

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN PARA EL ENVÍO DIRIGIDO Y
ACTIVACIÓN DE GENES EN EL PULMÓN

Por:

Biól. Cynthia Aracely Alvizo Báez

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

JULIO, 2012

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Generalidades de nanopartículas.....	3
2.2 Nanopartículas de quitosán.....	4
2.2.1 Caracterización del quitosán como polímero	
Biodegradable.....	5
2.2.2 Métodos para generar nanopartículas de quitosán.....	6
2.2.2.1 Gelación iónica.....	6
2.2.2.2 Coacervación.....	6
2.3 Nanopartículas acarreadoras de genes.....	7
2.3.1 Nanopartículas de quitosán.....	7
2.3.2 Nanopartículas magnéticas.....	10
2.4 Aplicación de los vectores de DNA.....	11
2.4.1 Vacunas.....	12
2.4.1.1 Vacunas vivas atenuadas.....	12
2.4.1.2 Vacunas de subunidades antigénicas.....	12
2.4.1.3 Vacunas recombinantes.....	13
2.4.1.4 Vacunas de ADN desnudo.....	13
2.4.2 Sistemas para hacer más eficientes los vectores de ADN....	15
2.4.3 Terapia génica.....	17
2.5 Promotores para activar genes.....	17
2.5.1 Promotores virales.....	18
2.5.2 Promotores inducibles.....	18
2.5.2.1 Promotores inducibles por pH.....	18
2.5.2.2 promotores inducibles por calor.....	18

2.5.2.3 Promotores inducibles por hipoxia.....	19
2.5.2.4 Promotores inducibles por antibióticos.....	19
2.5.2.5 Promotores inducibles por hormonas.....	19
2.5.2.6 Promotores inducibles por campo magnético.....	19
2.6 Aplicación del envío dirigido de genes al pulmón.....	20
2.6.1 Problemas a resolver.....	20
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos particulares.....	23
5.MÉTODOS.....	24
5.1. Materiales.....	25
5.2 Descripción del plásmido pCEM-luc.....	25
5.3 Transformación de bacterias competentes DH5 α	27
5.4 Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (miniprep).....	27
5.5 Purificación de pCEM-luc a gran escala (maxiprep).....	28
5.6 Preparación de células competentes.....	29
5.7 Caracterización del plásmido pCEM-luc.....	29
5.8 Producción de nanopartículas magnéticas de quitosán con el plásmido Pcem-Luc.....	29
5.9 Caracterización de las nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán y un vector de ADN atrapado.....	32
5.9.2 Forma y tamaño por microscopía electrónica de transmisión.....	32
5.9.3 Forma y tamaño por microscopía de fuerza atómica.....	32
5.9.4 Prueba de liberación de ADNp de nanopartículas.....	32
5.9.5 Prueba de protección de ADNp.....	32
5.9.6 Análisis de formación de complejos por pruebas de Retardo.....	33
5.10 Determinación del efecto de complejos formados por nanopartículas magnéticas de quitosán para inducir la expresión del gene de luciferasa bajo la influencia de un campo magnético.....	33
5.10.1 Transfección.....	33
5.10.2 Exposición in vitro a campo magnético (CEM).....	33

5.10.3 Lectura de luciferasa en la línea celular B16F10.....	34
5.11 Exposición in vivo a campo magnético.....	36
5.12 Procesamiento estadístico.....	39
6. RESULTADOS	40
6.1 Formación de las nanopartículas de quitosán, morfología y caracterización.....	41
6.2 Protección de las nanopartículas y liberación invitro de ADNp.....	42
6.3 Eficiencia de encapsulación de las nanopartículas.....	44
6.4 Medición del potencial zeta.....	44
6.5 Transfecciones en la línea celular B16F10.....	45
6.6 Transfecciones in vivo.....	46
7. DISCUSION.....	51
8. CONCLUSIONES.....	54
LITERATURA CITADA	55

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Propiedades comparativas de las vacunas de ADN, vacunas atenuadas y vacunas recombinantes	15
II. Potencial Zeta de las nanopartículas.....	45
III. Resultados del análisis de la transfección in vivo utilizando el plásmido desnudo sin exposición a magneto.....	47
IV. Desviación estándar de los resultados obtenidos con el plásmido desnudo sin presencia de campo magnético.....	47
V. Resultados del análisis de la transfección in vivo utilizando el plásmido desnudo con exposición a magneto.....	47
VI. Desviación estándar de los resultados obtenidos con el plásmido desnudo con presencia de campo magnético	48
VII. Resultados del análisis de la transfección in vivo realizadas con las nanopartículas de quitosan y plásmido con exposición a magneto.....	48
VIII. Desviación estándar de los resultados obtenidos con las nanopartículas de quitosan y plásmido con exposición a magneto.....	48
IX. Prueba de anova de Fisher donde se asocian las variables y su significancia.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura y obtención de quitosán a partir de la quitina.....	5
2. Nanopartículas magnéticas para transfección de genes.....	8
3. Mecanismo general de incorporación de complejos entre plásmidos y Policaciones.....	11
4. Representación de la estructura de un vector plasmídico empleado como vacuna de ADN.....	17
5. Esquema de la estrategia general de la metodología.....	24
6. Mapa del vector pCEM –Luc.....	26
7. Estructura química del quitosán y TPP.....	31
8. Representación esquemática de la formación de complejos por el método de gelación iónica.....	31
9. Placa magnetofectora colocada debajo del cultivo celular.....	34
10. Diagrama general para la medición de luciferasa en línea celular.....	35
11. Esquema del método de administración intratraqueal de complejos en ratones....	36
12. Imán en ratones.....	37
13. Pulmones divididos en 4 partes colocados en tubos eppendorf de 1.5 ml.....	37
14. Representación general del proceso de administración intratraqueal de plásmidos para determinar la expresión de luciferasa en las diferentes regiones del pulmón.....	38
15. Imágenes de MET de las nanopartículas de quitosán producidas por el método de gelación iónica.....	41
16. Imágenes de MET de nanopartículas magnéticas de 200-250 nm.....	41
17. Imágenes de MFA de complejos plásmido/quitosán.....	42
18. Imágenes de MFA de complejos con la nanopartícula magnética.....	42
19. Gel de agarosa donde se incorporaron complejos plásmido- quitosán a diferentes radios.....	43
20. Gel de agarosa donde se muestra la retención de plásmido solo.....	43
21. Gráfica de liberación de plásmido en horas.....	44
22. Expresión de luciferasa en la línea celular B16 a las 24 horas de la transfección...46	

23. Grafica de los resultados obtenidos de los experimentos de transfeccion in vivo en las diferentes regiones del pulmón aplicando el plásmido pCEM-Luc en distintas formas de presentación.....	49
24. Gráfica de los resultados obtenidos de los experimentos de transfección in vivo representando las medias de todos los datos de expresión de cada región del pulmón.....	49
25. Grafica de los resultados obtenidos de los experimentos de transfección in vivo representando las medias de todos los datos de expresión de cada región del pulmón con la administración de nanoparticulas de quitosan-plásmido y con exposición a magneto.....	50

1 .INTRODUCCIÓN

Los avances realizados en el envío de drogas se ha acelerado enormemente desde hace dos décadas. Los acarreadores paramagnéticos han tenido un incremento de aplicaciones en biotecnología. Las nanopartículas magnéticas tienen muchas ventajas, como el tamaño de la partícula, área de superficie amplia la cuál puede ser modificada para adjuntarle agentes biológicos, además tienen respuesta magnética, por lo que pueden ser manipuladas por campo magnético externo (Kavaz y cols, 2008).

La transfección es una técnica basada en los principios desarrollados por Widder y colaboradores en los 70's y se trata de acoplar material genético a nanopartículas, su eficacia ha sido demostrada en una gran variedad de células.

En el caso de la transfección in vitro de nanopartículas magnéticas, el complejo de ADN y la partícula son introducidos en el cultivo celular donde un gradiente magnético producido por magnetos se coloca debajo del cultivo celular e incrementa la sedimentación de los complejos así como la velocidad de transfección (Dobson, 2006).

Los acarreadores magnéticos son comúnmente a base de polímeros, ya que tienen una variedad de grupos funcionales que pueden ser utilizados para aplicaciones específicas. Estos polímeros ya sean naturales o sintéticos han sido utilizados en la preparación de estos acarreadores por años.

In vivo, los campos magnéticos son enfocados debajo del sitio que se requiera para promover la transfección y también para hacer llegar el gen terapéutico a un órgano o sitio específico dentro del cuerpo y a esto se le llama magnetofección (Kavaz y cols., 2008).

La magnetofección fué descubierta por Christian Plank y colaboradores para transferencia de genes en cultivos celulares e in vivo utilizando nanopartículas magnéticas solas y complejos de ADN (Schwerdt JI y cols, 2012).

El envío de drogas al pulmón ha sido de gran interés biomédico y científico en los años recientes para el tratamiento de diversas enfermedades, ya que ofrecen la posibilidad del envío dirigido de un tratamiento específico para enfermedades respiratorias y absorción de moléculas terapéuticas.

Las drogas más comunes enviadas a pulmón son antiinflamatorios para enfermedades respiratorias como asma, emfisema y bronquitis. Esto debido a la ineficiencia de vehículos capaces de hacer llegar el tratamiento ya que solo se logra del 10-15% de la dosis emitida en los pulmones, esto es apropiado para terapias locales pero no para drogas sistémicas.

Un sistema de acarreador con grupo un amino específico, densidad o propiedades de superficie para envío de drogas a los pulmones podría jugar un rol en incrementar las terapias seguidas por los siguientes mecanismos: a) que la proteína de interés llegue al sitio de acción y no afecte otros tejidos. b) que la proteína de interés sea protegida de degradación y se mantenga estable. c) que sea capaz de prolongar la droga en el sitio deseado.

La elección del acarreador apropiado depende de algunos factores, incluyendo la naturaleza de la droga a ser enviada, el tipo de enfermedad, el sitio de acción y la naturaleza y seguridad de acarreador.

2. ANTECEDENTES

2.1.GENERALIDADES DE NANOAPRTÍCULAS

La nanomedicina se ocupa en aplicar la nanotecnología en tratamientos, diagnóstico, monitoreo y control de sistemas biológicos. La nanotecnología a su vez se refiere a crear objetos como las nanopartículas que son definidas como partículas sólidas con un tamaño en el rango de 100-1000 nm. El mayor objetivo de diseñar nanopartículas como sistemas de envío son el poder controlar el tamaño, propiedades de superficie y liberación de agentes activos farmacológicamente para lograr la acción al sitio específico de la droga a la dosis optima. (Langer R., 2000).

El uso de materiales en nanoescala proporciona incomparable la libertad para modificar las propiedades fundamentales tales como la solubilidad, difusividad, la circulación sanguínea media de la vida, las características de liberación de fármacos, y la inmunogenicidad. En las últimas dos décadas, un número de nanopartículas a base de agentes terapéuticos y de diagnóstico han desarrollado para el tratamiento del cáncer, la diabetes, el dolor, asma, alergia, infecciones, y así sucesivamente (Zhang L y cols 2008).

Estos agentes de nanoescala pueden proporcionar más eficaz y / o más conveniente vías de administración, menor toxicidad terapéutica, se extienden el ciclo de vida del producto, y finalmente reducir los costos de salud.

La ventaja de utilizar nanopartículas como sistemas de envío de drogas incluyen las siguientes: tamaño de la partícula y que las características de la superficie de la nanopartícula puedan ser fácilmente manipuladas, que se pueda controlar la liberación de la droga durante su transporte y en el sitio deseado, además que el sistema pueda ser utilizado por diferentes vías de administración incluyendo la oral, nasal, parenteral e intraocular (Chen Y y Mohanraj 2006).

2.2. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN

Las nanopartículas a base de quitosán se forman de acuerdo a una aproximación de tipo ‘bottom-up’ como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas el fármaco puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida (Goyccolea y cols., 2008).

Las propiedades fisicoquímicas de complejos de ADN el tamaño y el potencial zeta son importantes para un eficiente y versátil envío de genes. En el caso de quitosán como mediador de envío de genes, las características dependen del radio (el número de nitrógenos de quitosán por fosfato de ADN), las condiciones de preparación (pH), peso molecular, y el grado de desacetilación (DDA) del quitosán.

Para el uso práctico de complejos de ADN-quitosán muchos problemas se han presentado concluyendo la estabilidad fisicoquímica y la capacidad de llegar a la célula. Desde que la primer amina del quitosán es un grupo reactivo para modificaciones químicas, muchos tipos de quitosán derivados se han sintetizado (Hashimoto y cols., 2005). Las características fisicoquímicas y distribución subcelular de los complejos de quitosán/ADN han sido investigadas para entender el mecanismo bajo el cual se lleva a cabo la expresión transgénica. En general, se piensa que el tráfico intracelular de complejos de ADN ocurre por endocitosis, seguido por una expresión del endosoma, transporte nuclear y transcripción. Primero el complejo quitosán/ADN se absorbe a la superficie celular por medio de interacciones electrostáticas y entran en células por endocitosis. Microscopía electrónica de transferencia y microscopía de láser confocal (CLMS) han revelado la distribución de complejos de ADN y quitosán en endosomas (Hashimoto y cols., 2005).

2.2.1 Quitosán como polímero biodegradable

El quitosán es un aminopolisacárido obtenido a escala industrial por N-desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los desechos de crustáceos. Mupher y cols., en 1995 fueron los primeros en proponer el uso del quitosán como acarreador de ADN.

A lo largo de la década pasada el quitosán se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos y comercialmente en la manufactura de parches cicatrizantes.

Químicamente consiste de unidades repetitivas de glucosamina y N-acetilglucosamina como se muestra en la Fig 1, las cuales determinan el grado de desacetilación del polímero. Con un pKa aproximado de 6.5 en los grupos amino, el quitosán es insoluble a un pH neutro pero es soluble y cargado positivamente a un pH ácido. No es tóxico, es hidrofílico, biocompatible, biodegradable, anti-bacterial y tiene una gran afinidad por muchas biomacromoléculas. Debido a la presencia de los grupos amino e hidroxilo en su estructura, el quitosán puede ser químicamente modificado. Ha sido aplicado en liberación de drogas con una dosis controlada (Kavaz y cols., 2008). También la nanopartícula de quitosán ha mostrado tener una alternativa para el envío de péptidos, proteínas, antígenos, oligonucleótidos y genes, generan una alta capacidad de carga de medicamentos.

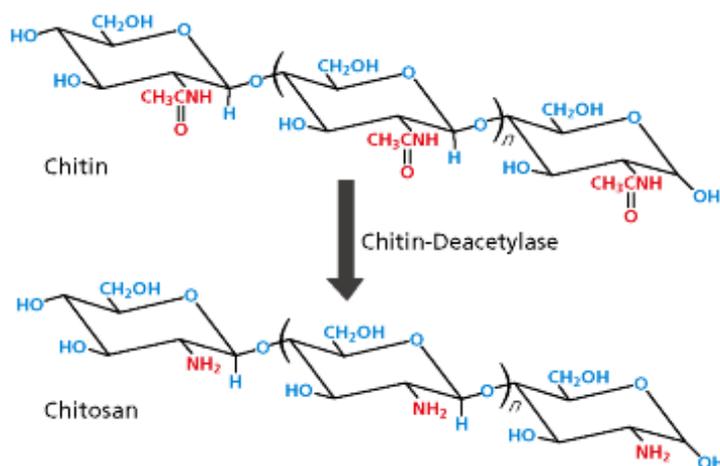


Fig.1. Estructura y obtención de quitosán a partir de la quitina.

