

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**USO DE MONOCITOS COMO ACARREADORES DE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS, ACOMPLEJADAS CON QUITOSÁN/ADN PARA EL ENVÍO
DIRIGIDO A TUMOR**

POR

RAFAEL DE LA HOZ CAMACHO

**COMO REQUISITO PARCIAL PADA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

ENERO, 2019

**USO DE MONOCITOS COMO ACARREADORES DE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS, ACOMPLEJADAS CON QUITOSÁN/ADN PARA EL ENVÍO
DIRIGIDO A TUMOR**

Comité de Tesis

PRESIDENTE

Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

SECRETARIO

Dr. Juan Manuel Alcocer González

VOCAL

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

VOCAL

Dr. José Alberto Valadez Lira

VOCAL

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

**USO DE MONOCITOS COMO ACARREADORES DE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS, ACOMPLEJADAS CON QUITOSÁN/ADN PARA EL ENVÍO
DIRIGIDO A TUMOR**

Dirección de Tesis

DIRECTOR
Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

LUGAR DE TRABAJO

El presente proyecto de investigación fue realizado en la Unidad de Inmunología Molecular, perteneciente al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Este trabajo de investigación (Tesis) se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del laboratorio de Inmunología y Virología.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Comité Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización y obtención de este grado (CVU 825051). Gracias Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por abrirme las puertas de un gran lugar, lleno de gente talentosa de la cual aún tengo mucho que aprender.

A la Dra. Itza E. Luna Cruz, por confiar en mí, por sus enseñanzas, por su tiempo, por su invaluable guía a través de estos dos años y por colaborar en gran medida a mi formación profesional.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González por su tiempo, su paciencia, su trato y por guiarme a tomar las mejores decisiones, es un gran ejemplo para mí.

A la Dra. Lydia Rivera, por siempre estar preocupada por mí y ayudarme en los momentos más difíciles.

A Daniel Terrazas por su invaluable ayuda y guía durante todo mi trayecto en el laboratorio, por dejar de ser compañero de laboratorio y convertirse en un leal amigo. A Raymundo Leal por tenerme paciencia y siempre estar dispuesto a ayudar en los momentos más complicados, por lo buenos y malos momentos, pero sobre todo por su amistad. A Margarita Villegas, por sus consejos, por enseñarme a abrir mi mente, a no ser cuadrado y a vivir el laboratorio. A Paulina y a Jorge por los momentos compartidos dentro y fuera del salón de clases.

A Melissa, por siempre estar ahí, por no dejarme caer y por motivarme a siempre salir adelante, a perder el miedo y a disfrutar las pequeñas cosas. Gracias infinitas.

DEDICATORIA

A mis padres por todo el apoyo mostrado durante todo este tiempo, sus consejos, su fuerza y sobre todo su ejemplo.

“Mama said, fulfill the prophecy, be something greater, go make a legacy, manifest destiny, burn your biographies, rewrite your history, light up your wildest dreams, it's uphill for oddities, the stranger crusaders, ain't ever wannabes, the weird and the novelties, don't ever change”.

-Brendon Boyd Urie

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Cáncer y la importancia de su estudio.....	3
2.1.1 Microambiente tumoral.....	4
2.1.2 Hipoxia.....	5
2.1.3 Terapias dirigidas.....	6
2.1.4 Terapias génicas.....	7
2.2 Nanomedicina.....	9
2.2.1 Nanopartículas magnéticas.....	11
2.2.2 Nanopartículas recubiertas de quitosan.....	13
2.3 Sistemas de entrega mediados por células.....	15
2.3.1.1 Eritrocitos.....	20
2.3.1.2 Células madre.....	22
2.3.2 Uso de células del sistema inmunológico.....	23

2.3.2.1 Linfocitos T.....	23
2.3.2.2 Uso de monocitos y macrófagos como acarreadores.....	24
III. JUSTIFICACIÓN.....	34
IV. HIPÓTESIS.....	35
V. OBJETIVOS.....	36
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	36
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
6.1 Elaboración y caracterización de nanocomplejos de pDNA-Quitósán-NPMF.....	38
6.1.1 Caracterización y obtención del plásmido reportero.....	38
6.1.2 Screening rápido de colonias transformadas de <i>E. coli</i> por el método de fenol rápido.....	38
6.1.3 Caracterización del mediante ensayo de restricción.....	39
6.1.4 Extracción de plásmido por Maxiprep.....	40
6.2 Elaboración y caracterización de nanocomplejos de pADN-Quitósán-NPMF.....	40
6.2.1 Preparación de quitósán, tripolifosfato pentasódico y nanopartículas magnéticas fluorescentes.....	41
6.2.2 Elaboración de los nanocomplejos.....	41
6.2.2.1 Ensayo de retención de pDNA.....	43
6.2.2.2 Ensayo de liberación de pDNA.....	43
6.2.3 Caracterización del tamaño de los nanocomplejos magnéticos.....	43
6.2.4 Caracterización del potencial zeta de los nanocomplejos magnéticos.....	43
6.2.7 Evaluación de la citotoxicidad de los nanocomplejos.....	44

6.2.8 Caracterización de la forma y tamaño de las NPMF y los nanocomplejos magnéticos con el uso de microscopia de fuerza atómica.....	44
6.3 Obtención de monocitos a partir de sangre periférica de ratón.....	45
6.4 Obtención de macrófagos a partir de monocitos de ratón.....	46
6.5 Generación de los microbots de monocito y macrófago.....	47
6.5.1 Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en monocito y macrófago.....	47
6.5.2 Caracterización del estado de activación microbots.....	48
6.5.3 Caracterización de los microbots por microscopia de fuerza atómica.....	48
6.5.4 Evaluación <i>in vivo</i> de los microbots.....	48
6.5.5 Análisis de especificad del transporte mediado por el microbot.....	50
6.5.6 Evaluación de la expresión génica.....	50
6.5.7 Homogenización de datos.....	50
6.4.4 Análisis estadístico.....	50
VII. RESULTADOS.....	52
7.1 Elaboración y caracterización de nanocomplejos de nanopartículas magnéticas fluorescentes con quitosán y pADN.....	52
7.1.1 Caracterización del plásmido pHRE-Luc.....	52
7.1.2 Caracterización de perfil de retención y liberación de plásmido pHRE-Luc de los nanocomplejos de Q/pADN.....	53
7.1.2.1 Perfil de retención de los nanocomplejos de Q/pADN.....	53
7.1.3 Caracterización en tamaño y potencial zeta de los nanocomplejos de Q/pADN/NPMF.....	53
7.1.4 Evaluación de la citotoxicidad de los nanocomplejos de Q/pADN/NPMF.....	54

7.1.5	Caracterización en forma y tamaño de las NPMF y los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF por MFA.....	57
7.1.6	Obtención de células.....	58
7.1.7	Obtención de monocitos a partir de sangre periférica de ratón.....	59
7.1.8	Obtención de macrófagos a partir de monocitos de ratón.....	59
7.1.9	Caracterización celular por medio de perfil de liberación de citocinas.....	60
7.2	Caracterización de los microbots basados en monocitos/macrófagos y nanocomplejos.....	61
7.2.1.1	Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en monocitos y nanocomplejos mediante medición de potencial zeta.....	62
7.2.1.2	Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en macrófagos y nanocomplejos mediante medición de potencial zeta.....	62
7.2.2	Caracterización de los microbots basados en monocitos/macrófagos y nanocomplejos por AFM.....	64
7.2.3	Caracterización del estado de activación de las células mediante un perfil de liberación de citocinas medidas por citometría de flujo.....	66
7.3	Evaluación del microbot <i>in vivo</i> sistema monocito vs sistema macrófago.....	67
7.5.6	Análisis de fluorescencia emitida por las nanopartículas y los órganos para evaluación de capacidad de llegada del microbot.....	67
7.4	Evaluación del microbot basado en monocitos <i>in vivo</i>	68
7.4.1	Análisis de fluorescencia emitida por los órganos y por las NPM para la evaluación de la llegada específica del microbot.....	68
7.4.2	Análisis de la expresión génica del plásmido pHRE_Luc en tumor.....	71
VIII.	DISCUSIÓN.....	72

IX.	CONCLUSIONES	80
X.	PERSPECTIVAS	81
XI.	BIBLIOGRAFÍA	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Terapias asociadas a mecanismos de envío mediados por células aprobados por la FDA	33
Tabla 2. Componentes empleados en la elaboración de nanocomplejos magnéticos.....	42
Tabla 3. Concentración citotóxica 50 para cada uno de los componentes de síntesis y nanocomplejos en 100,000 monocitos.....	57
Tabla 4. Potencial zeta de monocitos a diferentes concentraciones, cargados con nanocomplejos al 50X.....	63
Tabla 5. Potencial zeta de macrófagos a diferentes concentraciones, cargados con nanocomplejos al 50X.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones celulares en el microambiente tumoral.....	5
Figura 2. Vectores usados en pruebas clínicas	8
Figura 3. Tipos de Nanoestructuras.....	10
Figura 4. Materiales para síntesis de NPM que se han probado eficaces en tratamientos.....	13
Figura 5. Estructura del quitosan.....	14
Figura 6. Número de publicaciones buscadas con las palabras clave “cell mediated” y “Drug Delivery”	16
Figura 7. Células circulatorias usadas como acarreadoras de drogas.....	18
Figura 8. Métodos de anclaje o de internalización de drogas a células acarreadoras.....	19
Figura 9. Ventajas y desventajas de algunas células circulatorias con potencial uso como acarreadoras	20
Figura 10. Mecanismo de modificación de glóbulos rojos para su uso como acarreadores.....	21
Figura 11. Vías de transito de células asociadas a sistemas de envío.....	25
Figura 12. Representación de una nanoestructura para sistemas de envío.....	27
Figura 13. Desarrollo de una terapia basada en macrófagos como sistema de envío mediado por células.....	29
Figura 14. Cámara de transmigración.....	31
Figura 15. Mecanismo general del sistema de envío.....	32
Figura 16. Plásmido pHRE_Luc.....	38
Figura 17. Separación de células por Polymorphoprep TM	46
Figura 18. Caracterización del plásmido pHRE-Luc mediante digestión enzimática.....	52
Figura 19. Caracterización del perfil de retención de pADN por parte de los nanocomplejos sintetizados a partir de diferentes radios de Q:pADN.....	53

Figura 20. Liberación de plásmido a lo largo de 144 horas.....	54
Figura 21. Caracterización en tamaño y homogeneidad de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF, usando el radio Q:pADN 60:1.....	55
Figura 22. Caracterización en potencial zeta de los nanocomplejos de Q/pADN/NPMF.....	56
Figura 23. Viabilidad de monocitos expuestos a nanocomplejos y a cada uno de los componentes.....	57
Figura 24. Caracterización por MFA de NPMF y de los nanocomplejos.....	58
Figura 25. Cambios morfológicos de monocitos de acuerdo a tiempo de cultivo.....	59
Figura 26. Activación de monocitos a macrófago mediante la adición de LPS.....	60
Figura 27. Perfil de liberación de citocinas.....	61
Figura 28. Medición del potencial zeta de monocitos.....	63
Figura 29. Medición del potencial zeta de macrófagos.....	64
Figura 30. Microscopía de fuerza atómica de un monocito completo y monocitos en mitosis.....	65
Figura 31. Gráfica de liberación de citocinas a 24 horas de contacto para monocito y macrófago con nanocomplejos al 1X.....	67
Figura 32. Fluorescencia de órganos y tumor de ratones inoculados con los diferentes tratamientos.....	68
Figura 33. Fluorescencia de órganos de ratones inoculados con los diferentes tratamientos.....	69
Figura 34. Fluorescencia de tumor de ratones inoculados con los diferentes tratamientos.....	70
Figura 35. Luminiscencia de tumor de ratones inoculados con los diferentes tratamientos.....	71

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ξ	potencial zeta
μg	microgramo
μL	microlitro
DMEM-F12	Medio Eagle modificado de Dulbecco: Mezcla de nutrientes F12
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G	Gauss
LB	medio Luria Bertani
mL	mililitro
mV	milivolts
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
XTT carboxanilida]	Sodio [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-
NPMF	Nanopartículas magnéticas fluorescentes
pb	Pares de bases
pDNA	DNA plasmídico
rpm	Revoluciones por minuto
T	Tesla
V	volts

RESUMEN

Los sistemas de envío basados en nanoestructuras han demostrado ser una herramienta muy útil para proponer nuevos tratamientos contra cáncer. Estos sistemas pueden ser sintetizados para responder a necesidades específicas de la terapia, pero algunos de ellos tienen que ser inoculados directamente a tumor porque no poseen buena biocompatibilidad. El objetivo principal de esta investigación fue desarrollar un microbot, capaz de focalizar y controlar el envío y la expresión de genes en tejidos blanco como tumores, usando monocitos como acarreadores, acoplejados con nanopartículas magnéticas fluorescentes, quitosan y ADN.

Las nanopartículas magnéticas fluorescentes fueron acoplejadas con quitosan y ADN (usando como plásmido reportero pHRE_Luc, que contiene en su región promotora seis elementos de respuesta a hipoxia) siguiendo la metodología de gelación iónica. Los nanocomplejos fueron caracterizados en tamaño, potencial zeta y citotoxicidad usando la técnica de XTT. Los monocitos se obtuvieron de ratones C57BL/6 hembras de 6-7 semanas por punción cardíaca y estos fueron separados posteriormente por gradiente de densidad. Los microbots fueron sintetizados usando un millón de monocitos con 50 µg de nanocomplejos. Finalmente, hembras de 6-8 semanas C57BL/6 fueron inoculadas de manera subcutánea con células B16F10 de melanoma murino y fueron separadas en 5 grupos de tres ratones cada uno. Después de 10 días de generación del tumor, el primer grupo fue tratado con microbots y fueron guiados a la zona tumoral mediante un campo magnético externo generado por un imán de neodimio de 3T, el segundo grupo fue tratado únicamente con microbots, el tercer grupo fue inoculado con nanocomplejos y aplicando el campo magnético, el cuarto grupo fue tratado con nanocomplejos únicamente para conocer la biodistribución y el quinto grupo fue tratado con PBS y usado como control negativo. A las 48 horas los animales fueron sacrificados siguiendo la norma mexicana MX-NOM-062-ZOO-1999. Pulmones, hígado, corazón, riñones, bazo y tumor fueron removidos y macerados para determinar la eficiencia del sistema mediante la fluorescencia de las nanopartículas magnéticas fluorescentes la expresión génica fue medida por luminiscencia. Los resultados mostraron que el sistema tiene la capacidad de llegar al tumor con alta especificidad y es una opción muy viable para sistemas de envío de genes a tumor.

