamente una vez que la gota de hidróxido de amonio toca la solución de nanopartículas.
3. Se agregan 375 µl de PEI 50 mg/ml. Se agregan mientras el procesador ultrasónico este encendido. Se deja homogenizar por 5 minutos más.
4. El pH final se ajustó a 7 como en el paso #2.
5. Las nanopartículas se separan al fondo del vaso con un imán, eliminando el sobrenadante y dejando secar el precipitado a 50 °C durante 24 horas.

Anexo 5: Preparación de las muestras para análisis FT-IR

1. Colocar cristal limpio en el equipo FT-IR (usar siempre guantes). Las letras del cristal van apuntando siempre hacia enfrente.
2. El lector del equipo baja dando vueltas y se coloca a una altura entre 6 y 8.
3. Se prende el software OMNIC. Se selecciona Smart performer.
4. Se selecciona collect → Collect background
5. Una vez que se mida el blanco se coloca la muestra sobre el cristal. La cantidad necesaria es mínima.
6. Se realiza la medición y se guarda el espectro (spa) en Excel (csv).

Anexo 6: Preparación de las muestras para análisis DLS

- Las nanopartículas que se encontraban en solución posterior a su síntesis fueron analizadas de esa forma.
- Aquellas que se encontraban en sólido se dispersaron con ayuda del procesador ultrasonico durante 5 minutos (40 µg/ml) en agua ultra pura previamente filtrada por poro de 220 nm.

Análisis de las muestras en DLS (Nanotracs Wave II, Microtracs)

1. Conectar equipo a computadora con cable.
2. Encender equipo Nanotracs
3. La celda del Nanotracs siempre tiene agua. Se retira con pipeta pasteur y se enjuaga con agua destilada limpia. Se deja agua limpia dentro de la celdilla.
4. Se enciende software "Microtracs".
5. ID → Nombre y datos de la muestra
6. SOP → Seleccionar material. En equipo UACJ se selecciona "Magnetita Erick" donde están cargados los datos de la magnetita (Índice de refracción de 2.42).
7. BKG → Se mide el background, Si el agua de la celdilla está limpia dejará hacer el análisis. De lo contrario repetir paso #3 hasta que el equipo marque que el BKG está listo.
8. Se retira el agua de la celdilla y se coloca la muestra a medir hasta que se cubran los electrodos.
9. Se realiza la medición, se guardan los datos como imagen, como pdf y se hacen capturas de pantalla de todos los datos.

Anexo 7: Medios de cultivo para bacterias

NaOH 2 M (100 mL)

- En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar 8 gr de NaOH en 90 mL de agua destilada. Llevar a 100 mL en matraz aforado.

Ampicilina 10 mg/ml (10 mL)

- En un tubo estéril homogenizar 100 mg de ampicilina en 10 mL de agua destilada estéril.

Agar Luria Bertani (100 mL)

1. Pesar:
 - 1 gr de Triptona
 - 0.5 gr de Extracto de levadura
 - 1 gr de NaCl
 - 3 gr de Agar
2. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar los reactivos en 90 mL de agua destilada. Agregar un poco de calor para evitar solidificación de agar.
3. Sin dejar de agitar con imán, ajustar pH a 7.4 agregando gotas de NaOH 2 M, utilizando potenciómetro.
4. Aforar con agua destilada a 100 mL.
5. Esterilizar en autoclave.
6. Al salir de autoclave, dejar enfriar hasta que el frasco se pueda tomar con las manos sin quemarse (si se deja enfriar de más el agar solidificará), y en mechero agregar 1 mL de ampicilina 10 mg/mL.
7. En mechero, vaciar en placas de Petri antes de que el agar solidifique.
8. Dejar enfriar a 4° C y preservar en refrigeración.

Luria Bertani líquido (100 mL)

1. Pesar:
 - 1 gr de Triptona
 - 0.5 gr de Extracto de levadura
 - 1 gr de NaCl

2. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar los reactivos en 90 mL de agua destilada.
3. Sin dejar de agitar con imán, ajustar pH a 7.4 agregando gotas de NaOH 2 M, utilizando potenciómetro.
4. Aforar con agua destilada a 100 mL.
5. Esterilizar en autoclave.
6. Al salir de autoclave, dejar enfriar y, en mechero, agregar 1 mL de ampicilina 10 mg/mL.
7. Preservar a 4° C.

Caldo para congelar bacterias (10 mL)

1. Filtrar aproximadamente 5 mL de glicerol utilizando jeringa con filtro de 0.22 µm.
2. En mechero, con micropipeta medir 3 mL de glicerol filtrado y mezclar con 7 mL de Luria Bertani líquido.
3. Preservar a 4° C.

Congelar bacterias

1. Centrifugar las bacterias para preservar a 12,000 rpm por 4 minutos.
2. Disolver en caldo para congelar bacterias
3. Preservar a -80° C.

Anexo 8: Mini Prep

HCl 0.5 N (100 mL)

- En una platina de agitación con imán, homogenizar 4.166 mL de HCl en 90 mL de agua destilada. Llevar a 100 mL en matraz aforado.

NaOH 2 M (100 mL)

- En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar 8 gr de NaOH en 90 mL de agua destilada. Llevar a 100 mL en matraz aforado.

Tris-HCl 2 M (100 mL)

1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar 24.22 gr de Tris en 80 mL de agua destilada.
2. Sin dejar de agitar con imán, ajustar pH a 8 agregando gotas de HCl 0.5 N, utilizando potenciómetro.
3. Aforar a 100 mL en matraz aforado y autoclavar.

EDTA 500 mM (100 mL)

1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar 18.61 gr de EDTA en 80 mL de agua destilada.
2. Sin dejar de agitar con imán, ajustar pH a 8 agregando gotas de NaOH 2 M, utilizando potenciómetro.
3. Aforar a 100 mL en matraz aforado y autoclavar.