Otro aspecto importante del quitosán es que posee propiedades mucoadhesivas. Los primeros estudios de esto fueron por Lehr y cols, quienes reportaron que muchos quitosán comercialmente disponibles se adhieren fuertemente in vitro a la mucosa (Paños y cols., 2006).

2.2.2. Métodos para generar nanopartículas de quitosán

Existen varios métodos de preparación de nanopartículas de quitosán, las más utilizadas son la de gelación iónica y la de coacervación. Estos métodos ofrecen ventajas como simple método y sin la utilización de solventes orgánicos, éstas pueden ser aplicables a una gran categoría de drogas (Krishna A., 2010).

2.2.2.1. Gelación iónica

Ésta técnica fue reportada por primera vez por Calvo y cols, y ha sido ampliamente examinada y aplicada. El mecanismo de la formación de NP de quitosán está basado en las interacciones electrostáticas entre los grupos amino del quitosán y las cargas negativas del grupo de un polianión como el tripolifosfato (TPP). Ésta técnica ofrece un método simple y sencillo de preparar en un ambiente acuoso. Primero el quitosán puede ser disuelto en ácido acético en ausencia o presencia de un agente estabilizante. Después se añade al TPP y las nanopartículas se forman espontáneamente bajo agitación a temperatura ambiente. El tamaño y la superficie de carga de las NP's puede ser modificado cambiando el radio del quitosán.

2.2.2.2. Coacervación

Coacervación es un proceso durante el cual una solución homogénea de cargas líquido-líquido se somete a separación de fases, dando lugar a una fase rica densa en la parte inferior y una solución transparente debajo (sobrenadante). Estas dos fases líquidas son incompatibles y están en equilibrio. En una simple coacervación polielectrolítica, la adición de sal o alcohol normalmente promueve la coacervación (Biswaranjan M y cols 2005).

2.3.NANOPARTÍCULAS COMO ACARREADORAS DE GENES

La aplicación de la nanotecnología para la administración de fármacos a ha tenido un impacto significativo en muchas áreas de la medicina. En la actualidad, más de 20 terapias de nanopartículas están en uso clínico, la validación de la capacidad de las nanopartículas para mejorar la el índice terapéutico de los fármacos.

Con la investigación continua y los esfuerzos de desarrollo, la nanotecnología se espera que tenga un tremendo impacto en la medicina en las próximas décadas. Las nanopartículas han sido propuestas como vehículos adecuados para el transporte de macromoléculas terapéuticas hacía el epitelio pulmonar, evitando su eliminación rapida por mecanismos fagocíticos (Schurch y cols., 1990). Además, en algunos casos, se ha comprobado su capacidad para ser captadas por células epiteliales bronquiales y alveolares (Dailey y cols., 2003).

2.3.1. Nanopartículas magnéticas

Los métodos de transfección de nanopartículas magnéticas están basados en los principios que se establecieron en los 70's por Widder y cols. El uso de micropartículas magnéticas para transfección fue demostrado por primera vez en el 2000 por Mah Catryn, Barry Byrne y cols., de la universidad de Florida in vitro en células C12S y también in vivo en ratón utilizando el virus adenoasociado (VAA) ligado a microesferas magnéticas. Desde estos estudios iniciales la eficiencia de esta técnica, llamada "magentofección" que se ilustra en la figura 2 ha sido demostrada en una gran variedad de células y se basa en el acoplamiento de material genético a partículas nanomagnéticas (Dobson, 2006).

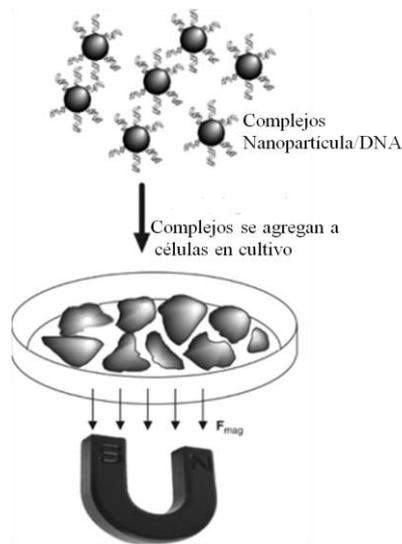


Fig .2.Nanopartículas magnéticas para transfección de genes.

Ya que se adjunta a el agente terapéutico y la nanopartícula, son inyectados en el torrente sanguíneo, generalmente se utiliza un catéter en la posición del sitio de inyección cerca del objetivo. Los campos magnéticos, son enfocados encima del objetivo y estas son capturadas y extravasadas al sitio deseado gracias al campo magnético (McBain y cols., 2008).

In vivo, campos magnéticos enfocados sobre el objetivo deseado tiene un gran potencial no solo para mejorar la transfección, sino para hacer llegar al gen terapéutico hacia un órgano o sitio específico dentro del cuerpo. Magnetos externos son utilizados para capturar las partículas a cómo van fluyendo del flujo sanguíneo, una vez capturadas por el campo, las partículas son sostenidas en el sitio específico, donde son tomadas por el tejido (Dobson, 2006).

Debido a su composición electrolítica los seres vivos por lo general son buenos conductores de electricidad. A través de las membranas celulares y de los fluidos corporales intra y extracelulares existen corrientes iónicas, especialmente en las células nerviosas y musculares a las cuales debe estar asociado un campo magnético. Además en los sistemas biológicos existen estructuras magnéticamente influenciables como los radicales libres que presentan propiedades paramagnéticas y aquéllas en las que intervienen sustancias ferromagnéticas. La respuesta de un sistema biológico a un

campo magnético externo depende de las propiedades magnéticas intrínsecas del sistema. (Lin y cols., 1999).

Grief y Richardson concluyeron que las nanopartículas magnéticas utilizadas en el envío de drogas o genes, son más efectivas en sitios que están cerca del campo magnético (Dobson, 2006).

En el caso de la magnetotransfección, el gen es adjuntado directamente a la partícula magnética o acarreador. Estas partículas generalmente consisten de óxido-hierro magnético, cualquiera dispersado dentro de un polímero o caparazón metálico.

Recientemente las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro han tenido una gran atención debido a su gran uso como materiales magnéticos así como su agente contraste imagen de resonancia magnética (IRM), pero la toxicidad de estas restringe el uso de estos materiales en humanos. Por lo tanto, muchas investigaciones se han enfocado en la encapsulación de partículas nanomagnéticas con poliésteres como poliglicólico (PGA), y polímeros como el quitosán, porque ellos tienen propiedades biocompatibles y biodegradables así como baja toxicidad (Jong y cols., 2004).

Los polímeros naturales son más versátiles debido al amplio espectro de propiedades químicas, físicas y funcionales que confluyen en los organismos vivos, tales como conferir estructura, almacenar energía y otras funciones mucho más especializadas como reconocimiento y adhesión en células eucariontes, señalización y activación de procesos de resistencia en plantas, formación de biopelículas en microorganismos, entre otras. A pesar del elevado tonelaje de polisacáridos que se utilizan como materias primas en las industrias de fibras, textil, papel y alimentos (p. ej. derivados de celulosa y almidones) hay cada vez mayor evidencia que sugiere que ciertas familias de polisacáridos poseen propiedades funcionales, tales que pueden ser explotadas en otros sectores industriales especializados como el biomédico, cosmético y farmacéutico. Es especialmente relevante que algunos de estos biopolímeros combinan propiedades fisicoquímicas como la capacidad de formar sistemas tipo hidrogeles, micro y nanopartículas, con propiedades biológicas como la mucoadhesividad que en su

conjunto los hacen particularmente atractivos en la ingeniería y diseño de materiales empleados en ciencias de la salud.

2.3.2. Quitosán como biopartícula para envío de genes

Mupher y cols., en 1995 fueron los primeros en proponer el uso del quitosán como acarreador de ADN.

Las nanopartículas a base de quitosán se forman de acuerdo a una aproximación de tipo 'bottom-up' como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas el fármaco puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida (Goyccolea y cols., 2008).

Las propiedades fisicoquímicas de complejos de ADN el tamaño y el potencial zeta son importantes para un eficiente y versátil envío de genes. En el caso de quitosán como mediador de envío de genes, las características dependen del radio (el número de nitrógenos de quitosán por fosfato de ADN), las condiciones de preparación (pH), peso molecular, y el grado de desacetilación (DDA) del quitosán.

Para el uso práctico de complejos de ADN-quitosán muchos problemas se han presentado concluyendo la estabilidad fisicoquímica y la capacidad de llegar a la célula. Desde que la primer amina del quitosán es un grupo reactivo para modificaciones químicas, muchos tipos de quitosán derivados se han sintetizado (Hashimoto y cols., 2005). Las características fisicoquímicas y distribución subcelular de los complejos de quitosán/ADN han sido investigadas para entender el mecanismo bajo el cual se lleva a cabo la expresión transgénica. En general, se piensa que el tráfico intracelular de complejos de ADN ocurre por endocitosis, seguido por una expresión del endosoma, transporte nuclear y transcripción. Primero el complejo quitosán/ADN se absorbe a la superficie celular por medio de interacciones electrostáticas y entran en células por endocitosis como e ilustra en la figura 3. Microscopia electrónica de transferencia y microscopía de láser confocal (CLMS) han revelado la distribución de complejos de ADN y quitosán en endosomas (Hashimoto y cols., 2005).

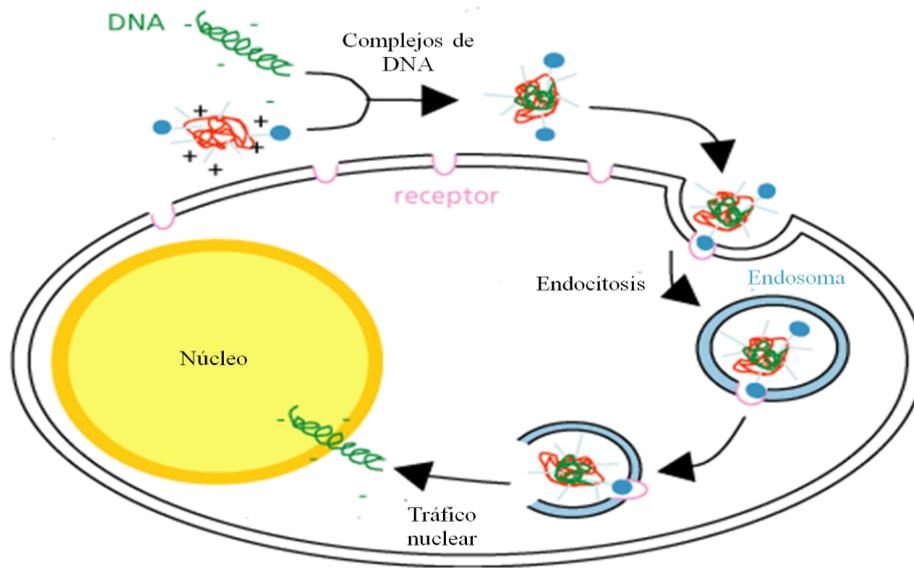


Fig.3. Mecanismo general de incorporación de complejos entre plásmidos y policationes.

Otro aspecto importante del quitosán es que posee propiedades mucoadhesivas. Los primeros estudios de esto fueron por Lehr y cols, quienes reportaron que muchos quitosán comercialmente disponibles se adhieren fuertemente in vitro a la mucosa. (Paños y cols., 2006).

2.4.APLICACIONES DE LOS VECTORES DE DNA

Los plásmidos de ADN codificando antígenos son más frecuentemente utilizados debido a que no tienen el inconveniente de las vacunas clásicas: son seguros, económicos, fáciles de producir, estables al calor y susceptibles a la manipulación genética. Ahora que muchos elementos importantes del vector han sido identificados, los esfuerzos deben ser concentrar en las pruebas de sus diferentes combinaciones y evaluar su inmunogenicidad potencial. El estudio de los potenciales riesgos de seguridad de la biotecnología de vacunas de ADN, tales como integración cromosómica integración y la inducción de la tolerancia inmunológica también debe ser llevado a cabo (Azevedo y cols., 1999).

2.4.1. Vacunas

2.4.1.1 Vacunas vivas atenuadas

En la historia de la inmunología, las primeras inmunizaciones exitosas fueron las vacunas elaboradas en esencia de virus vivos atenuados mediante múltiples pasos en cultivos de tejidos; por ejemplo el virus de la viruela o el virus de la polio (Mota, 2009).

Una de sus principales características es que inducen una fuerte inmunidad, duradera y de tipo tanto humoral (anticuerpos) como celular (células T sensibilizadas). Sin embargo, presentan riesgos de reversiones al estado virulento. Los métodos de atenuación varían de acuerdo al tipo de patógeno del que se trate y en algunas ocasiones son necesarios varios pasos de atenuación para tener un rango de seguridad aceptable para su empleo en humanos.

Otro tipo de vacunas son las que utilizan a los microorganismos muertos, estas tienen la ventaja de no presentar la posibilidad de reversión a la patogenicidad pero son menos efectivas y generalmente requieren que se administren adyuvantes que son sustancias que mejoran su capacidad de producir una respuesta inmune.

2.4.1.2. Vacunas de Subunidades antigénicas

Las bacterias y los virus son entes complejos que están constituidos de muchos tipos de moléculas, y en su parte más externa están aquéllos componentes que son los que serán reconocidos por el sistema inmune.

En las bacterias existen los polisacáridos que son muy diferentes para cada tipo de bacteria y estas moléculas son las que el sistema inmune puede reconocer, en los virus la externa suele estar conformada de proteínas, estas también son muy específicas para cada tipo viral; es precisamente esta especificidad la que permite al sistema inmune reconocer a un agente productor de una enfermedad.

A pesar de la gran ventaja de estas vacunas también hay grandes problemas en su producción pues las subunidades antigénicas deben primero purificarse y su

producción requiere cultivos a gran escala de los organismos patógenos lo que no solo es costoso y además, no está exento de riesgos.

2.4.1.3. Vacunas recombinantes

La primer vacuna recombinante fue de la hepatitis B. La vacuna está compuesta por partículas proteicas producidas en células huésped, generalmente levaduras, en las que se ha insertado por técnicas de recombinación de ADN el material genético responsable de su codificación.

Las ventajas de este tipo de vacuna es que puede inducirse a las bacterias recombinantes a que aumenten la producción de las proteínas deseadas facilitando así la purificación del antígeno recombinante. Además, estas proteínas recombinantes mucho más seguras ya que no hay posibilidad de contaminación con los elementos que brindan la facultad de iniciar la enfermedad.

2.4.1.4. Vacunas de ADN desnudo

Una serie de observaciones al inicio de la década de los 90's demostró que era posible con el ADN desnudo (plásmidos) transfectar células in vivo y que también era posible inducir una respuesta humoral a una gran variedad de antígenos virales, bacterianos y parasitarios. Además mostraron una eficacia en los tratamientos de enfermedades alérgicas, autoinmunitarias y modelos de tumores (Kowalesky y Ertl, 1998).