ABSTRACT

Nano-drug and nano-gene delivery systems have become a very useful tool to propose new treatments for cancer. These systems can be synthesized in order to respond to specific needs of the therapy, but some of them have to be inoculated directly to the tumor site, because their biocompatibility is not the best, leading the immune system to recognize and eliminate them. The main objective of this research was to develop a microbot, to focalize and control the delivery and expression of genes in target tissues such as tumors, using monocytes as carriers, complexed with magnetic fluorescent nanoparticles, chitosan and, pDNA.

Magnetic fluorescent nanoparticles were complexed with chitosan and pDNA (using pHRE_Luc as a reporter plasmid, which contains a promoter that responds to hypoxia) following Calvo and Cols (1997) ionic gelation method; nanocomplexes were characterized by size, zeta potential, atomic force microscopy and, cytotoxicity by XTT assay. Cells were obtained from healthy C57BL/6 mice by cardiac puncture. Monocytes were then isolated using density gradient. Microbots were produced by adding a million monocytes into a suspension containing 50 µg of the nanocomplexes. Finally, female 6-7 week old C57BL/6 mice with subcutaneous tumor previously induced by the injection of B16F10 murine melanoma cells were divided into 5 groups of three mice each. After 10 days of the tumor generation, the first group was treated with microbots using a magnetic field (3T) to attract the nanocomplexes to the tumor site, the second group was treated with microbots only, the third group was treated with nanocomplexes using a magnetic field (3T), to attract them in to the tumor site, the fourth group was inoculated with nanocomplexes only, for biodistribution and the last group was inoculated with pH 7.0 PBS and used as a negative control. After 48 hours, animals were killed following the MX-NOM-062-ZOO-1999. Lungs, liver, kidneys, spleen, heart, and tumor were aseptically removed, after which they were frozen and macerated to determinate the efficiency of delivery by fluorescence and gene expression efficiency by luminescence. The results have showed that the system has the ability to arrive with high specificity to the tumor site and that it is a good option as a gene delivery system.

I. INTRODUCCIÓN

Una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo es el cáncer. El cáncer es una patología causada por un crecimiento anormal y descontrolado de una o varias líneas celulares, el cual puede diseminarse a otros tejidos si no es controlado a tiempo. Existen más de 100 tipos de cáncer diferentes (Cancer Health Center, 2014) y dentro de los diferentes tipos algunos son más peligrosos que otros, debido a su localización, es por eso que las terapias dependen de múltiples factores, haciéndolas poco eficientes.

Hoy en día existen diversos tratamientos para cáncer, dentro de los cuales destacan la cirugía de remoción de tumores sólidos, la radioterapia, la quimioterapia, la inmunoterapia, la terapia dirigida, la terapia hormonal y la terapia por medio de trasplante de células madre. Cada una de ellas tienen sus propias limitaciones, en el caso de las quimioterapias uno de los contratiempos con los cuales se afrontan los pacientes es el alto grado de toxicidad que estas generan, eliminando no solo a células cancerígenas, si no también generando daños colaterales en células que no son blanco, provocando una descompensación y un malestar más a la lista, por lo que se dice que este tipo de tratamientos son terapias generalizadas y poco específicas.

La terapia dirigida, ofrece un número muy alto de beneficios en relación al número de efectos negativos, tomando en cuenta en primer plano el estudio del origen del cáncer para el reconocimiento de un blanco terapéutico que pueda frenar o revertir los daños causados por el cáncer, algo similar a lo que nos sugiere la medicina genómica, lo cual es “medicina especializada” o “medicina individualizada”, en donde se toman en cuenta los requerimientos principales de cada una de las posibles fuentes del cáncer dependiendo su tipo, para después ser estudiadas y buscar un blanco terapéutico óptimo para evitar o minimizar daño a células no blanco y garantizar el correcto funcionamiento de la terapia.

Una de las líneas de investigación más usadas recientemente para aplicación a la terapia dirigida es la nanotecnología, ya que, estudios han demostrado que la liberación

controlada de fármacos usando nanopartículas tiene el potencial para disminuir significativamente la severidad de los efectos secundarios, entre los que se encuentra la toxicidad a células que no son blanco terapéutico (Liu et al. 2015; Tang et al. 2011).

El uso de estas nanopartículas se encuentra actualmente en investigación por múltiples factores como envío y mejoramiento de la liberación del fármaco. Cuando al transporte de estas nanopartículas respecta se ha descubierto su capacidad de ser transportadas al sitio blanco con el uso de propiedades magnéticas mediante la adición de metales, como por ejemplo el hierro (Martel 2012).

Otra de las condiciones básicas para asegurar la efectividad de este tipo de terapias en el tratamiento contra cáncer es la evasión del sistema inmune, ya que muchas veces estas nanopartículas se pueden volver blanco inmunológico, y susceptibles a degradación antes de llegar a su sitio blanco.

Dentro de las estrategias más usadas para burlar al sistema inmune se encuentra el uso de nanopartículas recubiertas por membrana (CM-NPs), lo que les confiere cualidades más allá de la función natural de las membranas (Hau Zhou et al. 2016) y aumenta dramáticamente su capacidad para llegar al sitio blanco casi intactas, lo que, a su vez, genera una mayor efectividad en el tratamiento mediante este método. Otra estrategia es el uso de NP acoplejadas a células propias del organismo como acarreadores, la cual tiene muchas ventajas, como el hecho de ser biocompatibles (no ser blanco del sistema inmune) lo que aumenta su biodisponibilidad, y mejora notablemente la viabilidad de los complejos. El proceso anteriormente descrito es conocido como biofuncionalización de nanopartículas, comprende el uso de células para aumentar la compatibilidad de estas con el sistema.

El objetivo de esta investigación es desarrollar un microbot utilizando monocitos como acarreadores para aumentar la eficiencia en el envío dirigido de agentes terapéuticos a tumor.

II. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer y la importancia de su estudio.

El cáncer es un proceso multicausal y multigénico. Este se desarrolla debido a la acumulación de lesiones de un limitado número de genes que determina un desbalance homeostático y aquellos genes de proliferación y genes supresores de tumor. Muchas de estas lesiones pueden ser causadas por factores exógenos o endógenos (National Cancer Institute 2015).

El cáncer se puede originar en cualquier parte del cuerpo, comienza cuando las células crecen descontroladamente sobrepasando a las células normales, lo cual dificulta que el cuerpo funcione de la manera en la que debería (American Cancer Society 2017).

La carcinogénesis se presenta en distintas etapas, comienza con un daño a nivel de ADN que se le llama iniciación, posteriormente las células que contienen el daño, dan forma a una expansión clonal selectiva con el mismo daño que mantiene la célula iniciada, con alteraciones genéticas y los protooncogenes empezando a modificarse para dar lugar a oncogenes y en esta etapa se ve como los genes supresores de tumores no efectúan su trabajo de manera adecuada. La conversión maligna generará un cambio muy agresivo, con actividades de proliferación celular más desarrollada, con una capacidad de supervivencia más alta de lo normal, ya en esta etapa son muy resistentes a la quimioterapia y tienen una característica más agresiva que es la metástasis, en donde las células malignas encuentran la salida a otros tejidos para invadirlos y posteriormente generar un proceso cancerígeno generalizado.

El cáncer es una de las enfermedades que más vidas ha cobrado durante esta última década y esa es la razón principal de que hoy en día sea la patología más estudiada, no solo en México, si no en el mundo.

En comparación a nivel mundial, México parece tener bajas tasas de mortalidad por cáncer, considerando a toda la población (70 por 100 mil habitantes), siendo de las

tasas más bajas del continente americano. Sin embargo, las transiciones y estilos de vida llevarán al incremento de mortalidad por neoplasias en los próximos años, llegando a tasas superiores a las observadas en Europa (mayores de 200 por 100 mil habitantes) (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) 2017).

Actualmente se manejan diferentes alternativas para el tratamiento de cáncer, una de las primeras opciones que surgieron fueron las quimioterapias, que en realidad son agentes químicos que tratan de eliminar las células que se comportan de manera aberrante, interfiriendo en acciones metabólicas fundamentales para la supervivencia de la célula, sin embargo, en muchas ocasiones, el agente no es correctamente evaluado y puede no funcionar contra un tipo de cáncer, o no se aplica la terapia correctamente, ya que la citotoxicidad de estos agentes es muy alta y no solo dañan a las células blanco si no a tejidos en los que estos agentes llegan de manera inespecífica e interfieren con el ciclo celular normal, guiándolos a apoptosis, generando un problema severo para el paciente. Esa es una de l

as razones por la cual es urgente desarrollar mejores tratamientos, que no solo sean más eficaces contra el cáncer si no que de igual manera sean menos dañinos contra tejidos no blanco.

2.1.1 Microambiente tumoral.

Tratar de entender al cáncer como una neoplasia multicausal y multigénica no sirve de nada si no se entiende el microambiente tumoral.

Es un ecosistema dentro del tumor, el cual se mantiene gracias a la presencia de diferentes estirpes celulares y estas a su vez interactúan en pro o en contra del tumor, pero dándole características físicas pro-supervivencia de cualquier manera (figura 1).

El microambiente tumoral está compuesto de células endoteliales, fibroblastos, células perivasculares y células inflamatorias que regulan componentes críticos del proceso tumorigénico: angiogénesis, desmoplasia e inflamación respectivamente. Una matriz extracelular especializada, una membrana compuesta, separa a las células

endoteliales de las epiteliales del soporte del estroma. Está compuesto de colágeno IV, entactina, laminina y proteoglicanos de heparán-sulfato, que le confieren especificidad de tejido, polaridad epitelial y funcionalidad (Finger E. 2010).

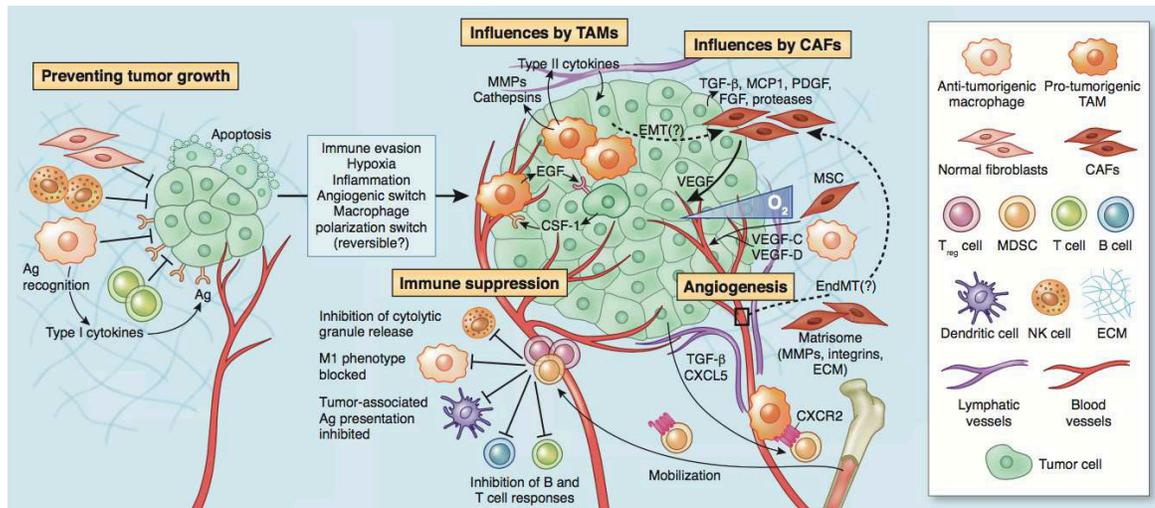


Figura 1. Interacciones celulares en el microambiente tumoral (Tomado de Quail Daniela 2010).

Dentro del microambiente se encuentran tres regiones muy importantes, la región más adentrada que es la de necrosis, caracterizada por mantener restos celulares que le sirven de alimento a la capa del medio, llamada zona de hipoxia, en donde la presión de oxígeno es baja o casi nula, y es en esta zona donde se lleva a cabo la mayor parte de procesos que mantienen la integridad del tumor, dándole alimento y resistencia a fármacos quimioterapéuticos. La región externa, es la región de normoxia, donde se encuentran principalmente células del sistema inmunológico y tumorales en una batalla continua, generando una inflamación constante.

2.1.1.2 Hipoxia.

La región de hipoxia es ampliamente estudiada últimamente, ya que se encuentra asociada a un mal pronóstico cuando se encuentra desarrollada. Esta condición es conocida por inducir a genes que se encuentran relacionados con la regulación de la proliferación celular, producción de la matriz extracelular, adhesión celular, y algunos otros puntos clave de la tumorigénesis. El mecanismo detrás de este efecto es llevado a

cabo por la inducción de la familia del factor inducible por hipoxia (HIF-1), que son factores de transcripción. En condiciones normales de hipoxia aguda-crónica, HIF-1 α es estabilizado en una manera oxígeno dependiente por la hidroxilación y degradación subsecuente de HIF-1 α por PHDs que requieren oxígeno y 2-oxiglutarato como sustratos, así como hierro y ácido ascórbico como cofactores. Una vez estabilizado, HIF-1 α puede formar un heterodímero con HIF-1 β , permitiendo a este factor de transcripción unirse al núcleo de la secuencia 5'-RCGTG-3' e incrementar la transcripción de genes blanco (Finger E. 2010).

El estado de hipoxia está relacionado a la resistencia a terapias, tanto químicas como físicas, ya que cuando se forma el heterodímero HIF-1 β / HIF-1 α se transcriben genes de proliferación celular y de mantenimiento, tal es el caso del factor vascular endotelial (VEGF) que es el principal encargado del proceso de angiogénesis. Este proceso le permite a la célula crecer vasos sanguíneos para obtener nutrientes para las células tumorales en desarrollo, es por eso que muchas terapias hoy en día buscan usar a HIF-1 α como blanco, sin embargo, realmente pocas lo han logrado sin generar efectos secundarios considerables.