SDS al 10% (100 mL)

1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar 10 gr de SDS en 80 mL de agua destilada estéril.
2. Aforar a 100 mL, usando agua destilada estéril, en matraz aforado.

Solución I Miniprep (100 mL)

1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar en 80 mL de agua destilada:
 - 0.9 gr de glucosa
 - 1.25 ml de Tris-HCl 2M
 - 2 mL de EDTA 500 Mm

2. Aforar a 100 mL en matraz aforado y autoclavar.

Solución II Miniprep (100 mL)

- Esta solución se emplea recién preparada
1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar en 80 mL de agua destilada:
 - 10 mL de NaOH 2 M
 - 10 mL de SDS al 10%
 2. Aforar a 100 mL en matraz aforado.

Solución III Miniprep (100 mL)

1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar 57.8 gr de acetato de amonio en 80 mL de agua destilada estéril.
2. Aforar a 100 mL, usando agua destilada estéril, en matraz aforado.

TE 1x/RNAsa 20 µg/ml (100 mL)

1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar en 80 mL de agua destilada:
 - 0.5 mL de Tris-HCl 2 M
 - 0.2 mL de EDTA 500 mM
2. Aforar a 100 mL en matraz aforado y autoclavar.
3. Agregar 2 mg de RNAsa.

Extracción ADNp por Miniprep

1. Centrifugar 1.5 mL de bacterias a 14,000 rpm por 1 minuto en un tubo de microcentrifuga de fondo cónico.
2. Repetir el paso para obtener un botón celular de un total de 3 mL centrifugados.
3. Resuspender en 200 µL de Solución I. Mezclar en vortex.
4. Incubar 5 minutos en hielo.
5. Añadir 400 µL de Solución II. Mezclar inmediatamente por inversión de 3 a 6 veces (evitar que se formen burbujas).

6. Incubar en hielo por 5 minutos.
7. Agregar 300 μ L de Solución III. Mezclar cuidadosamente por unos segundos.
8. Incubar 20 minutos en hielo.
9. Centrifugar 9 minutos a 14,000 rpm.
10. Colectar el sobrenadante claro, y transferirlo a un tubo nuevo de 1.5 mL.
11. Añadir 650 μ L de isopropanol.
12. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
13. Centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos.
14. Lavar pastilla con 1 mL de etanol al 70%.
15. Centrifugar 3 minutos a 14,000 rpm.
16. Lavar nuevamente con etanol al 70%
17. Centrifugar 3 minutos a 14,000 rpm.
18. Lavar con 1 mL de etanol al 100%.
19. Secar la pastilla 15 minutos en una estufa a 37°C.
20. Disolver la pastilla en 100 μ L de TE 1x/RNAsa 20 μ g/ml.
21. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente
22. Almacenar a -20° C.

Anexo 9: Caracterización del plásmido con enzimas

1. Mezclar en un microtubo:

Tubo 1	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
	1 μ L de buffer universal	1 μ L de buffer universal	1 μ L de buffer universal
2 μ L de ADNp (1,000 ng/ μ L)	2 μ L de ADNp (1,000 ng/ μ L)	2 μ L de ADNp (1,000 ng/ μ L)	2 μ L de ADNp (1,000 ng/ μ L)
8 μ L de agua destilada	6.8 μ L de agua destilada	6.8 μ L de agua destilada	6.6 μ L de agua destilada
	0.2 μ L de enzima BamH1	0.2 μ L de enzima Not1	0.2 μ L de enzima BamH1
			0.2 μ L de enzima Not1

2. Incubar a 37° C por 16 horas.
3. Correr electroforesis en gel de agarosa

EDTA 500 mM (100 mL)

1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar 18.61 gr de EDTA en 80 mL de agua destilada.
2. Sin dejar de agitar con imán, ajustar pH a 8 agregando gotas de NaOH 2 M, utilizando potenciómetro.
3. Aforar a 100 mL en matraz aforado y autoclavar.

TBE 1X (1 L)

1. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar en 800 mL de agua destilada:
 - 10.8 gr de Tris-Base
 - 5.5 gr de ácido bórico
 - 4 ml de EDTA 500 mM pH 8
2. Aforar a 1 L en matraz aforado.

Jugo azul-Gel Red

Mezclar en un microtubo:

- 5 μ L de Red Gel
- 350 μ L de Orange 6x
- 145 μ L de Jugo azul 6x

Electroforesis en gel de agarosa

1. Preparar un gel de agarosa al 1% (Disolver en microondas 0.3 gr de agarosa en 30 mL de TBE 1X)
2. A cada pozo agregar 8.5 μ L de la muestra mezclada con 1.5 μ L de Jugo azul-Gel Red.
3. Correr el gel a 90 V durante 1 hora.
4. Verificar resultados en transiluminador.

Anexo 10: Buffer PBS 1X

HCl 0.5 N (100 mL)

- En una platina de agitación con imán, homogenizar 4.166 mL de HCl en 90 mL de agua destilada. Llevar a 100 mL en matraz aforado.

Buffer PBS 1X (1 L)

1. Pesar:
 - 0.2 gr de KCl
 - 0.2 gr de KH_2HPO_4
 - 8 gr de NaCl
 - 2.16 gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2. En una platina de agitación, con ayuda de un imán, homogenizar los reactivos en 900 mL de agua destilada.
3. Sin dejar de agitar con imán, ajustar pH a 7.4 agregando gotas de HCl 0.5 N, utilizando potenciómetro.
4. Aforar con agua destilada a 1 L.
5. Esterilizar en autoclave.
6. Preservar a 4° C.