La primera demostración de la eficacia protectora del ADN en un modelo animal fue reportado en el modelo de la influenza en 1993 por Ulmer y cols., y la inducción de la respuesta inmunespecífica del antígeno se demostró por primera vez en humanos con la vacuna de ADN de la malaria en 1998 por Wang y cols., desde estas demostraciones se estableció firmemente el concepto de lo que hoy se conoce como vacunas de tercera generación o vacunas de ADN (Mota, 2009).

Las vacunas de ADN son una molécula de doble cadena de ADN circular, que contiene genes codificantes para una o más proteínas de un patógeno (Liu y cols., 2006).

Utilizando la técnica recombinante de ADN es posible insertar un gen extraño en una molécula de plásmido para generar un plásmido recombinante.

El uso de vacunas de ADN para la generación de respuestas inmunes provienen de los esfuerzos de encontrar inmunógenos que sean capaces de superar algunas de las limitaciones de otras modalidades de vacunación, además de su habilidad de inducir una respuesta humoral y celular, las vacunas de ADN tienen otras ventajas sobre las vacunas tradicionales (Liu y cols., 2006). Entre las ventajas que pueden atribuirse a su empleo son su capacidad para estimular una respuesta de tipo celular citotóxica mediada por linfocitos T CD8+, la cual no se logra con las actuales vacunas convencionales inactivadas o de subunidades recombinantes (Díaz y Valle, 2006).

Las vacunas de ADN se basan en la inyección directa en el huésped de ADN plasmídico que codifica para un antígeno de un patógeno, en lugar del antígeno proteico o del patógeno atenuado/muerto. La expresión endógena del antígeno dentro de las células del huésped puede inducir una respuesta inmune completa y duradera. Esta respuesta incluye anticuerpos, aunque es frecuentemente más débil que la que se puede obtener con vacunas recombinantes, así como una activación fuerte y duradera de células T cooperadoras y citotóxicas. Este tipo de respuesta inmune es comparable a la respuesta inducida por vacunas atenuadas, pero resulta muy difícil de inducir con vacunas recombinantes (cuadro I), lo que representa una de las grandes ventajas de las vacunas de ADN (Gurunathan S y cols., 2000).

		Vacuna de DNA	Vacuna atenuada	Protéina recombinante
Respuesta inmune	Humoral cel. B	++	+++	+++
	Célular T ^{CD4+}	+++ Th1	± Th1	± Th1/Th2
	T ^{CD8+}	++	+++	-
Memoria	Humoral	+++	+++	+++
	Célular	++	+++	±
Producción	Desarrollo y producción	++++	+	++
	Costo	+++	+	+
	Almacen y transporte	+++	+	++
Seguridad		+++	++	++++

Tabla I. Propiedades comparativas de las vacunas de ADN, vacunas atenuadas y vacunas recombinantes.
(Seder RA, 2000).

2.4.2. Sistemas para hacer más eficientes los vectores de ADN

Una gran variedad de esfuerzos se han hecho para incrementar la potencia de las vacunas de ADN, muchos enfoques innovativos han sido tomados para desarrollar adyuvantes basados en genes para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas de ADN. Por ejemplo citocinas, quimiocinas, factor de crecimiento, enzimas y estructuras tipo patógenas. La elección depende de qué respuesta se requiera humoral, celular o ambas (Liu y cols., 2006).

El uso del plásmido de ADN como vacuna asume una gran significancia desde que puede ser producido a precio bajo y puede ser almacenado a temperatura ambiente. (Liu y cols., 2006)

Hay un gran interés en el envío de genes que no requieren vectores virales que están asociados con la inmunogenicidad, propiedades oncogénicas y efectos de largo término desconocidos y aunque son menos efectivos, imitan muchas funciones biológicas de sistemas virales, pero difieren fundamentalmente de estos en su composición, perfil terapéutico, riesgos clínicos y seguridad.

Una de las estrategias que se ha utilizado para potenciar vacunas de ADN es utilizando citocinas. Aunque estas han probado ser útiles en muchos estudios, uno debe tener en mente que la vida media de las citocinas es muy corta. Existen estudios preclínicos que han mostrado que la IL-2 es promovida creando una vacuna de ADN codificando una proteína de fusión inmunoglobulina IL-2.

La inmunización con ADNc CCR5 (MIP)-1 α ha mostrado tener respuesta inmune a la vacuna de ADN. El mecanismo de acción es que la MIP-1 α promueve la migración de células dendríticas inmaduras (CDs) al sitio de la inoculación, incrementando la posibilidad de que las CDs tomen el antígeno para la subsecuente presentación a las células T vírgenes. El número de CDs presentes en el sitio de la expresión del antígeno ha sido un factor limitante para la efectividad de la vacunación de ADN (Liu y cols., 2006)

Algunos sistemas de envío de genes incluyen liposomas y partículas poliméricas, estas últimas ofrecen resistencia a la degradación de nucleasa, la posibilidad de control en dosis y administración de la duración del ADN plasmídico (ADNp) (Cohen y cols., 2000).

De manera funcional, el vector plasmídico empleado para vacunas de ADN está compuesto por una unidad transcripcional que incluye un promotor, un ADNc que codifica para el antígeno y una secuencia de terminación de transcripción como se muestra en la figura 4 (Kowalezyk y Ertl, 1999).



Fig.4. Representación de la estructura de un vector plasmídico empleado como vacuna de ADN. El vector posee una unidad transcripcional compuesta por un promotor, intrón, ADNc que codifica para el antígeno y una secuencia de terminación de la transcripción. El esqueleto plasmídico posee un gen de resistencia a antibióticos, origen de replicación, sitios de clonación múltiple y secuencias CpG inmunoestimulatorias (ISS) que funcionan como adyuvantes internos de la vacuna.

2.4.3. Terapia génica

En años recientes, la terapia génica a empezado a hacer el avance del concepto de prueba a la práctica de prueba. Pero el principal obstáculo a esta utilidad clínica radica en la inhabilidad de sistemas de vectores corrientes para ser eficientes y seguros en el envío de transgenes para un tejido específico in vivo. Mientras que progresos considerables se han hecho en el desarrollo de vectores virales y no virales, la meta es la forma administración para la seguridad y llegar al tejido específico y esto aun no se ha logrado con eficiencia.

2.5.PROMOTORES PARA ACTIVAR GENES

Casi todos los plásmidos comerciales de expresión de mamíferos llevar el promotor/potenciador a partir de los virus patógenos. A pesar de que estos elementos promotores son de los virus patógenos, se han vuelto muy útiles para la terapia génica e inmunización génica gracias a su alta capacidad de iniciación de la transcripción en la mayoría de los tejidos de mamíferos. La mayoría los promotores comúnmente utilizada

es la de humano citomegalovirus (hCMV), que induce expresión fuerte y constitutiva de en una variedad de tipos de células. Los promotores se clasifican en virales e inducibles ya que a veces es conveniente poder controlar la expresión del vector.

2.5.1. Promotores virales

La mayoría de los estudios en investigación de terapia génica hasta la fecha han utilizado promotores virales. En su contexto natural promotores virales fuertes son requeridos para una propagación viral eficiente y frecuentemente inducen muchos más altos niveles de transcripción que los promotores eucarióticos utilizando mecanismos de control y reclutación de la maquinaria de transcripción del huésped. Más aun por necesidad, tienden a ser mucho más compacto y, por tanto más fácil de manipular y acomodar en vectores de terapia génica. Alguno de los promotores más utilizados es el virus del simio 40 (SV40), repeticiones terminales largas del virus del sarcoma Rous (RSV-LTR) y otros promotores retrovirales LTR

2.5.2. Promotores inducibles

Los promotores inducibles, los cuáles se expresan solamente en la presencia de factores o compuestos y de acuerdo la naturaleza de los factores que desencadenan su expresión están divididos en grupos:

Los que son regulados químicamente y los regulados físicamente en donde los factores externos abióticos como la luz, calor, daño mecánico es inducido por la actividad del promotor.

2.5.2.1. Promotores activados por pH

Los promotores comúnmente empleados para expresión de proteínas heterólogas requieren de la adición de una molécula inductora, el eliminar o la adicionar un nutriente o un cambio del factor fisicoquímico, tal como el pH.

2.5.2.2. Promotores activados por calor

Los organismos desde bacterias a humanos responden a altas temperaturas sintetizando un set de proteínas protectoras. En muchos organismos, la respuesta del shock térmico se produce a través de un aumento en la tasa de transcripción de un

conjunto de genes de choque térmico. Una secuencia promotora es la responsable de que esta inducción haya sido identificada y conservada de *Drosophila melanogaster* a humanos. Este elemento funciona como un potenciador inducible en células de mamíferos. El elemento de choque térmico se encuentra ubicado en la base -100 de la proteína humana de choque térmico hsp70 (Kingston R., 1987).

2.5.2.3. Promotores activados por hipoxia

El factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1) tiene un papel fundamental en la respuesta a la baja tensión del oxígeno, ya que regula la expresión de una gran variedad de genes cuyos productos participan en procesos como la angiogénesis, el metabolismo energético, la eritropoyesis y la proliferación celular.

2.5.2.4. Promotores activados por antibióticos

Un ejemplo de estos es la tetraciclina o su derivado doxiciclina, el sistema de expresión controlada por tetraciclina se conoce como TET-system y su uso se encuentra regulado por patentes comerciales.

2.5.2.5. Promotores activados por hormonas

Se trabaja con proteínas de fusión entre la enzima Cre y un receptor incompleto de estrógenos (sólo la porción EBD, estrogen binding domain). Esta proteína de fusión es inactiva, pero la administración de la droga tamoxifeno (por vía intraperitoneal) la libera y activa el sistema Cre. Por lo tanto, tendrá como resultado la acción de la recombinasa sobre los sitios específicos y la consiguiente recombinación de ADN con alteración del gen blanco en los ratones Cre/loxP positivos. Es lógico pensar que la combinación de estas dos técnicas de KO condicionales (tisular-temporal) puede ser de gran provecho, como lo han demostrado usando promotores específicos de linfocitos B (Fernando J.B y Jean-Louis G., 1995).

2.5.2.6. Promotores activados por campo magnético

Los campos magnéticos tienen múltiples efectos en los sistemas biológicos, incluyendo la modulación de iones y el flujo de proteínas a través de membranas, alteraciones en la replicación del DNA, cambios en transcripción de RNA, alteraciones en la respuesta de células a hormonas. Investigaciones en efectos de la exposición de

campo magnético a productos biológicos se encuentran en la transcripción. Y existen trabajos donde la exposición a campos magnéticos incrementa la transfección en células, esto fue demostrado in vivo utilizando un plásmido con un promotor inducible a campo magnético (Heredia R y cols., 2010).

2.6.APLICACIÓN DEL ENVÍO DIRIGIDO DE GENES AL PULMÓN

El pulmón es un órgano importante objetivo para la terapia génica de las muchas enfermedades agudas y crónicas, incluyendo cáncer, asma y fibrosis quística, entre otros. Muchos estudios han demostrado la viabilidad de la transferencia de genes de pulmón, y el progreso reciente se revisarán concentrarse en la búsqueda que ha sido validado en modelos animales o en la clínica. La mayoría de los avances han sido realizados en el tratamiento de cáncer de pulmón y la fibrosis quística, éstas se consideran como representativas ya que con las que requieren una expresión genética pulmonar aguda y crónica, respectivamente. El pulmón es un órgano blanco especialmente atractivo debido a la accesibilidad relativamente no invasiva a través de las vías respiratorias y vasculatura. Sin embargo, una vez en el pulmón, los vectores de transferencia génica se pueden encontrarse defensas muy eficaces que se han desarrollado para proteger las vías respiratorias de partículas de todos los tamaños, incluyendo alérgenos y virus (Gill D y cols., 2004).

2.6.1. Problemas a resolver

Hay varios problemas que se tienen que solucionar para obtener una expresión de genes en el pulmón como: (a) mejorar la y la cantidad de proteína que llega al sitio de acción (ya sea extracelular o intracelular) y, en consecuencia, la disminución de efectos adversos debido a la administración de fármacos no específicos al tejido blanco, (b) la protección de la proteína y la mejora de su estabilidad in vivo; y (c) y prolongar el tiempo de residencia de drogas en su sitio de acción. Además, se pueden emplear para proporcionar orientación pasiva o activa (Yamamoto A y cols., 1997).

La elección del vehículo apropiado depende de varios factores, incluyendo la naturaleza del fármaco a administrar, el dispositivo de entrega, el tipo de enfermedad y lugar de acción, la naturaleza y la seguridad del acarreador.

Junto con el desarrollo de nuevas tecnologías para la administración de fármacos capaces de representar la administración eficaz de un fármaco seleccionado, una inversión en la mejora de los materiales aplicados al diseño de los sistemas es un tema muy importante. La seguridad del adyuvante utilizado para desarrollar acarreadores al pulmón para la entrega de proteínas tiene que ser determinado y las cuestiones locales relacionadas a irritación y toxicidad a largo plazo, la acumulación y la inmunogenicidad (Heineman L y cols., 2000).

2. HIPÓTESIS

La activación remota de genes con un campo magnético externo es más eficiente con la administración plásmidos atrapados en nanopartículas de quitosán en comparación al uso de plásmidos solos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la eficacia de las nanopartículas de quitosán para el envío dirigido y la expresión del gene de luciferasa en una línea celular y en el pulmón bajo la inducción remota de un campo magnético externo.

3.2. Objetivos particulares

Establecer las condiciones específicas para producir y caracterizar nanocomplejos formados por nanopartículas de quitosán y plásmidos.

Determinar la efectividad de los nanocomplejos formados por nanopartículas de quitosán para inducir la expresión del gene de la luciferasa en línea celular bajo la inducción de un campo magnético externo.

Determinar la efectividad de los nanocomplejos formados por nanopartículas de quitosán administrados por vía intratraqueal para inducir la expresión del gene de la luciferasa en el pulmón bajo la influencia de un campo magnético externo.