2.1.3 Terapias dirigidas.

Una de las grandes problemáticas de las quimioterapias de primera línea, es la gran inespecificidad que mantienen, tanto de absorción como de llegada. Cuando una quimioterapia es administrada vía intravenosa, esta circula a través del torrente sanguíneo, siguiendo el camino de la circulación portal, y muchos de los órganos encontrados dentro del cuerpo pueden absorber la quimioterapia y a largo plazo, verse intoxicados por esta, por lo tanto, algunas veces el paciente empeora en lugar de ocurrir lo contrario, y si el fármaco logra llegar al tejido en el cual se encuentra la neoplasia, este no discrimina entre células sanas y células aberrantes, por lo que muchas veces compromete tejidos aledaños al tumor.

Una terapia dirigida comprende un tratamiento en el que se usan medicamentos u otras sustancias para identificar y combatir tipos específicos de células cancerosas y que causa menos daño a las células normales. Algunas terapias dirigidas impiden la acción de ciertas enzimas, proteínas u otras moléculas que participan en el crecimiento y diseminación de las células cancerosas (National Cancer Institute 2016).

La medicina genómica o especializada ha empezado a tomar auge en estas últimas décadas, ya que, su objetivo principal es el de generar tratamiento individualizado reduciendo ampliamente los efectos secundarios y muy probablemente mejorando la eficacia del fármaco para la pronta recuperación del paciente.

Las herramientas moleculares han permitido describir de manera puntual, muchas de las vías por las cuales se puede generar cáncer en distintos tejidos, algunas de ellas convergen y muchas de ellas no, sin embargo, gracias a estas vías, podemos encontrar proteínas que pueden ser blanco terapéutico, frenando vías de proliferación o vías metabólicas fundamentales para la célula, pero de manera específica en las aberrantes, sin necesidad de comprometer las demás.

Si bien se pueden bloquear vías mediante la eliminación de proteínas o el bloqueo de ellas, también se puede inhibir su síntesis, y esto muchas veces puede ser mediante el uso de terapias génicas, llamadas así, por su interacción con el gen blanco y silenciándolo para que no pueda ser transcrito o en algunos casos, dependiendo de la sonda, traducido.

2.1.4 Terapia génica.

La terapia génica es una técnica experimental para tratar enfermedades mediante la alteración del material genético del paciente. Con mucha frecuencia, la terapia génica consiste en la introducción de una copia sana de un gen defectuoso en las células del paciente (National Human Genome Research Institute 2018).

Con la translación clínica en mente, se está invirtiendo mucho en los aspectos más aplicables de la terapia génica, como optimizar protocolos requeridos para la manufactura de las reservas de vectores bien manufacturados que se requieren para tratar humanos (Clement N et al. 2016) y asegurar que los nuevos vectores sean útiles para métodos de manufactura comercial a gran escala. Incrementando la confianza en la terapia génica para la medicina clínica ha creado una competición intensa en el espacio de biofarmacéuticos, sobre todo en las enfermedades más lucrativas; el tratamiento para desordenes de coagulación como la hemofilia A y hemofilia B usando vectores del tipo AAV es un ejemplo, en donde cuando menos 10 compañías por separado han iniciado o anunciado pruebas clínicas (Baruteau J et al. 2017).

Los sistemas de envío de genes pueden ser clasificados en dos grandes categorías: no viral y sistemas virales recombinantes (figura 2). En comparativa, los puntos fuertes de los no virales, incluyen la caracterización química, simplicidad y reproducción de producción. Capacidad de empaque mayor y sin problemáticas de bioseguridad. El envío de genes, de cualquier manera, es relativamente ineficiente comparada con sistemas virales recombinantes y los efectos son comúnmente transitorios. Aun así, mejoras en la estabilidad y potencia de ácidos nucleicos, así como la tecnología de envío de polímeros lipídicos están avanzando en el campo de agentes envío con agentes no virales (Ginn Samantha et al. 2018).

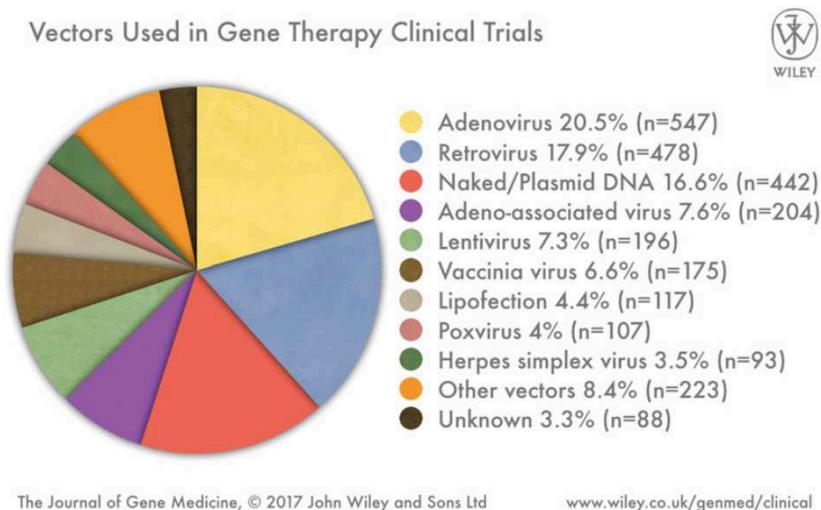


Figura 2. Vectores usados en pruebas clínicas (Tomado de Wiley 2018).

2.2 Nanomedicina.

Nanotecnología, es el estudio y desarrollo de sistemas en escala nanométrica, “nano” es un prefijo del Sistema Internacional de Unidades que viene del griego νόμος que significa enano, y corresponde a un factor 10^{-9} , que aplicado a las unidades de longitud, corresponde a una mil millonésima parte de un metro (10^{-9} Metros) es decir un Nanómetro, la nanotecnología estudia la materia desde un nivel de resolución nanométrico, entre 1 y 100 Nanómetros aproximadamente (Nanotecnología de Chile 2015).

Nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología al diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades y, en consecuencia, al entendimiento de los procesos pato- fisiológicos que intervienen en el origen y curso de una enfermedad determinada.

Esta definición abarca las 3 áreas principales que la nano- tecnología debe satisfacer para fines médicos:

- Liberación de fármacos e ingeniería de tejidos. Esta área se enfoca en el desarrollo de biomateriales nanoestructurados para construir sistemas que transporten y entreguen fármacos de manera controlada. O bien, en combinación con la biología celular, se puedan usar en el campo de la medicina regenerativa para reparar o reemplazar tejidos u órganos dañados.
- Diagnóstico. Esta rama de la nanomedicina se enfoca en el diseño de nanodispositivos con la finalidad de identificar una enfermedad a nivel celular o molecular por medio de nanosistemas de imagen o nanobiosensores, los cuales contienen un componente biológico capaz de detectar en tiempo real y con una alta sensibilidad un analito determinado
- Terapia y diagnóstico (teranósticos). Aquí se busca diseñar y aplicar nanomateriales que identifiquen una patología y liberen moléculas

terapéuticas simultáneamente y de manera controlada (Rojas-Aguirre Y 2016).

Los materiales y las tecnologías que se han utilizado para la construcción de nanosistemas de liberación de fármacos son muy diversos (figura 3), pero se pueden clasificar de manera muy general en 2 grandes grupos:

- Nanoestructuras orgánicas. En este grupo se encuentran los materiales poliméricos con los que se construyen nanoesferas, nanocápsulas, micelas, liposomas, dendrímeros y conjugados polímero-fármaco.
- Nanoestructuras inorgánicas. Bajo esta clasificación están las nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de sílica mesoporosa y nanotubos de carbono (Rojas-Aguirre Y 2016).

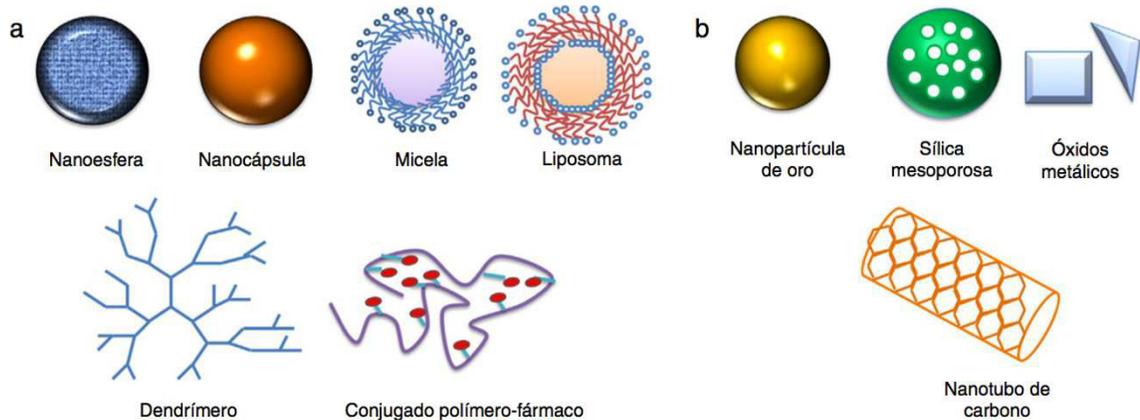


Figura 3. Tipos de Nanoestructuras. a) Nanoestructuras orgánicas. b) Nanoestructuras inorgánicas (Tomado de Aguirre-Rojas Y et al. 2016).

Estos nanosistemas pueden, eventualmente, convertirse en una herramienta muy poderosa para el envío de fármacos anticancerígenos. Usualmente tienen una constitución de tres capas; un núcleo con material constituyente, un agente terapéutico con un agente que permita su visualización y modificaciones biológicas en la superficie

que permita el mejoramiento de la bio-distribución y la fijación de la zona blanco de la nanopartícula. (Benyettou F, et al. 2009).

Llegar a tumores sólidos por la mayoría de los agentes nanoterapéuticos es logrado de manera pasiva por el efecto de permeabilidad y retención (EPR). Por su tamaño y las propiedades de su superficie, los agentes nanoterapéuticos pueden viajar a través de los vasos sanguíneos fenestrados en tumores, con una retención incrementada debido a la ausencia de drenaje linfático. Esto le da un aumento a la acumulación de la droga con nanovectores en el tejido tumoral en comparación con el que se logra con una droga administrada de forma libre. La formulación de los nanovectores para compuestos anti-cáncer tiene muchas ventajas sobre las drogas administradas de manera libre: proteger las drogas de la degradación en el cuerpo antes de que lleguen a su sitio blanco, aumentar el consumo de la droga por el tumor, permitir un mejor control en el tiempo de distribución de drogas en el tejido tumoral, y prevenir que las drogas interactúen con células normales para disminuir así toxicidad (Chung-Tzu Hsueh et al. 2016).

2.2.1 Nanopartículas magnéticas.

Agentes citotóxicos convencionales no demuestran especificidad predominante por blancos que únicamente sean expresados en tumor comparado con células normales, pero dependen ampliamente de una biodistribución favorable para lograr su meta terapéutica. Una manera de aumentar la distribución es usar nanopartículas que respondan a magnetismo cargadas con estas drogas citotóxicas y dirigidas por gradientes de campo magnético al microambiente intersticial del tumor (Klostergaard 2012).

A estas nanopartículas se les han dado características electromagnéticas mediante la síntesis de ellas en manera conjunta con iones de hierro, cobalto, cobre, etc, lo cual les brinda sensibilidad a campos electromagnéticos.

A estas nanopartículas se les ha intentado transportar mediante distintos métodos, principalmente al poseer una carga y ser sensibles a campos electromagnéticos, se les guía mediante el uso de un imán, pegándolo a la capa externa del objeto de estudio (si es

in vivo) y desplazándolo a la zona de interés, posteriormente se toma una muestra de la zona de interés y entonces se revisa la cantidad de estas nanopartículas magnéticas para poder relacionar cuantas llegaron de manera apropiada a la zona deseada. Esta técnica implica muchas ventajas, dentro de las que están la practicidad y la relación costo-beneficio. Más aun, las nanopartículas recubiertas de quitosan pueden cruzar muy fácilmente las membranas, de igual manera en las uniones célula-célula, mediante la apertura de estas mismas por la mediación del quitosan en las células epiteliales (Saji Uthaman et al. 2014).

El concepto de vectores magnéticos para terapia ha evolucionado del uso de campos magnéticos generalizados (no focalizados) que en gradiente pueden acercar a las nanopartículas sensibles a campo magnético a los alrededores tumorales, dependiendo de la difusión de estos mecanismos para su efectividad, al logro de hoy en día que es la el envío magnético localizado y extravasación tumoral. Los vectores magnéticos tienen muchos factores que ayudan a su eficacia:

- La capacidad de los campos electromagnéticos para focalizarse en un objetivo para enviar de manera dirigida a distancia, lo cual es una función de la fuerza del campo y de la configuración del magneto.
- La susceptibilidad magnética de la NPM, y su capacidad de ser manipulada y concentrada de un flujo en el torrente sanguíneo que lleve a extravasación.
- La superficie de la NPM que permita una carga suficiente de agentes terapéuticos que puedan ser depositados al sitio tumoral en una dosis alta.
- La reducción/eliminación de los efectos citotóxicos de las NPM y sus construcciones para terapias antes de llegar al tejido blanco, minimizando así el daño a tejidos normales o no blanco (Klostergaard Jim 2012).

Dentro de los agentes que responden a campos magnéticos con los cuales se sintetizan de manera cotidiana estas NPM (figura 4), existe un grupo particular que mantiene ventajas sobre los otros, aquellas sintetizadas con hierro.

	Ferromagnetic Material		
	Ni	Co	Fe
The capacity of shaped magnetic field gradients to focus on a target site for localized delivery at a distance which is a function of field strength and magnet configuration.	○	●	●
The magnetic susceptibility of the MNP component, and its capacity to be manipulated/concentrated from flow in the bloodstream, leading to extravasation.	●	●	●
The surface chemistry of the MNP that allows sufficient loading of therapeutics that can be deposited at the tumor site with high dose anti-tumor effectiveness.	●	●	●
The reduction/elimination of cytotoxicity effects of MNP-therapeutic prodrug constructs until within the target environment, minimizing harm to normal tissue.	●	●	●
<p>● Considered to be highly favorable conditions</p> <p>● Considered to be moderately favorable conditions</p> <p>● Considered to be poorly favorable conditions</p> <p>○ Not considered developed in this context</p>			

Figura 4. Materiales para síntesis de NPM que se han probado eficaces en tratamientos (Tomado de Klostergaard Jim 2012).