3. MÉTODOS

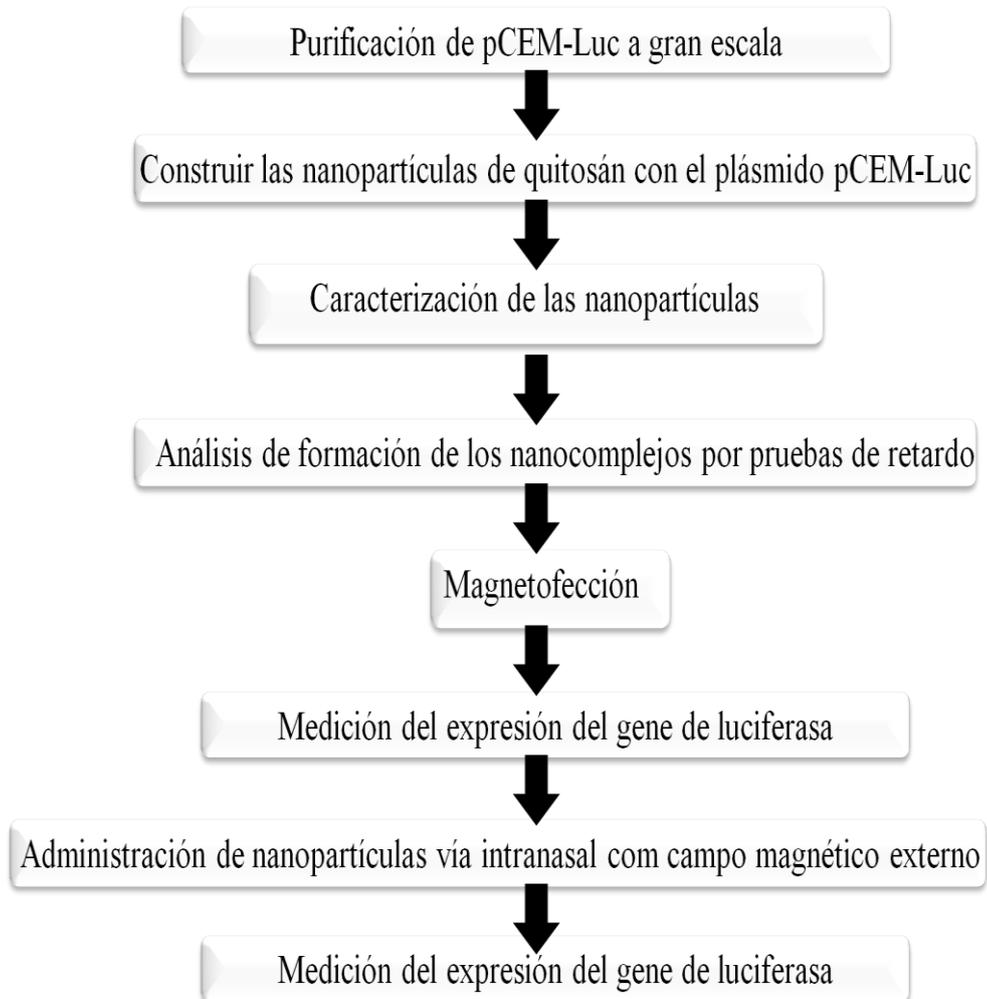


Fig 5. Esquema de la estrategia general de la metodología

5.1. Materiales

- Tripolifosfato de pentasodio (TPP) SIGMA®
- Quitosán soluble en agua de 20 kDa Coyotefoods®
- Nanopartículas magnéticas Combimag de Oz Biosciences.
- Kit de ensayo de luciferasa Promega®
- DMEM NUTRIENT MIX F12 Invitrogen®
- OPTI MEM I Invitrogen®
- Suero fetal bovino Invitrogen®
- Tripsina Invitrogen®
- Kit para extracción de plásmido (Purelink plasmid mega reaction) Invitrogen®

El plásmido que se utilizó para determinar la eficacia de las nanopartículas magnéticas de quitosán para el envío dirigido y la expresión del gen luciferasa en el pulmón mediante un campo magnético es pCEMLuc, desarrollado y caracterizado en el Laboratorio de Inmunología y Virología.

5.2. Descripción del Plásmido pCEMLuc

La secuencia del promotor de hsp70 inducida en el plásmido pCEM-Luc, el cuál contiene: una señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40), un gen de resistencia a penicilina y el gen Luc que expresa la luciferasa. El promotor está insertado dentro de este vehículo de manera completa, el cuál contiene los elementos de respuesta a CEM (campo electromagnético). El vehículo que resulta es llamado: pCEM-Luc y se muestra en la fig.6.

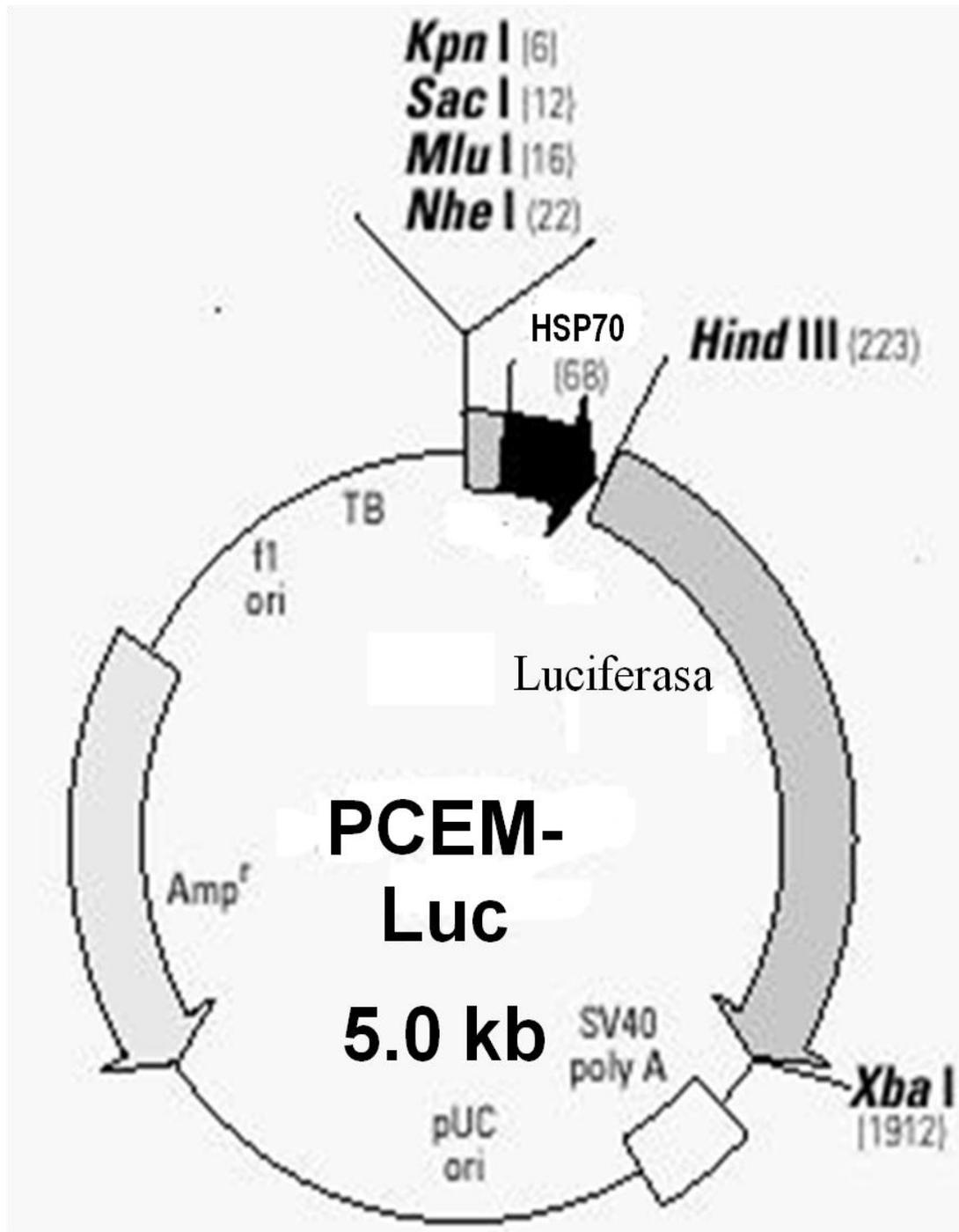


Fig.6. Mapa del vector pCEM

5.3. Transformación de bacterias competentes (DH5 α , Invitrogen)

Una vez obtenido el vector de nuestro interés, se procede a transformar bacterias competentes, para que una vez introducido en ellas, poder obtener un número elevado de copias del mismo. Para la transformación se ha empleado el siguiente protocolo:

- Descongelar en hielo una alícuota de DH5 α de 50 μ l
- Añadir de 1 a 5 μ l de ADN (1-10 ng) a las células y mezclar con cuidado. No pipetear.
- Incubar las células en hielo durante 30 minutos.
- Colocar las células a 42°C por 1 minuto.
- Poner los tubos en hielo por 2 minutos.
- Adicionar LB estéril sin ampicilina.
- Incubar 1 hora a 37°C.
- Plaquear 100 μ l en Agar-LB con ampicilina.

5.4. Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (Miniprep)

Para obtener una pequeña cantidad de ADN plasmídico que nos sirva para comprobar las características del plásmido, crecimos una colonia de bacterias en 5 ml de LB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche, con agitación constante de 225 rpm y a 37°C. Para la purificación del ADN plasmídico a pequeña escala empleamos el siguiente protocolo:

Protocolo:

- En la cámara de bacterias llenamos en un tubo eppendorf con el medio de cultivo en el que han crecido las bacterias toda la noche. Centrifugamos durante 2 minutos a 13000 rpm. Tiramos el sobrenadante
- Añadimos al pellet 100 μ l de solución I (solución de re suspensión) y re suspendemos con una pipeta.
- Añadimos 200 μ l de solución II (solución de lisis) y mezclamos invirtiendo el tubo varias veces.
- Añadimos 150 μ l de solución III (solución de neutralización), mezclamos y centrifugamos durante 2 minutos a 13000 rpm.
- Pasamos el sobrenadante a tubos limpios.

- Añadimos 400 µl de Miniprep Express matrix, asegurándonos de agitarla completamente antes y mezclamos los tubos.
- Centrifugamos 10 segundos y tiramos sobrenadante
- Añadimos 500 µl de etanol al 70% y re suspendemos el precipitado agitando.
- Centrifugamos 10 segundos el sobrenadante.
- Dejamos secar el paquete para que el etanol se evapore.
- Re-suspendemos el precipitado seco en 50 µl de TE con RNasa (20 µg/ml) con una pipeta.
- Centrifugamos por 1 minuto y pasamos el sobrenadante con el ADN a un tubo nuevo

5.5. Purificación a pCEM-Luc a Gran Escala

5.6. Aislamiento de ADN plasmídico a gran escala (Maxiprep)

Para obtener grandes cantidades de plásmido que utilizamos para los experimentos de transfección, utilizamos el aislamiento a gran escala. Para ello, se hace un pre cultivo a partir de una colonia de bacterias (ó a partir de bacterias congeladas que contienen el plásmido) en 6 ml de LB más el antibiótico correspondiente, durante unas 6-12 horas, en agitación constante (225 rpm) y a 37°C. Este pre cultivo se pasa a un volumen mayor, normalmente unos 250 ml de LB más el antibiótico correspondiente que se deja crecer toda la noche a 37°C y en agitación constante (225 rpm) para permitir la aireación correcta del cultivo.

Para la purificación de grandes cantidades de plásmido, utilizamos un kit comercial (Invitrogene® Maxi Prep). El protocolo básico para este tipo de kits comerciales consiste en un paso de centrifugación, que formará un pellet con las bacterias que han crecido en el medio de cultivo. Este paquete celular se re-suspende en un volumen determinado de solución de re-suspensión. Tras esto, se procede con la fase de lisis bacteriana, que usa una solución de lisis alcalina (NaOH/ SDS) que romperá las bacterias liberando su contenido celular. Las proteínas, así como el ADN cromosómico y plasmídico, son desnaturalizadas bajo estas condiciones. El RNA es degradado por la

RNasa libre de ADNsa. Posteriormente se añade una solución de neutralización, que contiene acetato potásico, lo que provoca una precipitación del SDS, arrastrando proteínas ADN cromosómico y otros restos celulares. Esta solución también neutraliza el lisado. El ADN plasmídico puede revertir a su forma súper-enrollada nativa y permanece en la solución.

Después de la lisis alcalina, se hace pasar la muestra por unas columnas cromatográficas, a cuya resina el ADN plasmídico queda unido por afinidad y de donde será eluido mediante un cambio de pH de 6.5 a 9.0. En estas condiciones alcalinas, la carga positiva de la resina de la columna es neutralizada y el ADN plasmídico es liberado. Es necesario un último paso de precipitación para eliminar restos de sales o alcohol que puedan interferir en reacciones posteriores en las que se puedan emplear los plásmidos.

La concentración del plásmido se calcula midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm. La calidad del plásmido se puede comprobar corriendo las muestras en un gel de agarosa al 1%, lo que nos dará la información de la integridad estructural y conformacional del ADN plasmídico aislado, por ejemplo, mostrando si en la muestra predomina la forma súper-enrollada, circular o lineal.

5.6. Preparación de células competentes

- 1.- De un cultivo de *Escherichia coli* DH5 α se tomó una azada y se inoculó un tubo cónico conteniendo 15 ml de medio LB sin antibiótico. Se incubó durante 24 horas a 37°.
- 2.- Al siguiente día se toma 1 ml de la suspensión bacteriana y se agregó en 30 ml de medio LB también sin antibiótico y se mantuvo el crecimiento hasta la fase log a 37°C a 280 rpm por 2-3 horas. Luego se distribuyó a tubos cónicos estériles de 15 ml.
- 3.- Posteriormente se centrifugó a 7000 rpm por 10 minutos.

- 4.- Se eliminó el sobrenadante y se agregó al paquete celular 6 ml de CaCl₂ 0.1 M, se resuspendió y se mantuvo en baño de hielo por 30 minutos.
- 5.- Después se centrifugó a 7000 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- 6.- El paquete celular obtenido se resuspendió con 1 ml de CaCl₂ 0.1 M y se mantuvieron las células a 4°C por toda la noche.

5.7. Caracterización del plásmido

Para comprobar realmente que el plásmido que se utilizó es el pCEM-Luc se realizó una digestión del mismo con las enzimas NheI y HindIII de la siguiente manera:

- 1.- En un tubo eppendorf estéril se agregó 1 µl del plásmido pCEM-Luc.
- 2.- Posteriormente se adicionan 15.8 µl de agua para PCR, 2 µl de amortiguador D, 0.2 µl de BSA y 1 µl de la enzima NheI.
- 3.- Finalizado el tiempo anterior se agregó 1 µl de Hind III y se incubó con las condiciones antes mencionadas por 5 minutos.
- 4.- Después se incubó a 37° C por 1 hora y 30 minutos bajo agitación continua en el Thermomixer 5436 Eppendorf.
- 5.- Concluido este tiempo se procedió al análisis de digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.8. Producción de Nanopartículas Magnéticas de Quitosán con el plásmido pCEMLuc

Las nanopartículas de quitosán fueron preparadas de acuerdo al procedimiento descrito por Calvo y cols., 1997, basado en la técnica de gelación iónica, en el cuál los grupos amino cargados positivamente del quitosán interactúan con los cargados

negativamente del TPP (fig. 7). La formación espontánea de las nanopartículas ocurre debido a las uniones intra e intermoleculares entre las cargas positivas y negativas (Janes K y cols 2001). El quitosán disuelto en agua a una concentración de 20 mg/ml y el TPP a 0.86 mg/ml fueron puestos en contacto, la formación espontánea de las nanopartículas ocurrió después de incorporar 12 ml de la solución de TPP en 30 ml de solución de quitosán, bajo agitación a temperatura ambiente (fig. 8).