2.2.2 Nanopartículas recubiertas de quitosán.

El quitosán es la forma N-deacetilada de la quitina que es frecuentemente derivada de caparzones de crustáceos. Es un polisacárido catiónico lineal que contiene un β -(1,4)- unido a un D-Glicosamina y N-acetil-D-glucosamina (Liu et al. 2010; Yi et al. 2105). Se sabe que las nanopartículas recubiertas de quitosán aumentan la liberación de fármacos en sitios locales para tratar desordenes gastrointestinales (Metz et al. 2005) y para tratamiento dirigido contra cáncer. (Elzatahry et al. 2009; Ramadas et al. 2000; Apoorv et al. 2012).

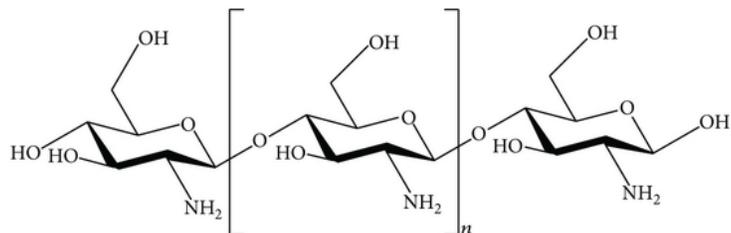


Figura 5. Estructura del quitosan (Tomado de Xiaosong Li 2013).

El quitosan (figura 5) puede ser fácilmente procesado en diferentes formas, como laminas, tabletas, membranas y macropartículas o nanopartículas, permitiendo diseñar una gran variedad de artefactos médicos y farmacológicos que se adaptan a cada propósito (Xiaosong Li 2013).

El recubrir las nanopartículas con quitosan nos ayuda a tener una mayor biocompatibilidad de éstas, ya que el cuerpo humano por sí solo no puede degradar la quitina, al no poseer las enzimas necesarias para la degradación.

La presencia de estos grupos amino e hidroxilo los hacen útiles para la encapsulación de óxidos metálicos, que resultan en partículas hidrofílicas, biocompatibles y estables. Las propiedades catiónicas del quitosan son principalmente por la presencia de los grupos amino que se encuentran cargados positivamente, estos permiten la interacción con ácidos nucleicos que están cargados de manera negativa, no hay que olvidar que el quitosan les brinda a las nanopartículas una carga positiva y genera interacciones con sus grupos funcionales amino secundario, (NH₂) y oxidrilo.

Tokura et al. probaron que los macrófagos eran activados a varios niveles por derivados de la quitina, y el 30% DA-quitina y quitina sulfato estimulan la producción de anticuerpos circulatorios (Tokura S, et al. 1999). La acumulación de carboximetil quitina tiene lugar en granulocitos y macrófagos. Ellos encontraron de igual manera que una inyección intraperitoneal de N-Acetilquitohexaosa inhibía el crecimiento de células tumorales y de patógenos.

La quitina tiene respuestas inmunológicas innatas y adaptativas complejas dependientes de tamaño, que incluyen la habilidad de reclutar y activar células de la inmunidad innata y producir así quimiocinas y citocinas (Lee C et al, 2008). Los receptores incluidos en este sistema son los receptores de manosa de los macrófagos, receptores tipo toll 2 (TLR-2), receptores de lectina tipo C y dectina-1, y el receptor leucotrieno B4 (BLT1) (Lee C et al. 2009).

La pobre solubilidad del quitosán posee limitaciones para sus aplicaciones biomédicas. Especialmente en áreas de inmunología, una solución acuosa es esencial para el uso como inmunoestimulante en aplicaciones clínicas. Añadiéndole moléculas de galactosa a las moléculas de quitosán, un nuevo compuesto soluble se formó, el quitosán glicado (Song S et al. 2009).

El quitosán modificado puede ser usado para una amplia gama de aplicaciones biomédicas, incluyendo las interacciones y envío intracelular de materiales genéticos (Saranya N et al. 2011). Sus propiedades únicas lo ayudan a formar complejos con siARN (Park S et al. 2013). Nanopartículas basadas en quitosán son consideradas acarreadoras para varias aplicaciones de envío de genes, esto las señala como una perspectiva prometedora para la terapia génica.

2.3 Sistemas de entrega mediados por células.

Debido a que una vez que estas nanopartículas son introducidas al ambiente fisiológico, interactúan con superficies hidrofóbicas, resultando en una probable agregación, opsonización y una eliminación inmediata por el sistema mononuclear fagocítico. (H. Lee 2006), se han desarrollado los sistemas de entrega mediados por células, donde se emplean células específicas como vehículos para poder entregar fármacos a sitios blanco. Agentes terapéuticos o agentes reveladores son cargados en estas células y son liberados en sitios con enfermedad presente.

Los sistemas de envío de drogas mediados por células han emergido como una estrategia prometedora que se ha vuelto favorita entre todas las demás (figura 6). Esta nueva estrategia toma como ventaja las propiedades celulares, como circulación por tiempo prolongado, ligandos superficiales abundantes, morfología flexible, señalización celular y metabolismo para ofrecer una oportunidad única de maximizar los resultados terapéuticos y minimizar los efectos secundarios. El aumento de la atención a este campo puede ser por el notable el incremento de publicaciones según Web of Science.

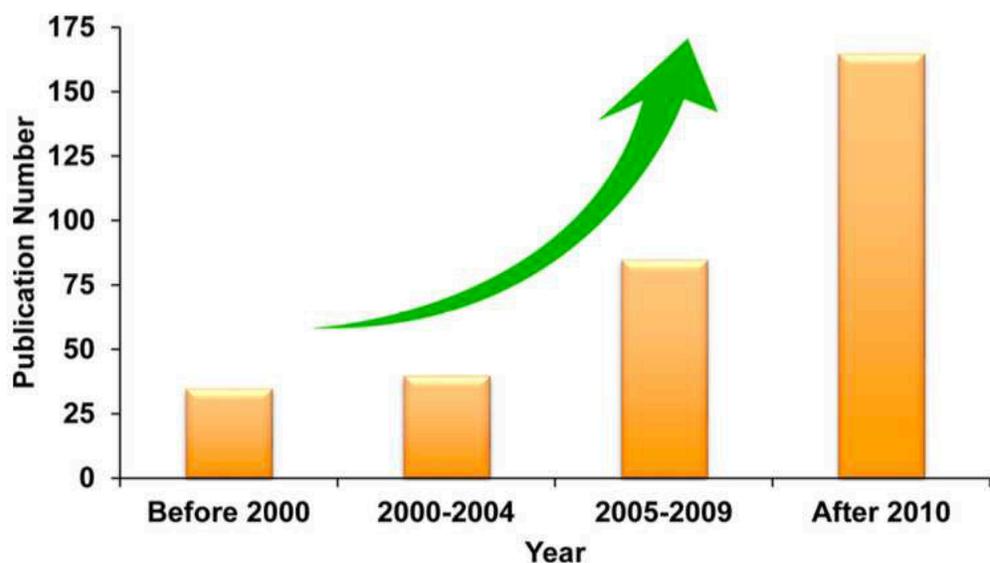


Figura 6. Número de publicaciones buscadas con las palabras clave “cell mediated” y “Drug Delivery” (Tomado de ACS, 2015).

Las células circulatorias pueden servir como acarreadoras de drogas por muchas razones. Son altamente móviles y son capaces de viajar por el torrente sanguíneo sin generar inmunogenicidad. Las células circulatorias se ven envueltas en una serie de patologías, incluidas infecciones, inflamación y desarrollo de cáncer, es así que pueden ofrecer ventajas grandes para llegar a sitios blanco. Por ejemplo, los leucocitos tienen la capacidad innata de atravesar la barrera hematoencefálica para acceder a células tumorales en el cerebro. Las respuestas inflamatorias y de regeneración de tejido muchas veces requieren de la acción de “homing” que de manera espontánea atraen a las células a los sitios en donde se desarrolla la patología. Usar células circulatorias como sistemas de envío es muy ventajoso ya que se reduce en gran cantidad la eliminación de la terapia

por el sistema inmunológico y prolonga el tiempo medio biológico del sistema de envío de droga (Yixue Su et al. 2015).

Estas células específicas normalmente incluyen glóbulos rojos, leucocitos, células madre y algunas otras. Estas células actúan como caballo de Troya para transferir los fármacos de sangre circulante al tejido comprometido (Liang Pang et al. 2017).

El termino caballo de Troya es muy apropiado para describir el funcionamiento, ya que estas células de alguna manera generan una especie de camuflaje que imposibilita el reconocimiento de fármacos o de nanopartículas como agentes extraños, al estar acoplados a células propias.

Los sistemas de envío basados en células circulatorias se mantienen mejorando los efectos terapéuticos de las drogas, pero con ventajas específicas y con ciertas limitaciones (figura 7). Aunque las técnicas usadas hoy en día, permiten una correcta extracción/obtención y expansión de células in vitro, seguidos de una reinyección en circulación, los acarreadores celulares son susceptibles a contaminación que pueden producir efecto secundario y pueden influenciar en la integridad de las funciones celulares. La baja capacidad de carga de droga en la célula, una liberación prematura, limitaciones de liberación controlada o activada, protección con drogas contra degradación intracelular, riesgo de contaminación sanguínea y migración eficiente de acarreadores celulares a los sitios blanco son retos a mejorar. Sobre todo, el costo del desarrollo de estas terapias en cantidades suficientes es un problema importante.

La translación de resultados de experimentos preclínicos de laboratorios a humanos para confirmar si el sistema de envío basado en células va a tener impactos reales en la medicina segura translacional, tiene que ser evaluado. También, para poder seguir el trayecto de estos sistemas de envío es necesario generar métodos de visualización de tráfico celular (Vivek Agrahari et al. 2016).

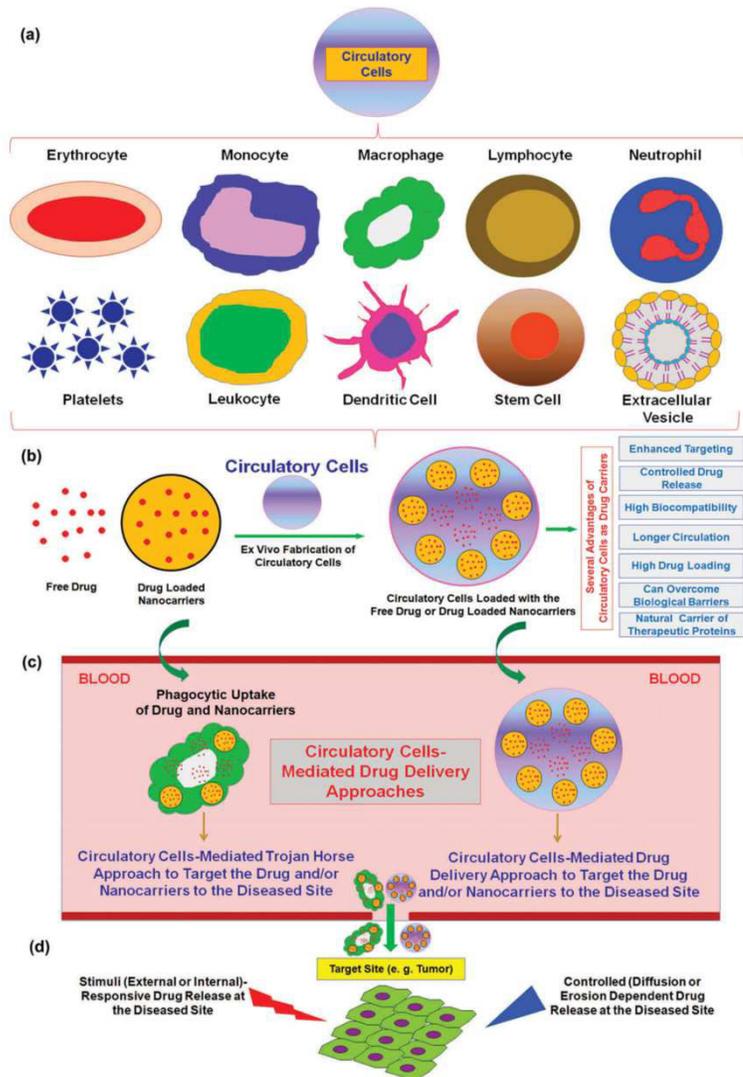


Figura 7. Células circulatorias usadas como acarreadoras de drogas (Tomado de Vivek Agrahari et al. 2016).

Para obtener envío de drogas mediado por células con nanopartículas cargadas de drogas o drogas tiene que ser posible anclarlas o internalizarlas a las células para formar complejos de droga-célula o droga-célula-partícula.

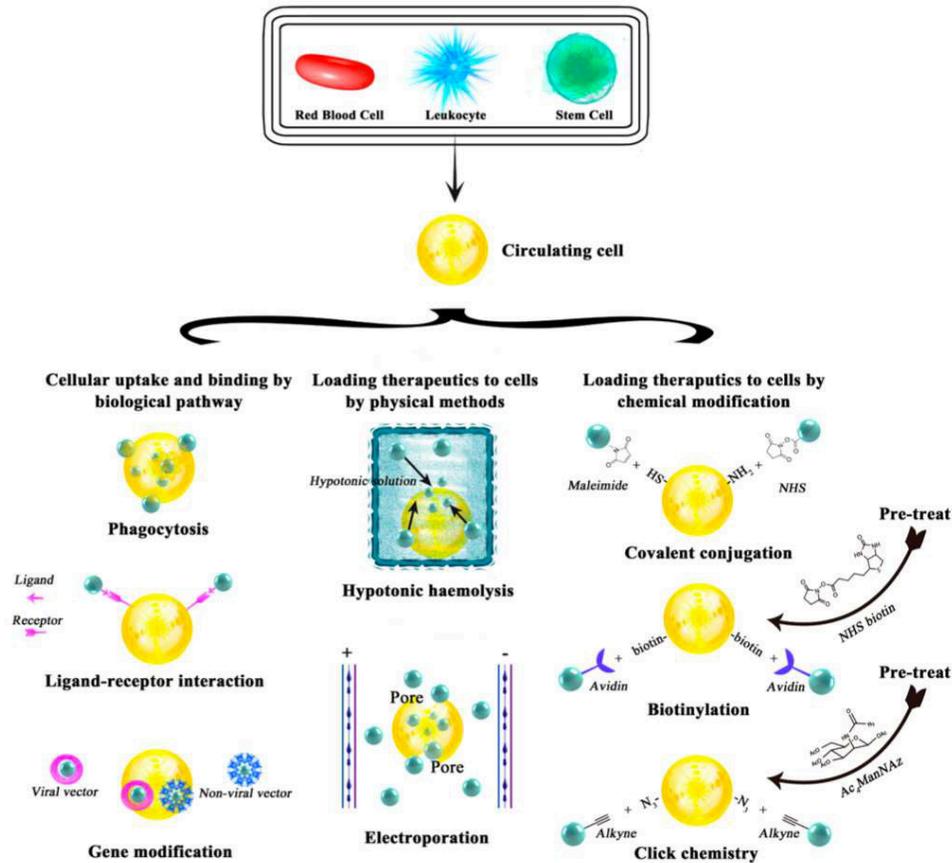


Figura 8. Métodos de anclaje o de internalización de drogas a células acarreadoras (Tomado de Yixue Su et al. 2015).

Los requerimientos básicos para drogas o nanopartículas cargadas con drogas en los sistemas de envío mediados por células implican tener baja o nula citotoxicidad para los acarreadores, alta fuerza de unión entre la carga y el acarreador, alto tiempo en circulación y baja inmunogenicidad (figura 8). El uso de células como acarreadores no debe solo transportar drogas en alta especificidad al tejido blanco sino, regular la farmacocinética y farmacodinamia, alterando las propiedades de los biomateriales que son usados para encapsular el agente terapéutico (Yixue Su et al. 2015).

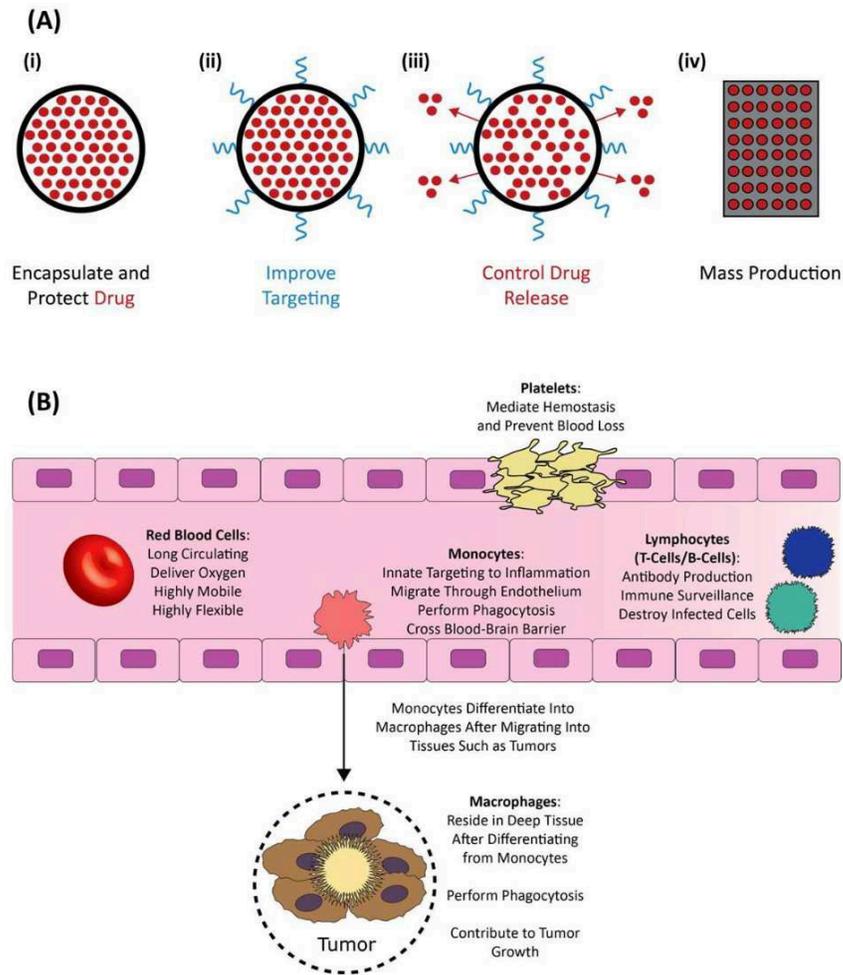


Figura 9. Ventajas y desventajas de algunas células circulatorias con potencial uso como acarreadoras (Tomado de Anselmo A., Mitragotri S. 2014).

2.3.1 Eritrocitos.

Los eritrocitos (glóbulos rojos) están bien caracterizadas como uno de los transportadores más viejos en el campo del envío de fármacos. Ellos están dotados con una biocompatibilidad natural, no contienen inmunogenicidad, poca biodegradación y en estudios *in vivo* muestran una gran estabilidad lo que los hace sistemas de envío muy prometedores. De todas las células humanas, los glóbulos rojos son las únicas células no nucleadas en donde componentes de la membrana plasmática son responsables de toda

su variedad antigénica, de su transporte y de sus propiedades mecánicas (Manisha Bhateria 2014).

Estos acarreadores naturales pueden ser empleados para el envío de drogas, por ejemplo, cargándoles drogas a glóbulos rojos de donadores o autólogo, antes de la transfusión a un paciente (figura 10). Por más de cuarenta años, los glóbulos rojos han sido explorados para envío de muchos fármacos en modelos que van desde *in vitro* hasta pequeños animales o primates, así como en estudios clínicos en pacientes (Villa C. H. et al. 2016).

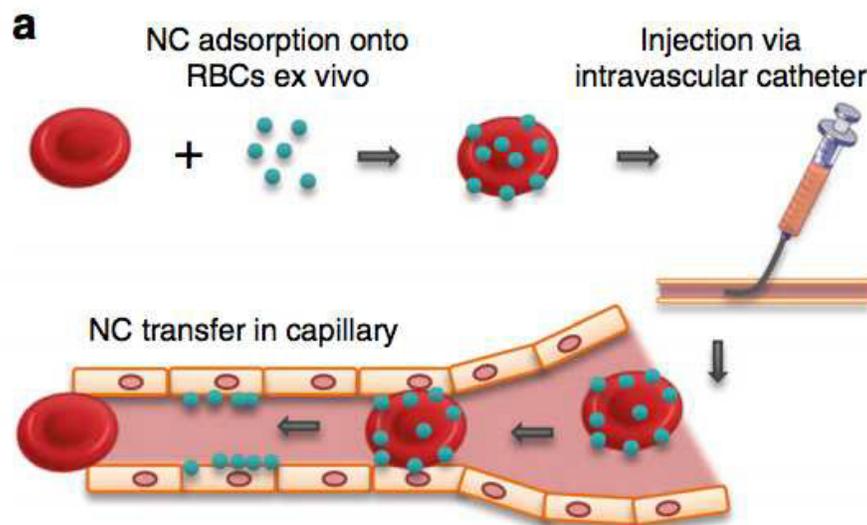


Figura 10. Mecanismo de modificación de glóbulos rojos para su uso como acarreadores (Tomado y modificado de Brenner J et al. 2018).

Las ventajas de utilizar eritrocitos como transporte son muy grandes, como, por ejemplo, son las células más abundantes en la sangre y en una muy pequeña cantidad de sangre se puede obtener una buena cantidad de ellos, sin embargo, una de las desventajas más grandes es que ya una vez cargadas con nanopartículas estas corren el riesgo de que por fricción se hemolisen, sin embargo, la biodisponibilidad es buena en el análisis ya del tejido.

2.3.2 Células madre.

Las “stem cells” o células madre también pueden ser utilizadas como transporte. Se ha demostrado que, como los leucocitos, las células madre muestran un tropismo intrínseco a los sitios de lesión, inflamación o a sitios tumorales.

Las células madre son autorrenovables con un potencial muy alto para diferenciar a varios tipos de células y son esenciales en reparación y regeneración de tejido. Están clasificadas en dos grandes categorías según su fuente y su plasticidad: las células madre embrionarias y células madre adultas.

Las células madres embrionarias se originan de la masa celular interna del blastocisto en una etapa temprana del embrión, que son pluripotenciales que pueden generar células de cualquier tipo en el cuerpo.

Las células madre adultas son tejidos específicas que se pueden diferenciar en un número limitado de células especializadas.

Las terapias con células madre han sido ampliamente estudiadas en el área de medicina regenerativa y han sido trasladadas a pruebas clínicas (Kim S et al. 2009).

Se han probado a las células adultas inducibles a multilineaje aisladas de médula ósea (MAMI), que son una subpoblación de células madre mesenquimales, seleccionadas como transportadores celulares para la entrega de nanopartículas a tumores en cerebro. Las células MAMI cargadas con nanopartículas fueron capaces de diferenciar específicamente entre células tumorales y células normales del parénquima cerebral seguidos de una inyección contralateral a un ratón con un glioma U87MG (Roger M 2011).

Una de las desventajas más grandes de usar las células madres, es en realidad la

recolección de las mismas, y lo costoso que es el hacer el tratamiento con células no propias, ya que la identificación para una caracterización de HLA para células madres es muy compleja y costosa, y a eso sumarle que encontrar HLAs compatibles es muy complicado, ya que las probabilidades son muy pocas.

2.3.3 Células del sistema inmunológico.

Otra de las opciones para usar como célula transportadora son los leucocitos. Por un lado, los leucocitos pueden actuar como bodega permitiendo la liberación mantenida y prolongada del fármaco; Por otro lado, los leucocitos tienen la habilidad inherente de migrar a tejido inflamado. El proceso de inflamación está caracterizado por leucocitos movilizándose de la médula ósea o de tejidos vecinos a sangre, para después, migrar específicamente al sitio dañado. Cuando ocurre la inflamación, el microambiente generado induce la expresión de moléculas de adhesión celular (CAM) en la superficie de la monocapa endotelial, que media las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales, facilitando el proceso inicial de rodamiento, unión al endotelio y la extravasación. (Penberthy TW et al. 1997)

2.3.3.1 Linfocitos T.

Existen diferentes tipos de linfocitos, pero los más importantes sin duda en los sistemas de transporte mediados por células son los linfocitos T infiltrantes a tumor, los cuales poseen no solo capacidad quimiotáctica directa a tumor, si no que también poseen una actividad citotóxica antitumoral. Cuando este tipo de linfocitos se encuentra presente en el microambiente tumoral en altas cantidades, el tumor se reduce en tamaño y en algunos casos es llevado a remisión junto con tratamiento quimioterapéutico a dosis metronómicas (Schiavoni G et al. 2018).

En el contexto de terapia celular, los datos de Stephan T. y colaboradores describen que el conjugar partículas cargadas del fármaco con las células T del donador, incrementa el impacto terapéutico de manera significativa. Esta estrategia no necesita pre

acondicionamiento, complementos tradicionales de ingeniería genética o de bioquímica para aumentar o reprogramar la función celular (Stephan T et al. 2010).

Si bien el uso de linfocitos T infiltrantes de tumor se ha demostrado útil para estos sistemas acarreadores, también es cierto que atrae ciertas problemáticas como de manutención, producción a gran escala y también de replicación, ya que se necesitan condiciones altamente específicas para el correcto funcionamiento de estas células. Por lo anterior el uso de estas células ha decaído un poco, dando lugar a terapias más sofisticadas como la reprogramación del receptor de célula T (TCR) creando uno quimérico para la lucha contra distintos agentes neoplásicos o patógenos, se le da el nombre de terapia con células CAR T.

2.3.3.2 Uso de monocitos y macrófagos como células acarreadoras.

Los monocitos, pertenecen al grupo de las células fagocíticas, ubicándose como célula presentadora de antígenos en sangre y una vez saliendo de torrente sanguíneo y llegando a tejido se le llama macrófago.

Los monocitos en sangre actúan como células presentadoras de antígenos hasta que por medio de señales llegan a zonas de lesión y entonces se diferencian en macrófagos de tejido. El proceso por el cual se lleva a cabo lo anterior se llama quimiotáxis.

Este proceso quimiotáctico es llevado a cabo mediante un gradiente de quimiocinas, que básicamente son proteínas que se acoplan a receptores integrados a las células quimiotácticas, generando una especie de rodamiento en los vasos sanguíneos. Una vez que se llega al lugar de mayor inflamación (alta concentración de citocinas pro-inflamatorias), los monocitos llevan a cabo un proceso llamado diapédesis, el cual consiste en extravasarse para llegar a la zona de inflamación, y una vez ahí realizar su función principal.

Muchas células circulatorias como los monocitos y los macrófagos presentan cualidades específicas que los pueden llevar a tejidos blanco en algunas patologías, incluidos el cáncer, heridas y problemas isquémicos. Por ejemplo, llegada a tumor, uno de los mecanismos más estudiados de llegada específica en células vivas, sugiere que no solo algunas células pueden ubicar al tumor sólido, sino que también se puede seguir a células tumorales en el torrente sanguíneo y alcanzar sitios metastásicos primarios (figura 11)(Yixue Su et al. 2015). Es por eso que son considerados candidatos idóneos para el envío de drogas mediado por células.

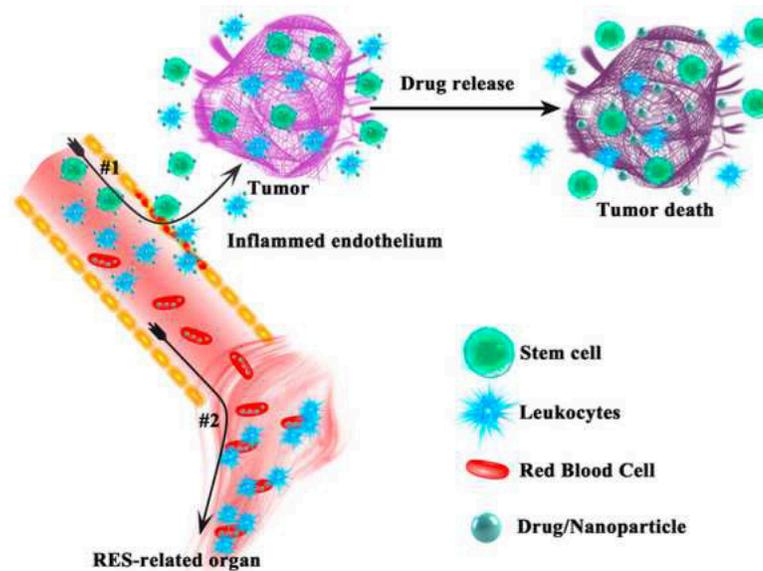


Figura 11. Vías de tránsito de células asociadas a sistemas de envío (Tomado de Yixue Su et al. 2015).