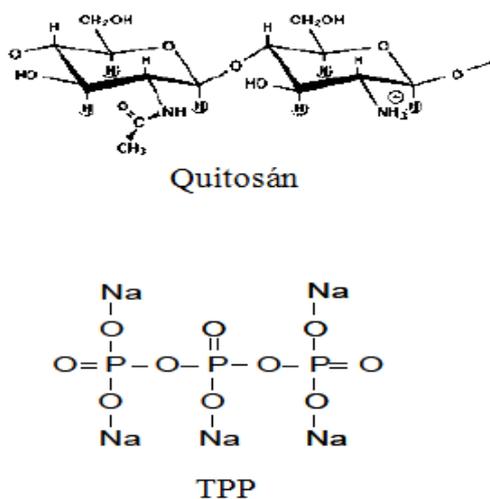


Fig.7.Estructuras químicas del quitosán y TPP

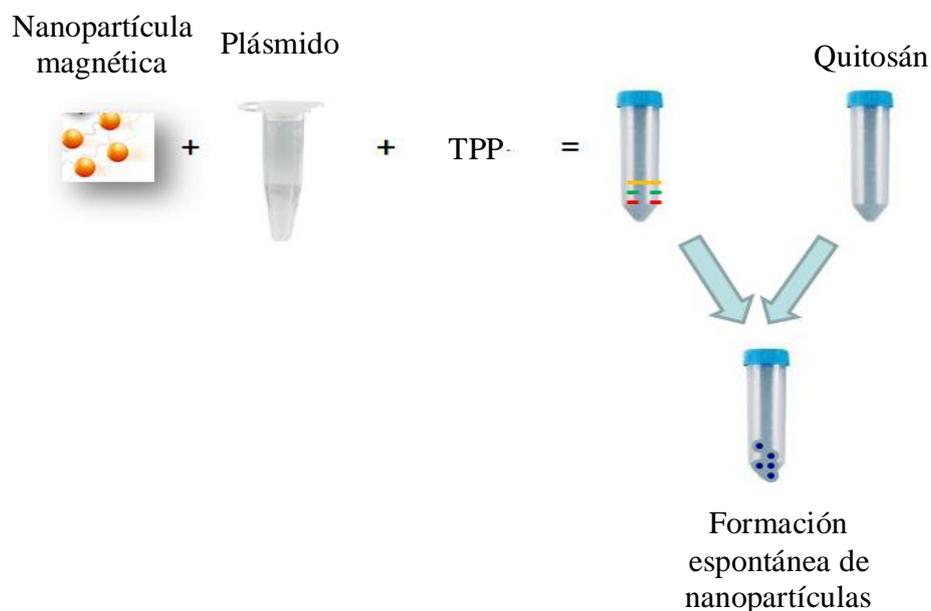


Fig.8.Representación esquemática de la formación de los complejos por el método gelación iónica.

5.9. Caracterización de las nanopartículas magnéticas cubiertas de quitosán y plásmido pCEM-Luc atrapado

5.9.1. Forma y tamaño por microscopía electrónica de transmisión.

La distribución del tamaño de las partículas se determinó por medio de un analizador de difracción de rayos láser. La morfología superficial fue evaluada por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Hritcu y cols., 2008).

5.9.2. Forma y tamaño por microscopía de fuerza atómica.

Antes de llevar las nanopartículas al microscopio, fueron diluidas con agua bidestilada y secadas sobre una mica, la cual después fue analizada.

5.9.3. Medición del potencial zeta de las nanopartículas.

El potencial de las partículas se midió en un buffer de fosfatos (pH=6) en un sistema llamado Malvern Zetasizer ZS90 (Hritcu y cols., 2008).

5.9.4. Prueba de liberación de plásmido de las nanopartículas

El perfil de liberación de plásmido de las nanopartículas del complejo con quitosán se determinó de la siguiente manera: la carga de plásmido de las nanopartículas de quitosán separadas de una suspensión acuosa se pusieron en ADNsa y RNAsa en un eppendorf con PBS con pH 7.4 y las muestras se almacenaron a 37°C con agitación. A tiempos determinados las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se reemplazó por medio fresco. La cantidad de plásmido liberada de las nanopartículas se midió en el espectrofotómetro a 260 nm.

5.9.5. Prueba de protección de plasmido.

El plásmido desnudo (1 µg en 20 µl de buffer de Tris EDTA) o suspensión de nanopartícula (20 µl, equivalente a ~ 1 µg de ADNp) se incubó con una concentración

final de ADNsa 40 µg/ml por 15 min a 37°. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de inhibidor de ADNsa I (ácido iodoacético o 200 mM de cloruro de sodio+ 20 mM EDTA + 1% SDS) (Bozkir y Mehmet, 2004).

5.9.6. Análisis de formación de nanocomplejos por pruebas de retardamiento.

Después de este tratamiento, las nanopartículas se sometieron a una digestión de quitosanasas por 4 hrs. A 37° C. La integridad del plásmido se analizó en una electroforesis por un gel de agarosa al 0.8% y teñido con bromuro de etidio.

5.10. Determinación del efecto de los complejos formados por nanopartículas magnéticas de quitosán para inducir la expresión del gene de la luciferasa en la línea celular de pulmón B16F10 bajo la influencia de un campo magnético:

5.10.1. Transfección (Magnetofección).

Antes de la magnetofección, se agregaron 6×10^4 células de la línea celular B16F10 por ml en placas de 6 pozos de 35 mm, y se incubaron las células a 37 °C en una atmósfera de CO₂ hasta obtener una confluencia celular de un 70-80%.

5.10.2. Exposición in vitro a campo magnético (CEM)

Se realizaron 4 experimentos de transfección:

Primero: plásmido + quitosán sin exposición a campo magnético utilizando la placa magnetofectora por 20 min (Fig.9).

Segundo: plásmido + quitosán con exposición a campo magnético.

Tercero: Plásmido + quitosán + nanopartícula magnética sin exposición a campo magnético.

Cuarto: Plásmido+ quitosán + nanopartícula magnética con exposición a campo magnético 20 min.

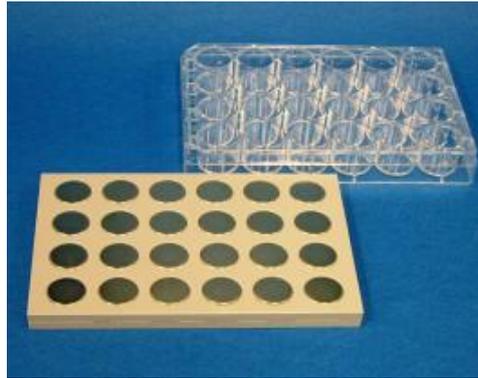


Fig.9.Placa magnetofectora colocada debajo de la caja del cultivo celular.

Una vez preparados los complejos descritos conteniendo 2 μg de plásmido se agregaron después de 30 minutos de incubación a las células y se dejaron incubando bajo condiciones estándar por un tiempo de 24 horas para lectura de luciferasa.

5.10.3. Lectura de luciferasa en línea celular B16F10

Este ensayo nos permite determinar los niveles de expresión del gen trasfectado midiendo la actividad luciferasa expresada. El esquema se observa en la fig.10. Para realizar la medición se añaden ATP y el sustrato luciferina al lisado celular en un luminómetro (Synergy Luminometer HT 2). La enzima cataliza una oxidación rápida del sustrato, dependiente de ATP, que ocurre en dos pasos, y que produce AMP, CO_2 y que emite la luz procedente de un intermediario activado de la luciferina. La emisión total de luz es medida en el luminómetro, y cuando se mide en presencia de un exceso de sustrato, es proporcional a la concentración de la enzima y se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

- 1.- Se agregaron 100 μl de PBS estéril para lavar las células.
- 2.- Se retiró cuidadosamente el PBS.
- 3.- Se agregaron 20 μl de Buffer de lisis al 1% y se incubó 5 min en agitación.
- 5.- Se tomó el lisado y se colocó en un tubo eppendorf de 0.6 ml.
6. Se les aplicó vórtex por 10-15 seg.
- 7.- Se centrifugó por 15 seg a 4°C .
- 8.-Se tomó el sobrenadante de las muestras y se colocaron en una placa para su lectura en el luminómetro.

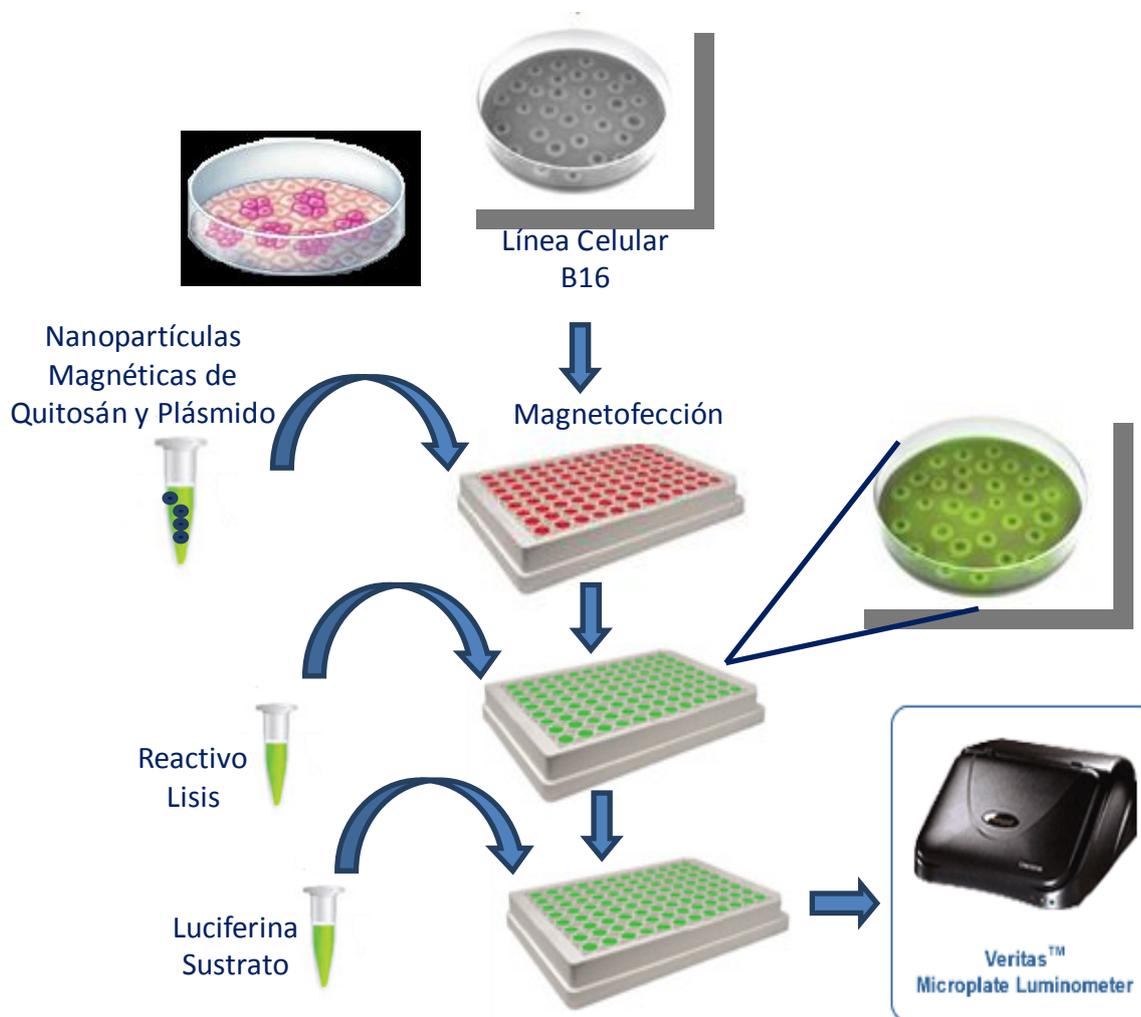


Fig.10. Diagrama general para la medición de luciferasa

5.11. Determinación del efecto de los complejos formados por nanopartículas de quitosán para inducir la expresión del gene de la luciferasa en ratones bajo la influencia de un campo magnético:

Para evaluar el efecto del pCEM-Luc in vivo se utilizaron 4 grupos experimentales compuesto de 3 ratones de la cepa Balb/c de 8 semanas de edad, con pesos comprendidos entre 25-30 gr por grupo. Cada experimento se realizó tres veces para comprobar los resultados.

Grupo 1.- Ratones inyectados con el plásmido desnudo pCEM-luc sin exponer a un magneto.

Grupo 2.- Ratones inyectados con el plásmido desnudo pCEM-Luc expuestos al magneto redondo compuesto por Neodymium- Fierro- Boro de 3000 Gauss.

Grupo 3.- Plásmido + Quitosán de quitosán expuesto al magneto.

Los ratones fueron anestesiados con xilacina (50mg/kg) y ketamina (5-10 mg/kg) vía intramuscular. Una vez que el ratón estaba totalmente dormido se realizó una incisión longitudinal en la parte ventral del cuello de aproximadamente 1.5 cm dejando expuesta la tráquea (Fig.11) y utilizando una jeringa de 0.5 ml se le administraron 50 μ g de plásmido en los complejos. Posteriormente se cerró la incisión.

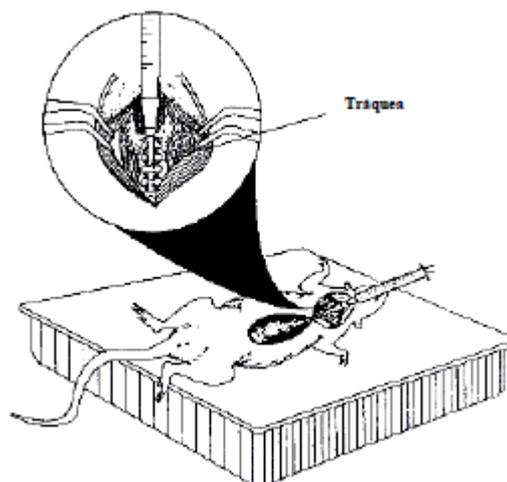


Fig.11. Esquema del método de administración intratraqueal de complejos en ratones.

Después se les colocó un imán redondo como se observa en la fig.12 a la altura del tórax del ratón utilizando resistol o algún otro adhesivo por un lapso de 72 horas.



Fig.12. Imán en ratones A) Se pega a la altura de la caja torácica. B) y se ajusta con un pedazo de tela y velcro para evitar su movilización.

Después de las 72 horas, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se removieron los pulmones, se lavaron con PBS y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml (Fig.13) y se congelaron en nitrógeno líquido. Después se les agregó un buffer de lisis compuesto de (70 mM HEPES, 7 mM MgSO₄, 3mM dithiothreitol y BSA al 1%). Se siguió el siguiente protocolo de acuerdo a Yoshimura y cols., 1992:

- 1.- Los pulmones se colocaron en un mortero y se homogenizaron.
- 2.- Se tomó el homogenizado y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C.
- 3.- Se recuperó el sobrenadante y se repitió el paso 5-6 por tres veces.
- 4.- A este homogenizado se le agrega el sustrato de luciferasa el cuál es luciferina y se lleva a un lector de placas.



Fig.13. Pulmones divididos en 4 partes colocados en tubos eppendorf de 1.5 ml.