Es importante entender que cuando se quiere hablar de un sistema de envío mediado por células, se busca que estas no generen cambios en el tejido blanco que perjudiquen en mayor medida al beneficio terapéutico del agente que acarrean, es por eso que en un principio, es muy importante estudiar y entender al microambiente tumoral, ya que, existen células poco diferenciadas, como las células madres y los monocitos que si bien, tienen una acción de llegada a tumor bastante buena y considerable, podrían generar efecto secundarios al convertirse en células pro tumorales, todo bajo la influencia del microambiente tumoral.

El monocito, como se describió anteriormente, una vez llegado al tejido se convierte en macrófago.

Los macrófagos son altamente versátiles, multifuncionales, que su función depende principalmente de su función anatómica, así como de su contexto fisiológico o fisiopatológico en el que se estudien. Los monocitos son reclutados de la circulación a tejidos normales sanos o a sitios de lesión, inflamación, infección, o neoplásicos y estos se pueden diferenciar en esos lugares a macrófagos de tejido. Ellos pueden adquirir distintos fenotipos y estados de activación en respuesta a factores presentes en el tejido local del microambiente tumoral.

Los macrófagos del tipo M1 son activados por la vía clásica (activados por productos microbianos o interferón). Este fenotipo expresa altas cantidades de citocinas pro inflamatorias y mayor cantidad de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y son capaces de eliminar patógenos y células tumorales. Cuando los macrófagos se estimulan con citocinas del tipo TH2, como la interleucina 4 (IL-4), IL-10 e IL-13, llevan a los macrófagos a un estado de activación alternativo o M2. En este estado ellos pueden moderar la respuesta inflamatoria, promoviendo angiogénesis y remodelación de tejido.

Recientemente la plasticidad de los fenotipos de macrófago ha sido investigada, y se han descubierto subdivisiones del fenotipo M2 de macrófagos, M2a, M2b y M2c de acuerdo al estímulo que estos reciben para activarse. M2a son inducidos por su exposición a IL-4 e IL-13, así como M2b es inducido por una exposición combinada de complejos inmunológicos a los receptores tipo Toll, así como agonistas de la IL-1. Estos últimos mantienen un efecto inmunoregulator fuerte, y lleva a respuestas del tipo II, y los macrófagos M2c, inducidos principalmente por IL-10 están relacionados fuertemente al freno inmunológico y remodelación de tejido (Haegeman T et al. 2009).

Tomando en cuenta que el monocito puede tener tantos cambios, probablemente

no suena lógico usarlo como agente acarreador, tomando en cuenta que, en el microambiente tumoral, un monocito puede cambiar a un macrófago M2, y volverse un macrófago asociado a tumor (TAM), probablemente esa sea una de las razones por las cuales los macrófagos comenzaron a ser usados en sistemas de envío mediado por células antes que los monocitos.

Si se toma en cuenta la participación de nanoestructuras, estas pueden ser modificables para cumplir con los requerimientos de interacción con la membrana, dependiendo del tipo de interacción que se requiera (figura 12).

Anteriormente se revisó como es que las interacciones del complejo acarreado con la célula acarreadora tienen mucho que ver en la influencia del tratamiento, pero, en células no fagocíticas, es relativamente fácil, ahora, en células fagocíticas es una situación completamente diferente, tal es el caso de los macrófagos.

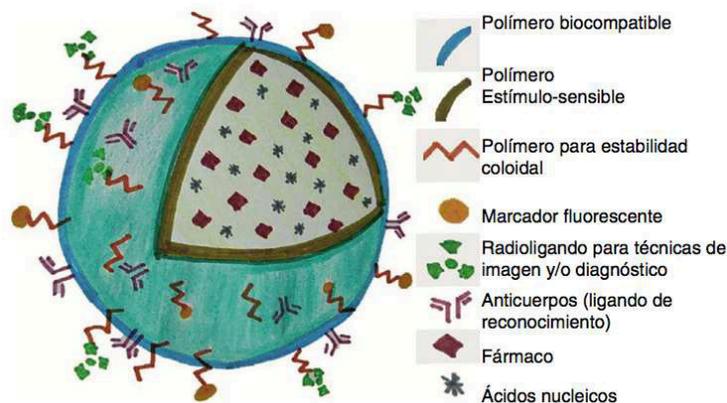


Figura 12. Representación de una nanoestructura para sistemas de envío (Tomado de Aguirre-Rojas Y et al. 2016).

Lunov Oleg y colaboradores en el 2011, trataron de dilucidar un sistema que funcionara para cualquier macrófago para internalizar estas nanoestructuras, particularmente nanopartículas de óxido de hierro supramagnético, esto debido a que estas nanopartículas son ampliamente usadas en el ámbito de imagenología, principalmente en resonancia magnética y en algún momento estas podrían interactuar con otros agentes para el envío dirigido a tejido.

Los macrófagos son fagocitos profesionales que no solo poseen la habilidad de fagocitar partículas, sino también de expresar diferentes receptores, que facilitan la absorción de partículas por opsoninas específicas, principalmente anticuerpos o factores del Sistema de complemento. Los macrófagos solo producen un rango de citocinas pro inflamatorias y mediadores cruciales para el armado de la respuesta inmune innata y adaptativa en inflamación y regeneración de tejido (Lunov Oleg et al. 2011).

Las cinéticas de absorción de los agentes de contraste del óxido de hierro están en función del tamaño de la partícula, de su forma, superficie y de los mecanismos por los que hasta ahora no habían sido caracterizados y cuantificados (Lunov Oleg et al. 2011).

Este grupo de investigadores logro conjetar, que la manera en la que los macrófagos internalizan a estas partículas, es mediante el uso de receptores del tipo basurero, pero dependiendo el tamaño, en el caso de nanopartículas mas grandes el proceso por el cual se internalizan es mediado por macropinocitosis independiente de la unión a receptor basurero.

Se ha reportado que los macrófagos del tipo M2 pueden promover a la progresión tumoral mediante la regulación de angiogénesis, aumentando una respuesta inflamatoria y la diseminación de células tumorales, y algunos efectos supresores de la respuesta inmunológica. Estos llamados TAMs (Macrófagos Asociados a Tumor, por sus siglas en inglés) tiene un tiempo corto de vida media y no tienen propiedades proliferativas, ellos tienen que ser continuamente reclutados a tumor. El uso de estos TAMs como agentes de envío a la región central hipóxica del tumor, para eliminar esta región puede inducir a una supresión tumoral eliminando células tumorales y previniendo de esta manera desarrollo metastásico de estas células (figura 13) (Jiwon Han et al. 2016).

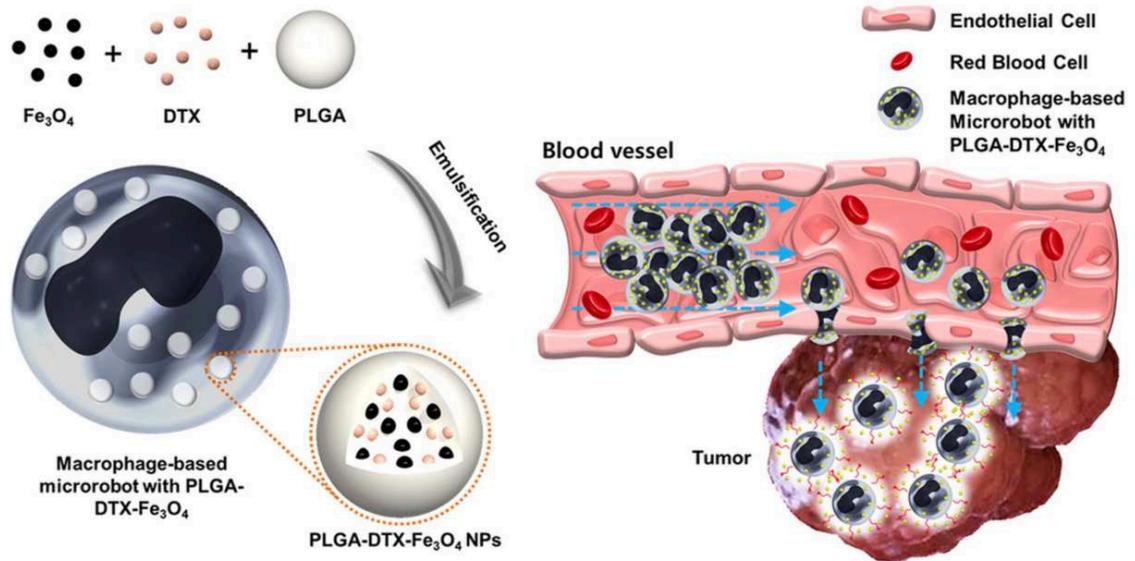


Figura 13. Desarrollo de una terapia basada en macrófagos como sistema de envío mediado por células (Tomado de Jiwon Han et al. 2016).

Una terapia magnética basada en células, que consiste en células cargadas con partículas magnéticas que pueden ser enviadas al sitio blanco por un campo magnético ha sido propuesto como una terapia celular avanzada. Cuando la patología es generada en múltiples sitios o en un tejido inaccesible, las células tienen que ser administradas vía sistémica. Estos sistemas magnéticos basados en terapias celulares facilitan el envío preciso de un agente terapéutico con nanopartículas magnéticas a un sitio de lesión específico. Las nanopartículas magnéticas pueden ser guiadas o enviadas a órganos específicos usando agentes magnéticos externos en un ambiente fluido como por ejemplo vasos sanguíneos, vasos linfáticos, o en el tracto urinario. Este tipo de terapias tienen aplicaciones en el caso de órganos completamente inaccesibles como lo son el hígado y el cerebro. Especialmente algunos tipos de tumores que se encuentran en un estado hipóxico en el centro de una anormal red de vasos que hacen que se disminuya el poder de la radioterapia y la quimioterapia (Jiwon Han et al. 2016).

Este estudio (Jiwon Han et al. 2016) fue llevado a cabo con el uso de nanopartículas supramagnéticas de óxido de hierro, recubiertas de polietilenglicol (PEG) y conteniendo doxorubicina (DOX) un agente quimioterapéutico utilizado de

primera línea en algunos tipos de tumores sólidos.

El tratamiento mostró ser efectivo, aunque solo fue medido in vitro, por lo tanto, una de las perspectivas de este trabajo era llevarlo a un modelo in vivo, en el que se pudiera describir la acción específica, y mostrar de manera contundente las ventajas de estos sistemas de llegada específica.

La idea del uso del monocito nace de la necesidad de un sistema que sea guiado por un gradiente de citocinas y quimiocinas inflamatorias, y que tenga mayor sensibilidad al de macrófago, ya que, el macrófago no tiene la capacidad de migrar de un tejido a otro, se especializan en tejido gracias a la migración de monocitos y a partir de ellos diferenciarse. El uso de monocitos en este tipo de terapias le da un fuerte golpe al tumor, ya que los monocitos tienen la capacidad de liberar una mayor cantidad de citocinas pro-inflamatorias y la liberación de una quimiocina llamada MCP-1 (quimiocina quimioatrayente de monocitos) para atraer a más monocitos al sitio e iniciar una respuesta inmunogénica.

Las terapias que utilizan campos magnéticos externos necesitan muchas veces, estructuras grandes de bovinas, fuentes de poder o magnetos permanentes adheridos a algún mecanismo de soporte. Aparte ellos necesitan un posicionamiento de reconocimiento y funciones de control. El monocito llega a ser una aparente solución a esos problemas (Sung Jun Park et al. 2014).

Sung jun Park y colaboradores propusieron evaluar la capacidad de migración de monocitos cargados con agentes, una especie de sistema de envío mediado por célula, pero con un agente reportero en lugar de uno terapéutico.

Utilizando células THP-1 (línea celular de leucemia aguda monocítica), evaluó el poder de migración de las células acarreadoras. Para evaluar la capacidad de transmigración, simulando un recorrido de células endoteliales a sitio tumoral se utilizaron células de cordón umbilical humano (HUVEC). A un millón de células THP-1

se les cargo con partículas de poliestireno fluorescente de 0.1, 0.3 y 1mm de diámetro, vertiéndolas en medio de cultivo que contenía THP-1 confluente.

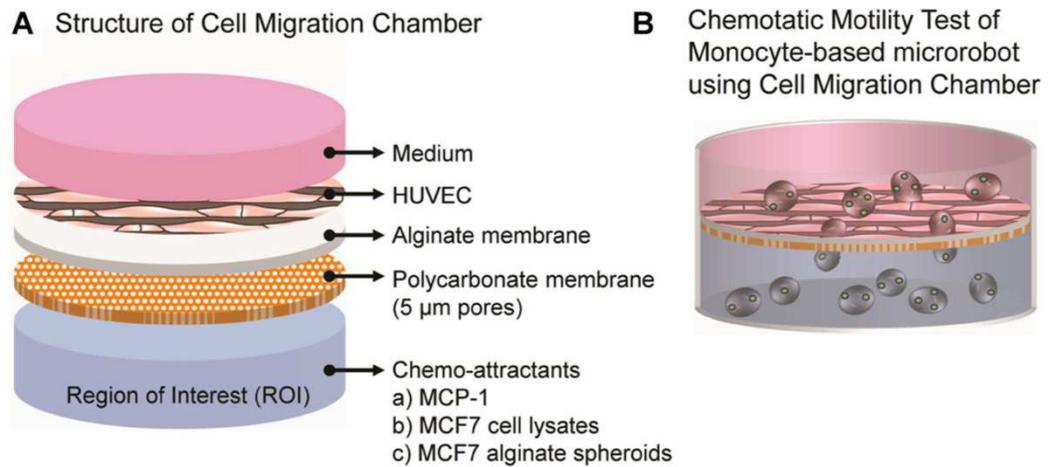


Figura 14. Cámara de trans migración (Tomada de Sung Jun Park et al. 2014).