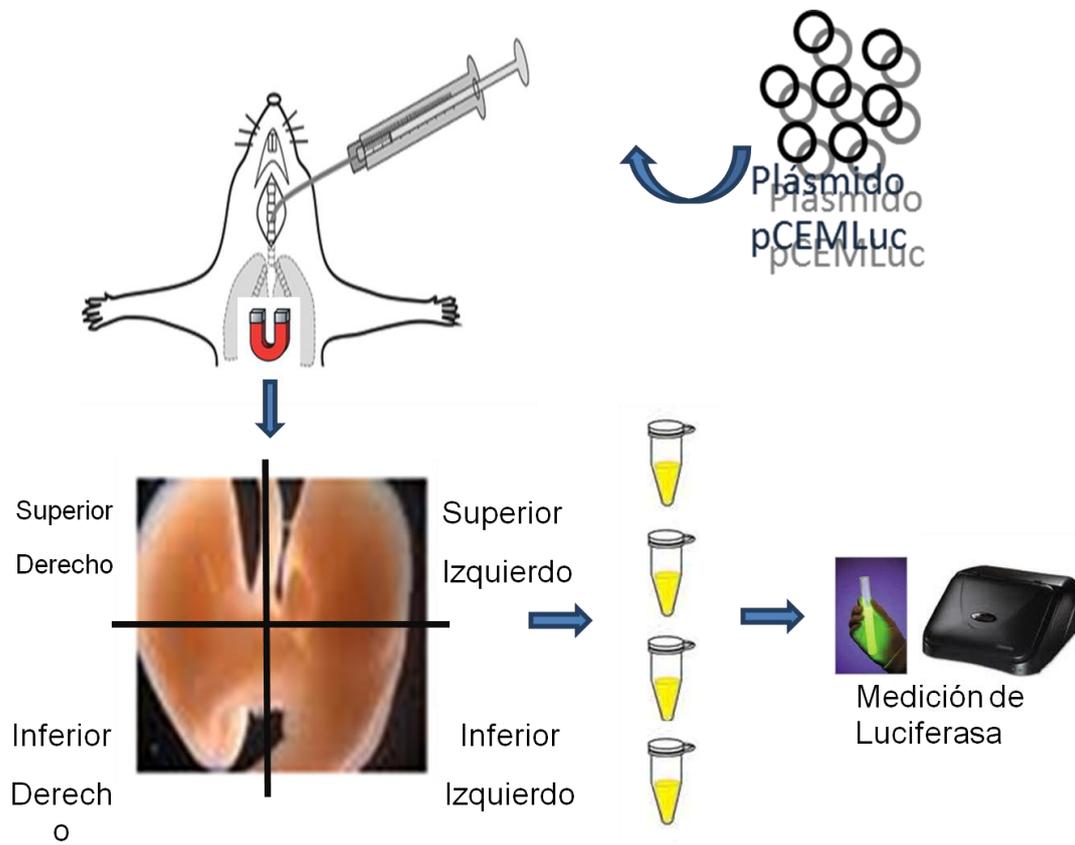


Fig.14. Representación general del proceso de administración intra-traqueal de plásmidos para determinar la expresión de luciferasa en las diferentes regiones del pulmón.

5.12. Procesamiento estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la evaluación de las transfecciones se determinó si había diferencia entre los grupos mediante la prueba de Anova y si existía diferencia estadísticamente significativa se realizó comparación de medias por la prueba de Tukey no paramétrico. Estos análisis se realizaron utilizando el programa SPSS versión 17.0.

6. RESULTADOS

6.1. Formación de nanopartículas magnéticas de quitosán, morfología y caracterización.

Las nanopartículas formadas por la técnica de gelación iónica, la cual se basa en la interacción entre los polianiones cargados negativamente del TPP y las cargas positivas del quitosán. Ésta técnica fue elegida con el propósito de atrapar plásmido dentro de las nanoestructuras debido a sus condiciones extremadamente moderadas de encapsulación. Además el TPP fué elegido como un agente entrecruzante polianiónico debido a sus propiedades únicas como no-toxicidad y habilidad instantánea de gelificarse al contacto con el quitosán. Más aún como describió Peng J y cols., el TPP tiene una excelente habilidad para promover la síntesis de partículas muy pequeñas con los menores cambios en la carga de su superficie proponiéndolo como el candidato ideal para la manufacturación de nanopartículas para aplicaciones de terapia génica. El goteo preciso del TPP en la solución del quitosán permite la formación de nanopartículas con tamaños comparables en la escala nanométrica demostraron formas esféricas bien definidas como se observa en las figuras 15 y 16.

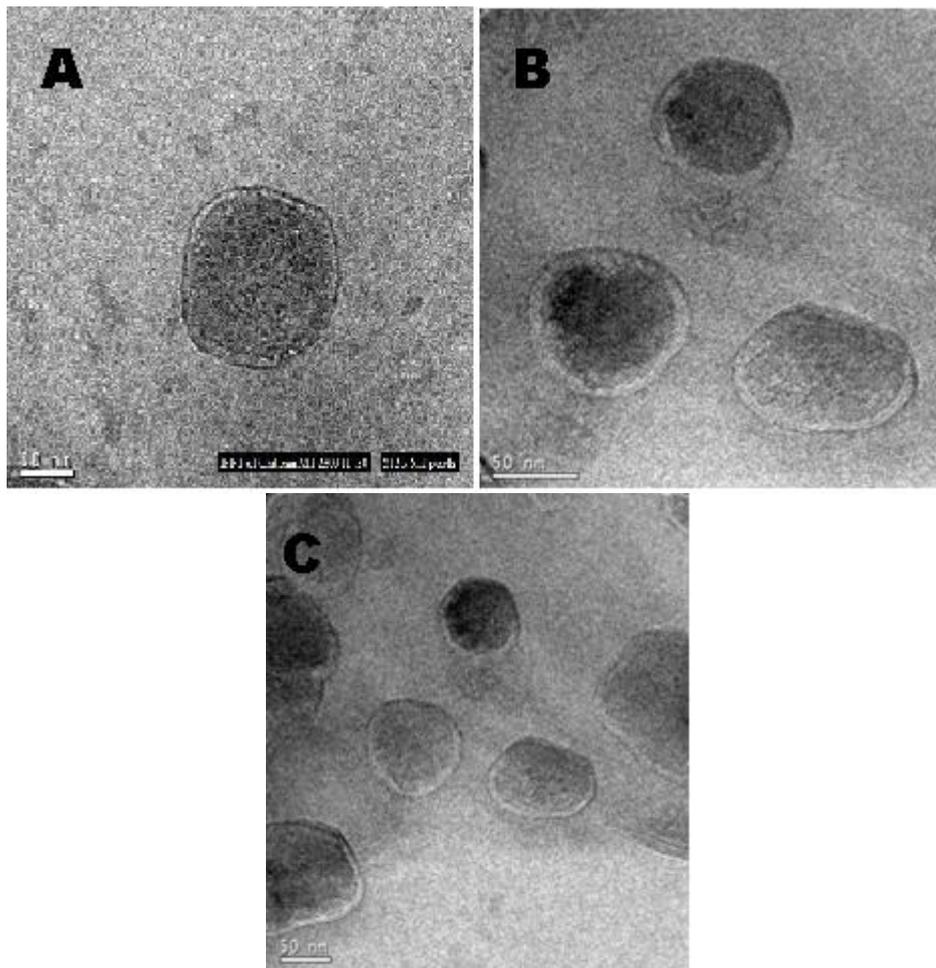


Fig.15. Imágenes de MET de las nanopartículas de quitosán producidas por el método de gelación iónica
 a) Se observa una sola de tamaño de 100 nm b) y c) grupo de nanopartículas.

Estos complejos se formaron solamente con quitosán y plásmido, también se tomaron imágenes de otros complejos agregando nanopartícula magnética y pudimos observar que aumentan un poco su tamaño a 200 nm y se ven más electrodensas.

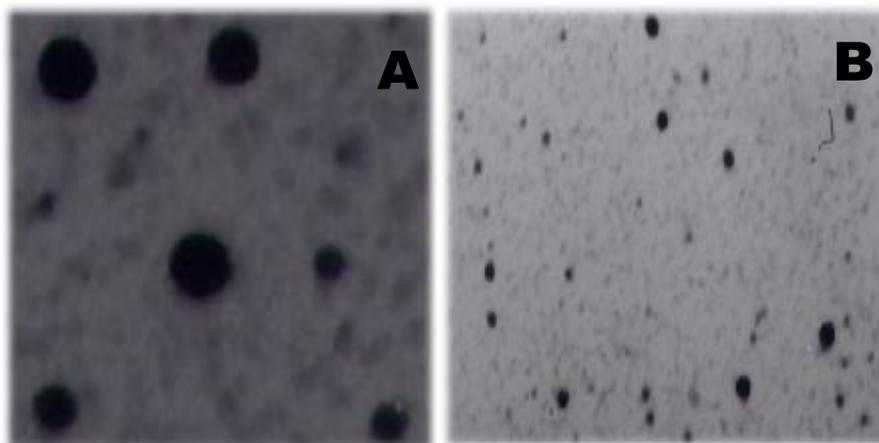


Fig.16. Imágenes de MET de las nanopartículas magnéticas de 200-250 nm

De igual manera fueron escaneadas por microscopía de fuerza atómica como previamente describió Yoo HS y cols., 2005 para evaluar su morfología. Se observaron los complejos plásmido-quitósán y quitósán-npm-plásmido (Figs.17 y 18).

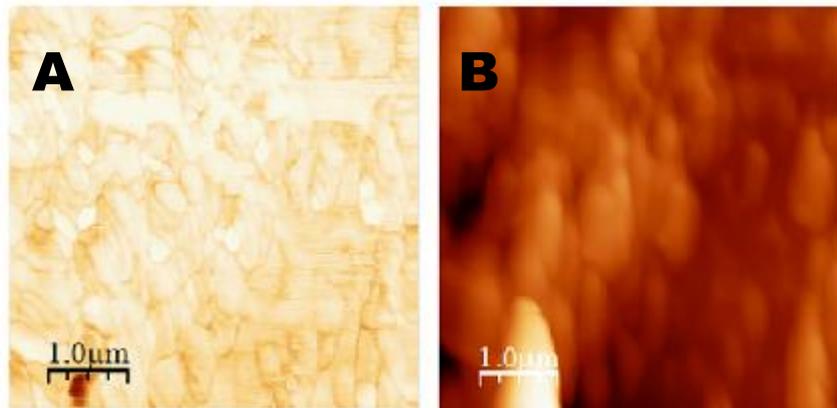


Fig.17. Imágenes de MFA con el plásmido y quitósán

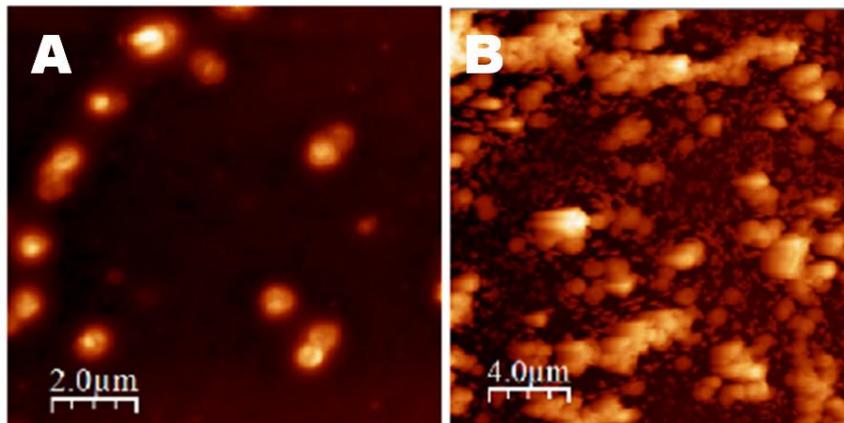


Fig.18. Imágenes de MFA de los complejos con la nanopartícula magnética.

6.2. Protección de la nanopartícula y liberación invitro del Plásmido

El desarrollo de las nanopartículas que son estables en ambiente extracelulares para la protección del material genético, las nucleasas del suero son la mayor preocupación que podría afectar la estabilidad del ADN y consecuentemente su eficacia

de transfección. Para analizar si existe una adecuada protección del ADN plasmídico promovida por su encapsulación en las nanopartículas de éste trabajo, se realizó una prueba utilizando un gel de agarosa y se probaron diferentes ratios quitosán-plásmido para elegir el mejor (Fig.18). Al escoger el ratio más óptimo 1:60 se volvió a correr en otro gel donde en dos carriles se incorporó el plásmido solo (pCEM-Luc) 1 μ l y en otros dos carriles el plásmido con quitosán para observar la diferencia como se observa en la fig.19.

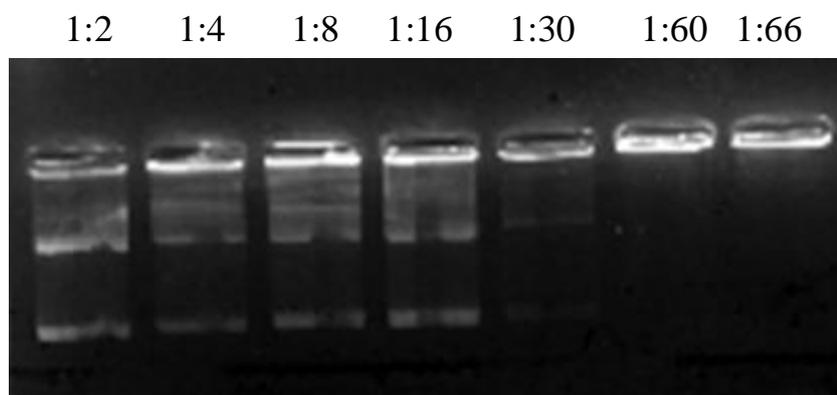


Fig.19. Gel de agarosa donde se incorporación complejos plásmido-quitosán a diferentes ratios.

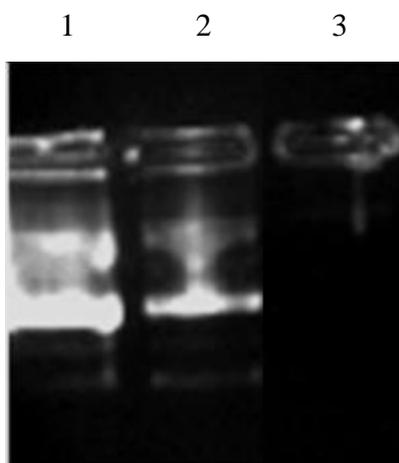


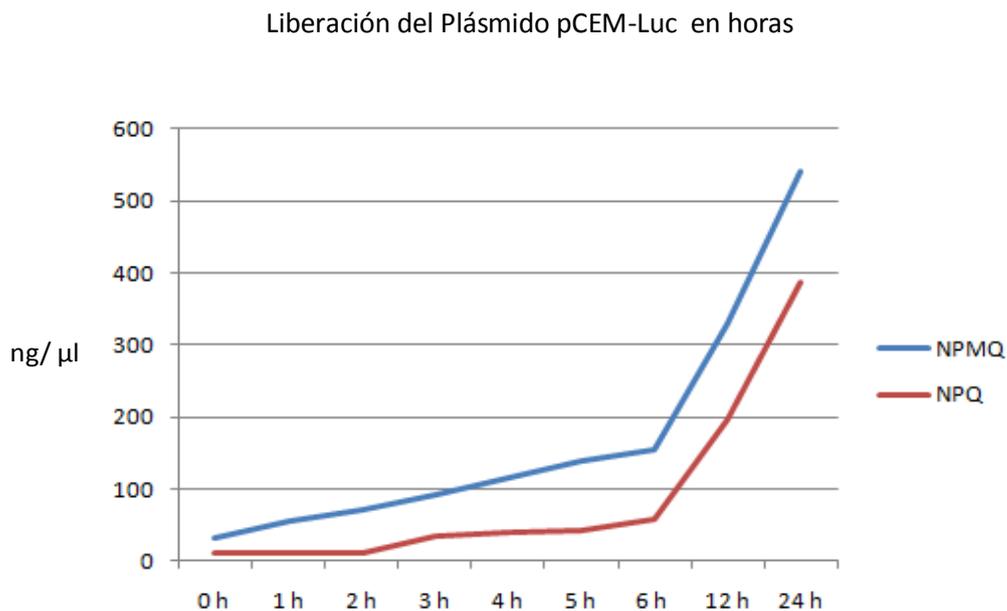
Fig. 20. Gel de agarosa donde se muestra la retención de plásmido solo en los carriles 1 y 2, en el carril 3 se muestra el plásmido con quitosán.

6.3. Eficiencia de encapsulación de las nanopartículas

Después de verificar si las nanopartículas que construimos eran capaces de retener el plásmido, requerimos cuantificar la cantidad que lograban atrapar y se calculó utilizando la siguiente fórmula:

Eficiencia de encapsulación (%) = $\frac{\text{Total de plásmido agregado} - \text{Plásmido libre en sobrenadante}}{\text{Total de plásmido agregado}}$.

Se obtuvo un total del 99% de eficiencia de encapsulación con el plásmido pCEM-Luc. También midió en horas el plásmido que se liberaba, esto se midió cada hora, hasta las 24 hrs y pudimos observar que éste se libera gradualmente como se observa en la fig. 20.



EE= 99%

Fig.21. Representación gráfica de liberación de plásmido de las nanopartículas en horas.

6.4. Medición del potencial zeta

El potencial zeta es un importante parámetro en una gran variedad de áreas como la medicina y farmacéuticas. Para éste caso de nanopartículas de quitosán, el potencial

zeta fué utilizado para evaluar la estabilidad de la suspensión y la adhesión de partículas a sistemas biológicos.

El potencial zeta resulta de las cargas eléctricas relacionadas de partículas en un líquido y el resultado fué de -27 mV con una polaridad negativa como se muestra en la tabla 2, para este resultado se utilizó un zetasiser. Prácticamente todos los coloides son negativos -14 a 30 mV. A más negativo la estabilidad aumenta. Si el potencial zeta es -30 ó menos, la repulsión es suficiente para conferir una gran estabilidad.

Mobility	-2.15u/s/V/cm
Zeta Potentia	-27.47 mv
Charge	-0.03954 fC
Polarity	Negative
Conductivity	536 uS/cm

Tabla II. Se muestra el potencial zeta de las nanopartículas.

6.5. Determinación del efecto de los complejos formados por nanopartículas magnéticas de quitosán para inducir la expresión del gene de la luciferasa en la línea celular de pulmón B16F10 bajo la influencia de un campo magnético:

Las transfecciones en la línea celular B16F10 se analizaron a las 24 horas y obtuvimos los siguientes resultados (Fig.22).

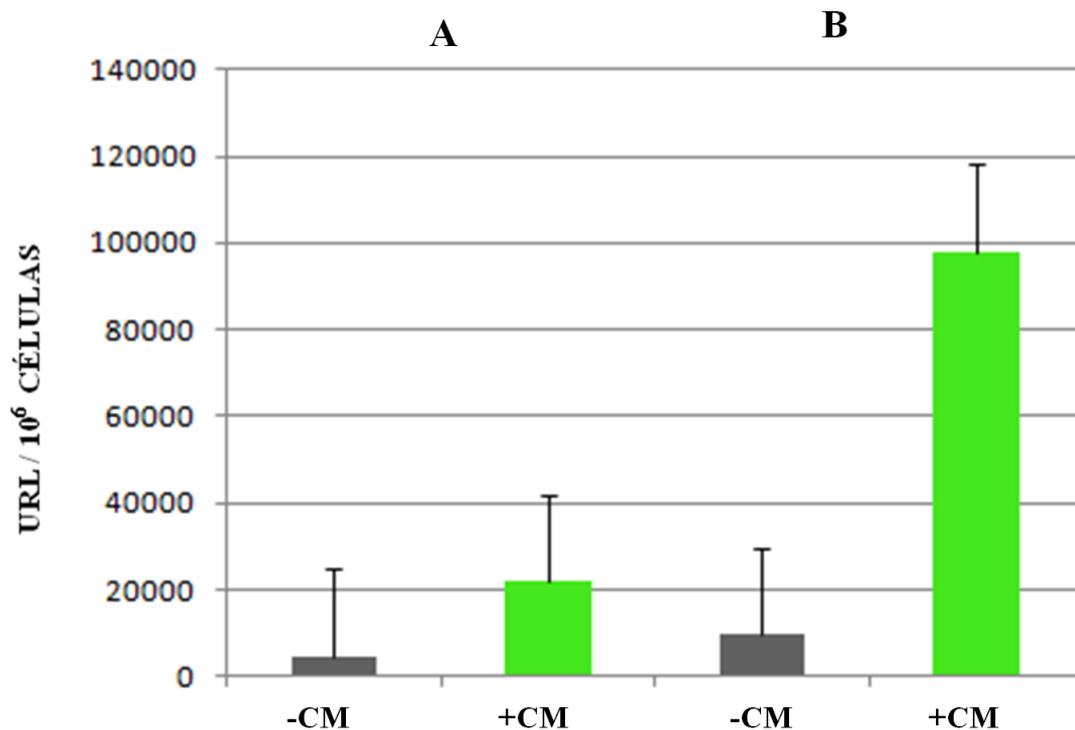


Fig.22. Expresión de luciferasa en la línea celular B16F10 transfectada con: A) plásmido/quitosán sin exposición a campo magnético y con campo magnético. B) plásmido/quitosán/npm sin campo magnético y con campo magnético.

Se realizaron cuatro transfecciones en la línea celular B16F10, dos con plásmido-quitosán formados por el método de gelación iónica una sin exposición a campo magnético y observamos que los valores que alcanza son 4,585 URL y en cambio cuando el cultivo celular se pone en contacto con la placa magnetofectora alcanza los 9,421 URL, esto es el doble del primero.

Después realizamos otros dos experimentos donde se transfectó plásmido/quitosán/nanopartícula magnética de igual manera con el método de gelación iónica y en donde no pusimos en contacto el cultivo celular con un campo magnético obtuvimos valores de 20,000 URL y donde si lo pusimos los valores llegaron hasta casi 100,000 URL.

6.6. Determinación del efecto de los complejos formados por nanopartículas de quitosán para inducir la expresión del gene de la luciferasa en ratones bajo la influencia de un campo magnético:

Los análisis en los homogenizados de pulmón de ratón se determinaron por medio de la expresión del gene de luciferasa y se obtuvieron los siguientes resultados así como sus respectivas desviaciones estándar:

Tabla III. Resultados del análisis de la transfección in vivo utilizando el plásmido desnudo sin exposición a magneto.

PARTE DEL PULMÓN	URL	URL	URL
Izquierdo distal	2,222	2,243	3,772
Izquierdo apical	3,314	3,571	3,541
Derecho distal	3,242	3,514	3,325
Derecho apical	2,892	2,930	2,750

Tabla IV. Desviación estándar de los resultados obtenidos con el plásmido desnudo sin presencia de campo magnético.

PARTE DEL PULMÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (σ)
Izquierdo distal	725
Izquierdo apical	140
Derecho distal	140
Derecho apical	95

Tabla V. Resultados del análisis de la transfección in vivo utilizando el plásmido desnudo con exposición a magneto

PARTE DEL PULMÓN	URL	URL	URL
Izquierdo distal	13,965	14,871	16,325
Izquierdo apical	30,110	20,072	20,612
Derecho distal	7,918	10,971	23,887
Derecho apical	9,523	7,158	14,757

Tabla VI. Desviación estándar de los resultados obtenidos con el plásmido desnudo con presencia de campo magnético

PARTE DEL PULMÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (σ)
Izquierdo distal	1191
Izquierdo apical	5647
Derecho distal	8477
Derecho apical	3889

Tabla VII. Resultados del análisis de la transfección in vivo realizadas con la nanopartículas de quitosán y plásmido con exposición a magneto

PARTE DEL PULMÓN	URL	URL	URL
Izquierdo distal	23,239	14,337	25,610
Izquierdo apical	41,365	27,688	29,953
Derecho distal	23,000	27,776	31,889
Derecho apical	17,408	16,989	18,778

Tabla VIII. . Desviación estándar de los resultados obtenidos con las nanopartículas de quitosán y plásmido con exposición a magneto

PARTE DEL PULMÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (σ)
Izquierdo distal	5994
Izquierdo apical	7330
Derecho distal	4449
Derecho apical	936

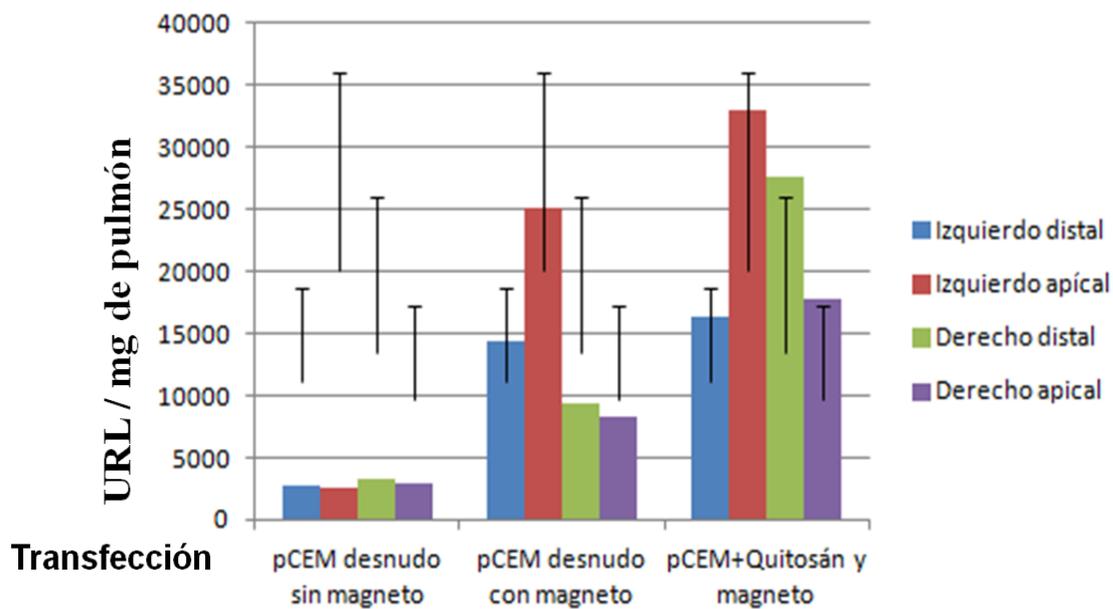


Fig.23. Grafica de los resultados obtenidos de los experimentos de transfeccion in vivo en las diferentes regiones del pulmón aplicando el plasmido pCEM-Luc en distintas formas de presentación.

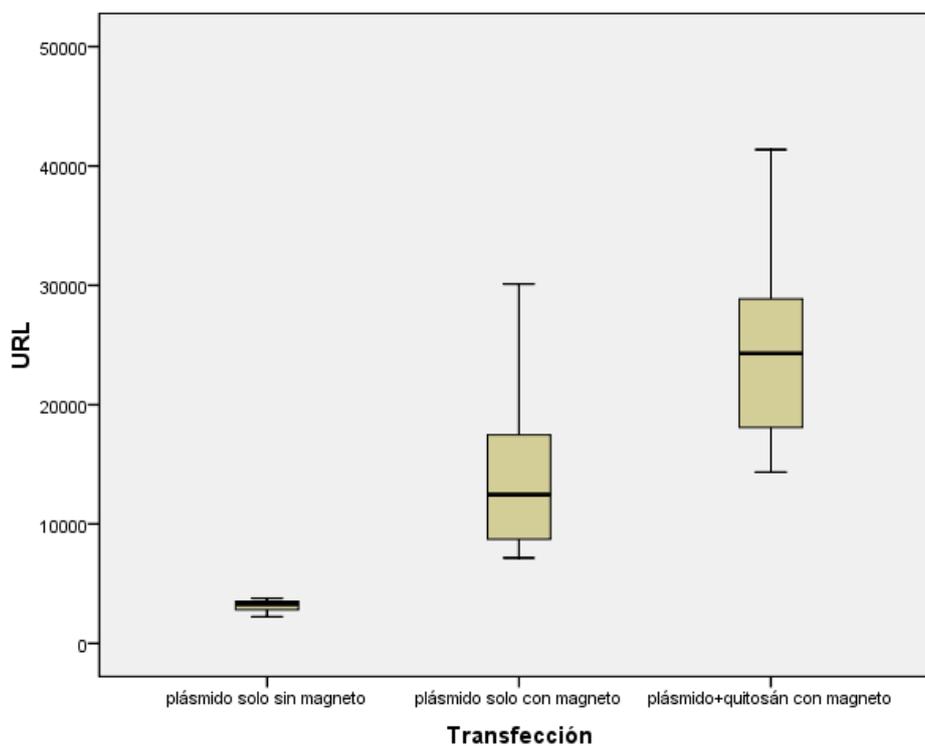


Fig.24. Grafica de los resultados obtenidos de los experimentos de transfección in vivo representando las medias de todos los datos de expresión de cada región del pulmón.

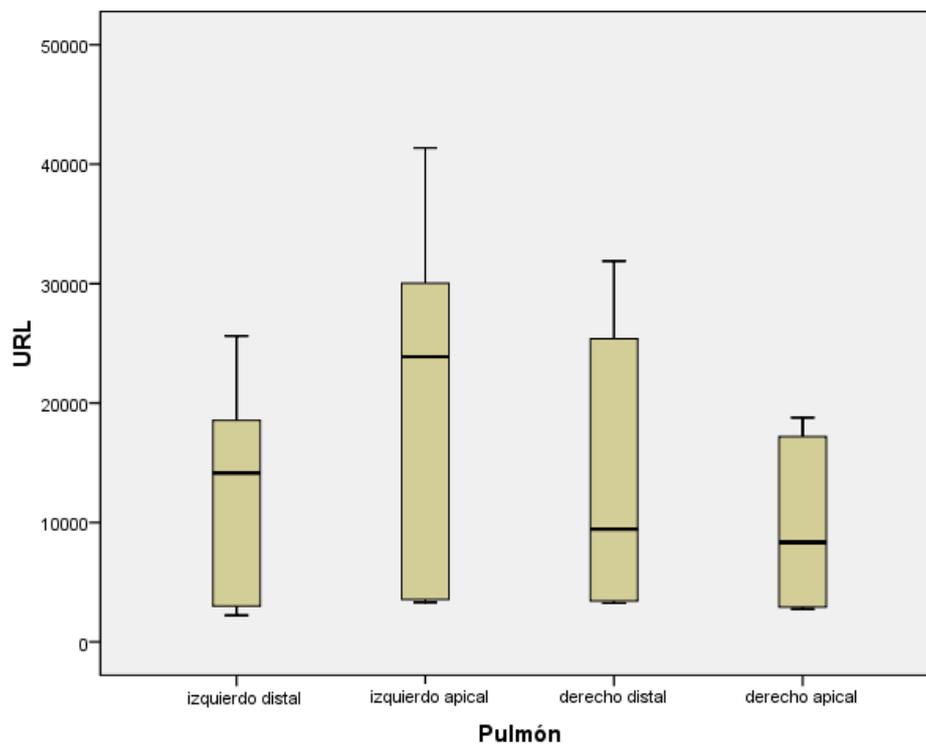


Fig.25. Grafica de los resultados obtenidos de los experimentos de transfección in vivo representando las medias de todos los datos de expresión de cada región del pulmón con la administración de nanopartículas de quitosán-plásmido y con exposición a magneto.