Enriqueciendo la zona blanco de la cámara de trans migración mediante el uso de quimiocinas y lisis de células tumorales, simularon el ambiente periférico tumoral, para acercarse aún más a las condiciones reales de un tumor. Probaron tener razón al realizar el experimento y observar que la mayoría de microrobots basados en monocitos se encontraban en la capa inferior de la cámara de migración.

Este microrobot basado en monocitos mostro tener capacidad quimiotáctica hacia una zona similar a la tumoral, enriquecido con agentes quimioatrayentes, en una caja de migración (figura 14). Cuando las nanopartículas de poliestireno fluorescente se remplacen con drogas antitumorales, se espera que este sistema sea efectivo en efectos biomédicos terapéuticos contra cáncer (Sung Jun Park et al. 2014).

Posteriormente, en el 2016, un grupo de investigadores liderado por Zhiwei Xie usaron células THP-1 nuevamente, pero ahora directamente contra células de melanoma en un modelo in vitro, usándolas como acarreadoras de drogas anti-melanoma (figura 15).

Para minimizar los efectos adversos de la terapia en los leucocitos y maximizar los efectos antitumorales en células cancerígenas, PLX4032 también conocido como Vemurafenib; una droga diseñada específicamente para tratar melanomas con mutación BRAF V600E fue seleccionada, utilizando BPLP-PLA como agente encapsulante (poli-ácido láctico fotoluminiscente biodegradable).

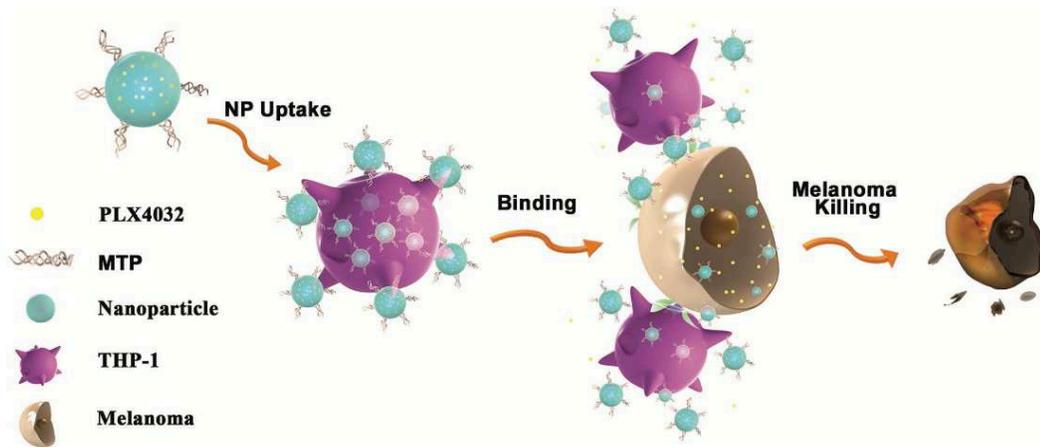


Figura 15. Mecanismo general del sistema de envío (Tomado de Zhiwei Xie et al. 2016).

Como resultado, lograron disminuir la viabilidad de las células de melanoma en el experimento gracias al uso de esta terapia.

Si bien resulta prometedor el uso de monocitos como agentes acarreadores, de igual manera presenta ciertos problemas para su aplicación in vivo. La extracción de monocitos es un tanto sencilla, ya que se puede hacer mediante gradientes de densidad y descartar células por capacidades de adherencia, sin embargo, obtenerlas puras, sin contaminaciones por algún otro fagocito es verdaderamente un reto. Aunado a lo anterior, mantener a los monocitos en un estado M0 de activación después de haberlos extraído de sangre total periférica es otro reto aún más complicado que el anterior, ya que, con mucha rapidez, estas células pueden pasar a un estado de activación M1 debido al recubrimiento de las cajas en las cuales se cultivan y proliferan.

Muchas de estos mecanismos de envío dirigido mediado por células se encuentran hoy en día en pruebas clínicas, pero aún mantienen la problemática de la

producción en gran escala, es por eso que reducir costos, utilizando agentes de menor precio, es importante, sin afectar el funcionamiento del sistema.

Tabla 1. Terapias asociadas a mecanismos de envío mediados por células aprobados por la FDA (Federal Drug Administration) o la EMA (European Medicines Agency).

Product (company)	Status	Therapeutics	Target disease
Erythrocytes (RBCs)			
EryDex (EryDel)	Phase II completed	Dexamethasone sodium phosphate	Ataxia telangiectasia
ERY-ASP (Erytech Pharma)	Phase II/III completed	L-asparaginase	Acute lymphoblastic leukemia
ERY-ASP (Erytech Pharma)	Phase IIb	L-asparaginase	Acute myeloblastic leukemia
ERY-ASP (Erytech Pharma)	Phase II clinical trial	L-asparaginase	Pancreatic cancer
ERY-ASP (Erytech Pharma)	Phase II testing	L-asparaginase	Non-Hodgkin lymphoma
ERY-MET (Erytech Pharma)	Preclinical development	Methionine-γ-lyase	Tumor starvation
ERY-ADI (Erytech Pharma)	Preclinical development	Arginine deiminase	Tumor starvation
ERY-IMMUNE (Erytech Pharma)	Under development	Tumor antigens	Vaccine immunotherapy
ERY-ERT (Erytech Pharma)	Preclinical	Therapeutic enzymes	Enzyme replacement therapy
RBC-derived microparticles	Preclinical		Hemostatic agents to prevent bleeding in trauma situation
OT-15 (Orphan Technologies)	Granted orphan designation by the FDA and EMA	Thymidine phosphorylase	Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy
OT-58 (Orphan Technologies)	Late-stage preclinical development	-	Enzyme replacement therapy for the treatment of homocystinuria
OT-44 (Orphan Technologies)	Under development	-	Enzyme replacement therapy for the treatment of propionic acidemia
OT-81 (Orphan Technologies)	Under development	Adenosine deaminase	Severe combined immunodeficiency
Dendritic cells (DCs)			
Autologous monocyte-derived DC EVs	Phase I	Melanoma antigen	Melanoma stage III/IV
Autologous monocyte-derived DC EVs	Phase I	Peptide loaded	Non-small-cell lung cancer
Autologous ascites-derived EVs	Phase I	Unmodified ± granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Colon cancer stage III or IV
Umbilical cord blood (allogeneic) mesenchymal stem cells-EVs	Phase I	Unmodified	Type I diabetes
Autologous interferon-γ matured monocyte-derived DC EVs	Phase II	Peptides	Non-small-cell lung cancer
Tumor cell-derived microparticles	Phase II	Chemotherapeutic drugs	Malignant pleural effusion
Stem cells			
VC-01™ (ViaCyte)	Phase I/II started		Type I diabetes
pancreatic precursor cells			
Neural stem cells	<i>In vivo</i>	Ciliary neurotrophic factor	Alzheimer's disease
Engineered T cells			
UCART123 (Collectis)	Preclinical		Acute myeloid leukemia
UCART38 and CS1 (Collectis)	Preclinical		Multiple myeloma
Lymphocytes (neutrophils)			
	<i>In vivo</i>	Chlorhexidine	Bacterial resistance to antimicrobials
	<i>In vivo</i>	Pyropheophorbide-a	Cancer therapy
	<i>In vivo</i>	Ibuprofen	Obstructive lung diseases
Platelets			
	<i>In vivo</i>	Factor VIII	Hemophilia A
	<i>In vivo</i>	Factor IX	Hemophilia B
	<i>In vivo</i>	Doxorubicin	Lung adenocarcinoma
Monocytes and macrophages			
	<i>In vivo</i>	Catalase	Parkinson's disease
	<i>In vivo</i>	Atazanavir, ritonavir, and indinavir	HIV-1 infection and neuro-AIDS
	<i>In vivo</i>	Nanoparticles and exogenous gene	Brain delivery
Exosomes			
Exosomes from mouse immature DCs	<i>In vivo</i>	Doxorubicin	Breast cancer
Exosomes isolated from brain cell culture	<i>In vivo</i>	Paclitaxel and doxorubicin	Brain cancer
Exosomes from monocytes and macrophages	<i>In vivo</i>	Catalase protein	Parkinson's disease

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la nanomedicina ha avanzado a pasos agigantados, de esa manera se pretende mejorar las terapias existentes contra cáncer mediante el uso de células como nanocarriers. Este proyecto tiene como intención el uso de células del sistema inmune como nanoacarreadores, para poder asegurar el envío específico de genes al sitio blanco o a la zona de tumor aprovechando la naturaleza quimiotáctica de los monocitos, y aplicando a su vez un estímulo magnético para aumentar la eficacia del transporte, gracias al uso de nanopartículas magnéticas acomplexadas con quitosan y DNA.

IV. HIPÓTESIS

Nanopartículas acomplexadas a Quitosan/ADN pueden ser acarreadas por monocitos, aprovechando sus cualidades quimiotácticas sensibles a tumor como mecanismo de envío dirigido.

V. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Diseñar un sistema a base de monocitos y nanopartículas acopladas a quitosán/ADN para el envío dirigido a tumor.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Elaborar y caracterizar nanocomplejos de nanopartículas magnéticas fluorescentes con quitosán y ADN.
2. Obtener monocitos a partir de sangre periférica de ratón.
3. Obtener macrófagos a partir de monocitos de ratón.
4. Elaborar microbots a base de monocitos y nanocomplejos.
5. Evaluar la efectividad del microbot *in vivo*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico.

- Cepas bacterianas:
 - *Escherichia coli*, TOP10F
- Líneas celulares
 - B16F10 melanoma murino.
 - Monocitos murinos.
 - Macrófagos murinos.
- Modelos animales
 - *Mus musculus*, C57Bl/6 hembras

Medios de cultivo.

- Agar y caldo Luria Bertani (LB).
- Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-F12) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico.
- Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI).

Quitosán.

- Quitosán soluble en agua de 20 kDa con un grado de desacetilación de 70%, proveniente de Coyote Foods.

Nanopartículas Magnéticas fluorescentes.

- Nanopartículas de 75 nm de diámetro, esféricas, compuestas por un núcleo de óxido de hierro superparamagnético (SPIO) de 8 nm, cubierto de una capa de silicio biocompatible y un fluoróforo orgánico unido de manera covalente, cuyo espectro es similar al del fluorocromo Cianina 5.5 (MaxVigenTM -710 nm, Nvigen).

6.1 Elaboración y caracterización de nanocomplejos de pDNA-Quitósán-NPMF

Para elaborar los nanocomplejos se usó la metodología de gelación iónica descrita por Calvo y Cols (1997), en la cual, en presencia de un agente entrecruzante los complejos se formarán de manera espontánea por interacciones iónicas.

6.1.1 Caracterización y obtención del plásmido reportero.

El plásmido utilizado en esta investigación fue pHRE_Luc, construido por el M. C. Luis Daniel Terrazas previamente. Dicho plásmido contiene una secuencia que codifica para el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) y un promotor tirosin quinasa posterior a este presenta seis elementos de respuesta a hipoxia.. En la figura 14 se puede observar el mapa del plásmido pHRE_Luc.

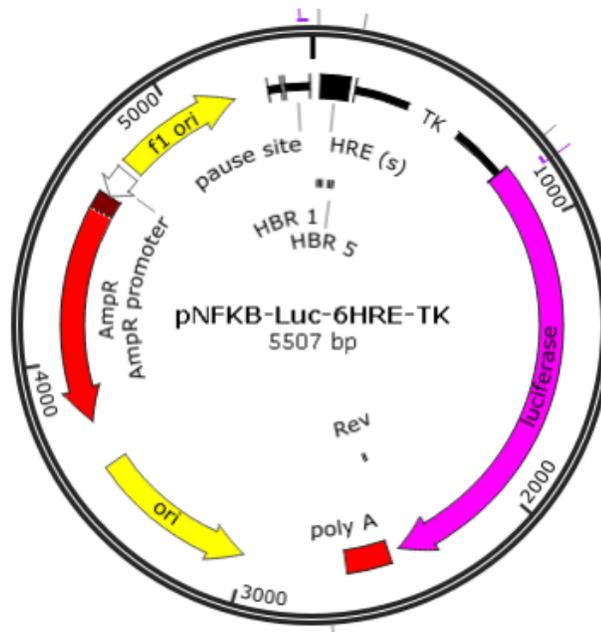


Figura 16. Plásmido pHRE_Luc

6.1.2 Screening rápido de colonias transformadas de *E. coli* por el método de fenol rápido.

Para evaluar la efectividad de la transformación de la bacteria con el plásmido se decidió usar un screen rápido, para esto las bacterias transformadas se sembraron en

placas de agar LB con ampicilina [100 µg/ml] y se mantuvieron en incubación durante la noche. Posteriormente se observaron las placas para poder elegir dos colonias para generar un screening rapido, y estas colonias fueron sembradas en 1 ml de caldo LB con ampicilina [100 µg/ml] y se mantuvieron en agitación a constante de 350 rpm por toda la noche a 37 °C.

De las dos colonias se tomó una alícuota de 200 µl y se dejaron 800 µl en cada tubo. Los 200 µl se refrigeraron a 4 °C y los 800 restantes se centrifugaron a 10,000 rpm durante dos minutos para obtener un botón, posteriormente se agregaron 20 µl de fenol y 20 µl de solución Dye (Sucrosa [6%] y azul de bromofenol [0.1%]), se mezcló en un vortex hasta que se homogenizara la muestra y se centrifugó a 12,000 rpm por dos minutos. El sobrenadante se cargó en un gel de agarosa al 1% para evaluar la presencia del plásmido. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a condiciones de 100 mV y 80 mA durante aproximadamente 45 min en un buffer TAE (Tris acetato [40mM], EDTA [1mM]). Por último, el gel fue revelado con bromuro de etidio y observado en un transiluminador (3 UV, UVP).

6.1.3 Caracterización del mediante ensayo de restricción.

Para la caracterización enzimática se utilizaron las enzimas NcoI y XhoI (Promega, Madison, USA) las cuales generan un reconocimiento a una secuencia específica en el plásmido.

La reacción general de digestión se realizó agregando:

1 µl de Buffer MC

1 µl de enzima NcoI

1 µl de enzima XhoI

0.5 µl de BSA

1 µl de plásmido [1 µg/ml]

5.5 de Agua PCR

10 µl de volumen final

La reacción se llevó a cabo por dos horas a 37 °C y la inactivación se realizó aumentando la temperatura a 70 °C por 10 min. Posteriormente se cargó en un gel de agarosa 1% el producto de la reacción y la electroforesis se corrió y reveló a las condiciones anteriormente descritas.