Dependent Variable:URL

Source	F	Sig.
Model	59,713	,000
Pulmón	11,869	,000
Transfección	101,883	,000
Pulmón * Transfección	4,012	,008
Error		
Total		

Tabla XI. Prueba de Anova de Fisher donde se asocian las variables y su significancia.

7. DISCUSIÓN

Con el objetivo de obtener un sistema con propiedades adecuadas para actuar como transportador capaz de dirigirse, retenerse y expresarse en pulmón, se evaluó un sistema formado por nanopartículas de quitosán con un acarreador que contiene el gene reportero de luciferasa. Una única ventaja de éstos complejos es que el acarreador atrapado contiene un plásmido que es inducible por un campo magnético externo.

Utilizamos el polímero quitosán como acarreador de estas partículas ya que desde su descubrimiento como sistema de envío para plásmidos por Mumper y cols., ha sido considerado como buen candidato para dicho objetivo por sus peculiares características que es biocompatible, biodegradable y su baja toxicidad y a sido reportado que se a utilizado en diversos estudios (Hai Q y cols., 2001) (Hali B. y cols., 2010) (Suna O.T. y Julide A., 2011) (Yun S., 2009) y (Kopping-Hoggard y cols., 2001).

El envío dirigido magnético in vitro de genes fue demostrado por otros investigadores, utilizando nanopartículas de óxido de fierro que fueron capaces de hacer complejos con el ADN por medio de las interacciones electrostáticas utilizando PEI. (Scherer y plank 2002).

En este estudio, tratamos de obtener nanopartículas por el método de gelación iónica y se eligió con el propósito de atrapar plásmido dentro de las nanoestructuras debido a las condiciones extremas de propiedad de encapsulamiento (Moura M y cols., 2009). Pudimos obtener de un tamaño <400 nm para facilitar la toma de partículas y como vimos en los resultados obtuvimos unas de 150- 200 nm con una forma esférica, esto es importante ya que fue previamente demostrado que la forma de las nanopartículas influencia ampliamente en la eficiencia de transfección, además de que tienen mejor atrapamiento que las de diferente morfología. Este interesante fenómeno está relacionado con el tiempo que tarda la célula en atrapar las diferentes formas de partículas, cambiando de acuerdo a su relación superficie-volumen (Chitharini B and Chan W., 2007). La carga de superficie fue de -25 mV, ésta naturaleza hidrofílica ayudó para estabilizar a las nanopartículas y proteger el plásmido de la degradación de

nucleasas. Esto confirmó, como ya se había demostrado en estudios anteriores que el quitosán tiene el potencial para envío de plásmido al núcleo de la célula sin ser dañado (Yuan Y y cols., 2008).

El atrapamiento de plásmido dentro de las nanopartículas es esencial para el éxito del envío de genes. Más aún la habilidad de sistema acarreador de cargar el mayor material que sea posible es un importante parámetro y en nuestro trabajo obtuvimos una del 99%.

En los experimentos realizados *in vitro* con la línea celular B16F10 pudimos observar que al transfectar complejos compuestos por plásmido-quitosán y sin la exposición a un campo magnético hay una expresión del gene de luciferasa muy baja, y cuando lo pusimos en contacto con el campo magnético ésta expresión se elevó al doble. Con este experimento pudimos afirmar que el promotor que contiene el plásmido pCEM-Luc se activa al ponerlo en contacto con el campo magnético. En los otros dos experimentos donde agregamos la partícula magnética al complejo los niveles de expresión se elevaron hasta 10 veces más que donde no incluíamos la partícula magnética.

Para los experimentos *in vivo* se optó por el método de administración intratraqueal de nanopartículas en ratones por simplicidad, ya que éste método de rápido envío de partículas a los pulmones es asegurada y permite una administración exacta de la dosis que requerimos. Cuando inmunizamos a los ratones con el plásmido desnudo observamos que hay niveles detectables de expresión del gene luciferasa, muy bajos pero si los hay. Después cuando inmunizamos a los ratones con el plásmido desnudo poniendo un campo magnético externo, los niveles de expresión se aumentaron como pudimos ver en la tabla III, pero se elevaron aún más al realizar complejos con el plásmido y quitosán como se observa en la tabla V, esto debido a que el quitosán logra proteger al plásmido hasta el sitio deseado en este caso los pulmones. Entonces podemos ver claramente que si hay una diferencia significativa entre las transfecciones realizadas (Fig. 23).

Al analizar las 4 regiones del pulmón en las transfecciones pudimos ver que hay diferencia de la expresión en cada parte encontrando más alta en la parte apical

izquierda de todas las transfecciones (fig.22) y esto se analizó con la prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar que eran diferentes.

También se realizó una prueba de Anova de Fisher con un nivel de significancia de $\alpha 0.05$ para ver la interacción entre las variables que en este caso fueron las partes del pulmón y transfección (Tabla VIII) y pudimos observar que si hay algunos factores de cada parte del pulmón que interaccionan con cada tratamiento.

8. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los datos obtenidos en cada presente investigación podemos concluir que:

- 1.- El método de gelación iónica para producir nanopartículas de quitosán es fácil, rápida y puede ser estable, así como aplicada para atrapar otra molécula como una droga ó proteína.
- 2.- Las nanopartículas de quitosán producidas por el método de gelación iónica son específicas, monodispersas y de escala nanométrica.
- 3.- Las nanopartículas de quitosán tienen una alta eficiencia de rapamiento de plásmidos.
- 4.- Las nanopartículas de quitosán son adecuados acarreadores de plásmido a las células para lograr su transferencia in vitro.
- 5.- Los nanoacarreadores basados en quitosán producidas en este estudio transfectan células in vitro con plásmido que puede ser activado con la influencia de un campo magnético externo.
- 6.- Los nanoacarreadores basados en quitosán producidos en este estudio son capaces de transfectar plásmido al tejido pulmonar de ratón cuando son administrados por una vía intratraqueal.
- 7.- Los nanoacarreadores basados en quitosán producidos en este estudio son capaces de transfectar plásmidos en el tejido pulmonar que pueden ser activados para expresar genes bajo el control de un campo magnético externo.

Este estudio representa el soporte experimental que demuestra que los nanoacarreadores basados en quitosán son vehículos adecuados para el envío dirigido y activación de genes en el tejido pulmonar bajo la influencia de un campo magnético externo. Asimismo este estudio demuestra que el promotor presente en el plásmido pCEM-Luc que tiene elementos de respuesta a un campo magnético puede ser utilizado para manipular la expresión de genes en el tejido pulmonar con un campo magnético externo.

Los datos presentados en esta tesis abren nuevas avenidas de control espacio-temporal de la expresión de genes de tejidos específicos y proporciona las bases para plantear que el sistema de nanoacarreadores basados en quitosán y plásmidos con elementos de respuesta a campos magnéticos puede tener aplicación para el envío dirigido y control remoto de la expresión de genes terapéuticos en un tejido específico.

LITERATURA CITADA

Azevedo V., Levitus G., Miyoshi A., Candido A., Goes A and Oliveira S.1999. Main features of DNA-based immunization vectors. *J of Med and Biol Research.* 32: 147-163.

Biswaranjan M., Aswalb J., Kohlbrecherc and Bohidara H. 2005. Synthesis of Gelatin Nanoparticles via Simple Coacervation. *Surface Sci. Technol.* 21:149-160, 2005

Calvo P., Remuñan-Lopez C., Vila-Jato J. L and Alonso M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines.1997. *Pharm. Res.* 14, 1431-1436.

Chen Y, Mohanraj VJ, Parkin JE. Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an antiangiogenesis peptide. 2006. *Letters in Peptide Sci.* 10: 621-627.

Cohen H., Levy RJ and Fishbein I. 2000. Sustained delivery and expression of ADN encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther.* 7:1895-1905.

Chitharini B and Chan W. 2007. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 7:1542-50.

Dailey L. A., Schmehl T.; Gessler T., Wittmar M., Grimminger F., Seeger W and Kissel T. 2003. Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features. *J of Control Release.* 86, 131-144.

Diaz David J.C y Barrera Valle M. 2006. ADN vaccines: a promising medicine for the veterinary patient. *Rev electronica Vet.* 2: 1695-7504.

Dobson J. 2006. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. *J of Gene Ther.*283-287.

Goycoolea F.M., Higuera-Ciapara I. and M.J. Alonso. 2008. Chitosan-polysaccharide blended nanoparticles for controlled drug delivery. *Reis R.(Ed).* 760.

Gill D., Davies L.,Pringle I and Hyde S. 2004. The development of gene therapy for diseases of the lung. *J of Cell. Mol. Life Sci.* 61: 355–368.

Gurunathan, S.; Klinman, D.M. and Seder, R.A. 2000. DNA Vaccines: Immunology, Application and Optimization. *Annual Reviews Immunology.* 927-974.

Hai-Quan Maa., Krishnendu Roy., Vu L.. Troung-Leb., Kevin A., Janesa., Kevin Y., Yan Wanga., J. Thomas Augustb and Kam W. Leonga.2001. Chitosan-ADN nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. of Controlled Release.* 399–421.

Hali Bordelon., Alexandru S. Biris., Cristina M. Sabliov and W. Todd Monroe. 2010. Characterization of Plasmid ADN Location within Chitosan/PLGA/pADN Nanoparticle Complexes Designed for Gene Delivery. *J. of Nanomaterials*.7: 205-214.

Hashimoto M., Zhihong Y., Yohei and Toshinori S. 2005. Non-viral gene therapy. Hiyoshi, Kohoku-ku. *J of gene Ther*. 263-272.

Heredia-Rojas J A., Rodríguez- De la Fuente., Alcocer-González J., Flores R., Rodríguez-Padilla C. Santoyo-Stephano M., Castañeda-Garza E and Taméz-Guerra R. 2010. Effect of 60 Hz magnetic fields on the activation of hsp70 promoter in cultured INER-37 and RMA E7 cells. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Animal* . 46:758–763

Heinemann L., W. Klappoth, K. Rave, B. Hompesch, R. Linkeschowa and T. Heise. 2000. Time-action profile of the long-acting insulin analog insulin glargine (HOE901) in comparison with those of NPH insulin and placebo. *J of Diabetes Care*. 23, 1343.

Hritcu D., Popa M., Popa N., Badescu V and Balan V. 2008. Preparation and characterization of magnetic chitosan nanospheres. *Turk J Chem*.785-796.

Janes K., Calvo P and Alonso M. 2001. Polysaccharide colloidal particle as delivery systems for macromolecules. *And Drug Deliv Rev*. 83-97.

Jong-Ryul J., Seung-Jun L., Jong-duk K. and Sung-Chul S., 2004. Magnetic properties of Fe₃O₄ Nanoparticles Encapsulated with poly (D, L Lactide-Co-Glycolide). *IEEE transactions on magnetics*. 3015-3017.

Kavaz TD., Ozturk E., Bayrman C. and Denkbaz EB. 2008. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles for diverse biomedical applications. *J of Spri Sci*. 313-320.

Kingston R., T J Schuetz and Z Larin. 1987. Heat-inducible human factor that binds to a human hsp70 promoter. *Mol Cell Biol*. 7: 1530–1534.

Koping-Hoggard M., I. Tubulekas., H. Guan¹., K. Edwards., M. Nilsson., KM Varum and P. Artursson. 2001. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure–property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *J of Gene Ther*.1108–1121.

Kowalezyk D and Ertl J. 1999. Immune responses to ADN vaccines. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*. (55) 751–770.

Krishna A. Sailaja., Amareshwar P., Chakravarty P. 2010. Chitosan nanoparticles as a drug delivery system. *J of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 1:174.

Langer R. 2000. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Acc Chem Res.* 94-101.

Liu Margaret A., Wahren B. and Karlson Hedestam G. 2006. ADN vaccines: recent developments and future possibilities. *J. of Hum Gene Ther.* 1051-1061.

Lin H., Blank M and Goodman R. 1999. A magnetic field- responsive domain in the human HSP70 promoter. *J. Cell Biochem.* 170-176.

McBain C S., Yiu HP and Dobson J. 2008. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int J Nanomed.* (3) 169-180.

Mota-Sanchez J. 2009. ADN Vaccines: Induction of the immune response. *Salud Pública Mex;* 51 suppl 3:S463-S469.

Moura M., Aouada F., Avena-Bustillos R., Mc Hugh T., Krochta J and Matosso L. 2009. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *J of Food Eng.* 448-53.

Paños I., R. Harris., N. Acosta., B. Miralles and A. Heras . 2006. Study of the amount of chitosan bound to alginate in polyelectrolyte complexes. *Advances in Chitin Science.* 637-644.

Plank, C., Scherer, F., Schillinger, U., Bergemann, C., and Anton, M. 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *J. Liposome Res.* 29-32.

Scherer F., Anton M., Schillinger U., Henke J., Bergemann C., Kruger A., Gansbacher B and Plank, C. 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 102-109.

Schurch, S., Gehr, P., Im Hof, V., Geiser, M., Green, F.H.Y., 1990. Surfactant displaces particles toward the epithelium in airways and alveoli. *Respir. Physiol.* 80: 17-32.

Schwerdt JI., Goya GF., Calatayud MP., Hereñú CB., Reggiani PC and Goya RG. 2012. Magnetic field-assisted gene delivery: achievements and therapeutic potential. *Curr Gene Ther.* 116-26.

Suna Özbaş-Tura and Jülide Akbuğa. 2011. Plasmid ADN-loaded chitosan/TPP nanoparticles for topical gene delivery. *Drug Delivery;* 18: 218-225.

Wang Chun., Xiong FU and Yang Liansheng. 2007. Water soluble chitosan as a novel carrier system protein delivery. *J of Chinese sci bulletin* 52:883-889.

Yamamoto A., Okumura S., Fukuda Y., Fukui M., Takahashi K and Muranishi S. 1997. Improvement of the pulmonary absorption of (Asul,7)-eel calcitonin by various absorption enhancers and their pulmonary toxicity in rats. *J. Pharm. Sci.* 86:1144-1147.

Yoshimura K., M A Rosenfeld., H Nakamura., E M Scherer., A Pavirani., J P Lecocq., and R G Crystal. 1992. *Nucleic Acids Res.* 20: 3233–3240.

Yuan Y., Tan J., Wang Y., Quian C and Zhang M. 2008. Chitosan nanoparticles as non viral gene delivery vehicles based on atomic force microscopy study. *Acta Biochim Sin.* 41:515.

Yun Sun., Zhi-long Chen., Xiao-xia Yang., Peng Huang., Xin-ping Zhou and Xiao-xia Du. 2009. Magnetic chitosan nanoparticles as a drug delivery system for targeting photodynamic therapy. *Nanotechnology.* 20-25.

Zhang L., Gu FX., Chan JM., Wang Az., Langer Rs and Farokhzad OC., 2008. *Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments.* 83:761-769.