Como control positivo se cargó el plásmido previamente caracterizado y se agregó una escalera de 1 kb (Promega, Madison, USA) que facilitó la identificación del tamaño de las bandas obtenidas.

6.1.4 Extracción de plásmido por Maxiprep.

Una vez caracterizado el plásmido se tomaron 100 µl del remanente bacteriano guardado en el refrigerador y se sembró en un litro de caldo LB con ampicilina [100 µg/ml]. Se creció a 37 °C en agitación de 200 rpm durante la noche. Al día siguiente, se inició el proceso de extracción mediante el kit comercial “PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit” (Invitrogen California EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Centrifugar el cultivo a 4,000 g por 10 min en ultracentrífuga (Avanti J-25 I, Beckman), se descartó el sobrenadante y se agregó 20 ml de buffer R3 al botón, y se resuspendió con el uso de la micropipeta. Posteriormente se agregó 20 ml de buffer L7, mezclando por inversión aproximadamente 20 veces e incubado a temperatura ambiente por 5 min, para agregar después 20 ml de buffer N3 y mezclar nuevamente por inversión 30 veces. Una vez obtenido el lisado, este fue centrifugado a 12,000 g por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se separó el sobrenadante y fue cargado en la columna equilibrada previamente con el buffer de equilibrio (EQ), y se lavó con 60 ml de buffer W8 por gravedad. Se usaron 15 ml de buffer E4 para eluir el plásmido. La precipitación se llevó a cabo con 10.5 ml de isopropanol y se mezcló por inversión para ser centrifugado a 12,000 g por 30 min a 4 °C, una vez descartando el sobrenadante el pellet de DNA se lavó con 5 ml de etanol al 70% grado molecular, posteriormente se centrifugó por 5 min a 12,000 g y 4 °C.

Por último, el botón se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 min y se resuspendió en 200 µl de agua mQ. El plásmido purificado fue cuantificado usando un nanodrop ThermoScientific y almacenado a -20 °C para ser usado posteriormente.

6.2 Elaboración y caracterización de nanocomplejos de pADN-Quitósán-NPMF

Para elaborar los nanocomplejos se usó la metodología de gelación iónica

descrita por Calvo y Cols (1997), en el cual, en presencia de un agente entrecruzante los complejos se formarán de manera espontánea por interacciones iónicas.

6.2.1 Preparación de quitosán, tripolifosfato pentasódico y nanopartículas magnéticas fluorescentes.

El quitosán (Coyote Foods), el tripolifosfato pentasódico (TPP) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) fueron pesados y resuspendidos en agua mQ, a concentraciones de 2 mg/ml y 0.86 mg/ml respectivamente. Se prepararon 20 ml de cada solución.

Para el quitosán el pH fue ajustado a 5.5 mediante el uso de un potenciómetro (511212, Beckman) y el TPP se ajustó a 3.0.

Para eliminar impurezas las soluciones fueron filtradas usando una membrana de celulosa regenerada con un poro de 0.2 μm de diámetro (RC Synrige Filters, Corning), alicuotadas en tubos eppendorf de 1.7 ml y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las nanopartículas magnéticas fluorescentes (NPMF) (MaxVigen™ 710 nm, Nvigen) se adquieren en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, entonces fueron diluidas usando un factor 1:10 en PBS estéril para llegar a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

6.2.2 Elaboración de los nanocomplejos

Para la elaboración de los nanocomplejos fue necesario evaluar distintos parámetros, como el perfil de liberación y retención de pDNA, tamaño, potencial zeta y citotoxicidad de estos. Se evaluaron distintos radios proporcionales de Q:pDNA para mejorar la capacidad de encapsulamiento del plásmido.

Para calcular la cantidad de quitosán requerida en cada nanocomplejo según el radio proporcional Q:pDNA, se empleó la siguiente fórmula:

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

El TPP se agregó en relación 1:4 respecto al quitosán y la cantidad de pDNA en todos los casos fue de 1 μg .

Para elaborar los nanocomplejos se utilizaron dos tubos marcados (+) y (-) respectivamente, y con las cantidades según el radio proporcional correspondiente que se marcan en la tabla. En el tubo positivo (+) se coloca el quitosán con PBS para aforarlo a 15 μl de volumen final (Gibco) y en el tubo negativo (-) se colocaron, según el parámetro a evaluar, NPMF, pHRE_Luc, TPP y PBS para aforar de igual manera a 15 μl . Cada tubo fue mezclado en vortex aproximadamente 5 min. Posteriormente el contenido del tubo negativo (-) fue agregado por goteo al tubo positivo (+) con la ayuda de una micropipeta mientras que el tubo (+) se encontraba en agitación constante de 950 rpm y una vez mezclados totalmente se mantuvieron a la misma velocidad de agitación a temperatura ambiente por una hora.

Tabla 2. Componentes empleados en la elaboración de nanocomplejos magnéticos.

Tubo (+)				Tubo (-)			
	Quitosán	PBS		NPMF [100 $\mu\text{g/ml}$]	pDNA	TPP	PBS
Radio 10	2.5 μl	12.5 μl	+	1 μl	1 μl	0.625 μl	12.375 μl
Radio 20	5 μl	10 μl	+	1 μl	1 μl	1.25 μl	11.75 μl
Radio 30	7.5 μl	7.5 μl	+	1 μl	1 μl	1.875 μl	11.125 μl
Radio 40	10 μl	5 μl	+	1 μl	1 μl	2.5 μl	10.5 μl
Radio 50	12.5 μl	2.5 μl	+	1 μl	1 μl	3.125 μl	9.875 μl
Radio 60	15 μl	-	+	1 μl	1 μl	3,75 μl	9.25 μl

6.2.2.1 Ensayo de retención de pADN.

Para conocer el perfil de retención se evaluaron los distintos radios proporcionales Q:pADN mostrados en la tabla.

Estos complejos formados únicamente de quitosán, TPP y pADN fueron cargados en un gel de agarosa al 0.8 % para realizar un corrimiento electroforético por aproximadamente 45 min a 100 mV y 85 mA en buffer TAE. Como control se corrió una muestra de plásmido desnudo y posterior al corrimiento cada gel se reveló con el uso de bromuro de etidio y se observó el gel en un transiluminador y los resultados fueron fotodocumentados.

6.2.2.2 Ensayo de liberación de pADN.

Para conocer el perfil de liberación de pADN de los nanocomplejos, estos fueron sintetizados como se mencionó anteriormente e incluyendo las NPMF y posterior al tiempo de incubación estos fueron centrifugados a 13,500 rpm durante 30 min. El sobrenadante obtenido fue colectado, y los nanocomplejos fueron resuspendidos en 30µl de PBS estéril y se incubaron nuevamente en agitación, este procedimiento fue repetido cada hora hasta las 6 hrs, posteriormente a las 12 y después cada 24 hasta las 144 hrs.

La cantidad de pADN fue evaluada en los sobrenadantes obtenidos mediante el uso de un nanodrop (ThermoScientific). Se realizaron tres mediciones por muestra para que los resultados pudieran ser posteriormente graficados en función de tiempo.

6.2.3 Caracterización del tamaño de los nanocomplejos magnéticos.

Los nanocomplejos fueron sintetizados de la manera descrita previamente.

Las mediciones se realizaron por medio de dispersión de luz dinámica en un equipo Zetasizer (United Kingdom) Malvern.

6.2.4 Caracterización del potencial zeta de los nanocomplejos magnéticos

El potencial zeta fue medido mediante dispersión de luz dinámica en un equipo Zetasizer (United Kingdom) Malvern. Los 60 µl de nanocomplejos fueron aforados a 1ml de agua mQ y cargados posteriormente en una celda capilar plegada (DTS1060, Malvern).

Los valores de dispersante fueron de 0.8872 cP de viscosidad, 1.330 de RI y 78.5 de constante dieléctrica. La medición se realizó con el modelo de Smoluchowski, y el método de medición fue automático, realizando tres mediciones para cada muestra, los resultados obtenidos de las tres mediciones se reportan en una gráfica de potencial zeta/conteos que muestra una curva de frecuencia. El software utilizado por el equipo fue el “Zetasizer Software” versión 7.11.

6.2.7 Evaluación de la citotoxicidad de los nanocomplejos.

Se evaluó la citotoxicidad de los nanocomplejos magnéticos, así como también de cada uno de sus componentes de manera independiente. Usando la técnica de reducción metabólica del sodio [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilida] XTT (Sigma-Aldrich, CA, EUA). El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pozos, utilizando monocitos de cultivo primario y sembrando 100,000 células por pozo con 100 μ l de medio RPMI suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico-antimicótico, e incubando a 37 °C en una atmósfera de 95 % de O₂ y 5 % de CO₂.

Las células se dejaron en la placa de 96 pozos por aproximadamente una hora para climatizarlas, y posteriormente se procedió a agregar los nanocomplejos y sus componentes para evaluar en concentraciones de 1 μ g, 2 μ g y 3 μ g respectivamente.

Se incubó a las células por 24 horas y posteriormente se añadieron 20 μ l de XTT a cada pozo. Las células se incubaron por dos horas más y posteriormente se midió la absorbancia a 475 nm en un lector de microplacas (Synergy 2, Biotek), los resultados de viabilidad fueron graficados en función de la concentración y en base a la ecuación lineal se calculó la CC₅₀ de cada tratamiento.

6.2.8 Caracterización de la forma y tamaño de las NPMF y los nanocomplejos magnéticos con el uso de microscopia de fuerza atómica.

Los nanocomplejos magnéticos y las NPMF fueron observados por microscopia de fuerza atómica (MFA). Para ello 1 μ l de NPMF fue aforado con 59 μ l de agua mQ estéril, los nanocomplejos se elaboraron como ya antes se describió en un volumen final de 60 μ l igualmente.

Para la preparación de las muestras se tomaron 5 μ l de éstas y se colocaron en un portaobjetos estéril y se dejaron secar por 10 minutos. El método usado para la lectura

de las muestras fue topografía por semicortado, empleando una sonda RTESPA (Bruker, Massachusetts) con cantiléver rectangular de silicio dopado con antimonio de longitud de 125 μm y las lecturas se realizaron en un microscopio de fuerza atómica modelo NTEGRA de la compañía NT-MDT, y las imágenes registradas con el software Nova versión 1.1.0.1921 perteneciente a la misma compañía.

6.3 Obtención de monocitos a partir de sangre periférica de ratón.

Para cumplir este objetivo se realizó una punción cardiaca a 5 ratones C57BL/6 de 6-8 semanas y posteriormente se almacenó la sangre en tubos con EDTA/K₂.

Una vez obtenido 5 ml de sangre se mantuvo mezclando a 37 °C por 10 minutos, para continuar con el gradiente de densidad. Para esto se utilizó el Polymorphoprep™ (Axis Shield), que es un agente que posee la capacidad de diferenciar células polimorfonucleares de las células mononucleares, de esta manera nos facilitaría la purificación de los monocitos. Se agregó una relación 1:2 con respecto a la sangre periférica de ratón y posteriormente se centrifugó por media hora a 1,500 rpm. Transcurrido el tiempo de centrifugación se tomó el primer anillo de los dos formados como se muestra en la figura 17 a un tubo cónico de 15 ml, agregándole 10 ml de PBS para llevarlo posteriormente a centrifugación a 1,500 rpm por 15 min. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregaron 10 ml de PBS nuevamente como lavado final y se centrifugo a 1,500 rpm por 15 min nuevamente. Una vez obtenidas las células se resuspendieron en 1 ml de PBS y se midió la viabilidad de las células usando la técnica azul de tripano agregando una relación 1:1 y con la ayuda de una cámara de Neubauer procedimos a contar las células viables.

En una caja de cultivo de 5 cm³ se sembraron 1,000,000 de células en 3 ml de medio RPMI sin enriquecer a 37 °C en una atmosfera de 95 % de O₂ y 5% de CO₂ y se dejaron interactuar con la superficie de poliestireno para generar una selección positiva, ya que las células mononucleares se dividen en adherentes (monocitos) y no adherentes (linfocitos) y de esta manera pasadas dos horas se descartó el sobrenadante. Usando 3 ml de StemPro Accutase™ (Gibco) procedimos a despegar las células de la caja, y dejando

reposar por 15 min, para recolectar las células y añadimos 5 ml de PBS para generar un flush con ayuda de la pipeta y de esta manera recolectar el mayor número de células.

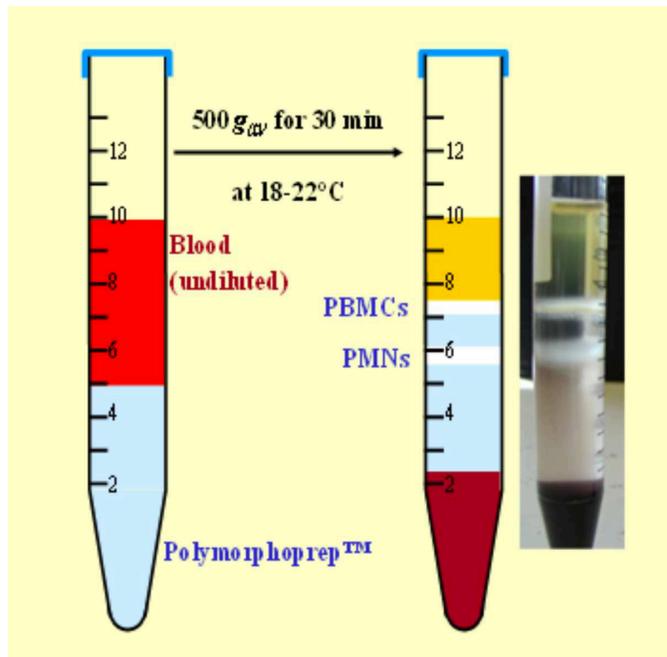


Figura 17. Separación de células por Polymorphoprep™.

Una vez obtenidos los monocitos purificados se sembraron nuevamente en placas de ultrajaba adherencia de 12 pozos (NUNC, ThermoScientific) añadiendo 100,000 células por pozo con medio RPMI enriquecido con 10% de suero fetal bovino, 10% de suero AB humano (extraído de un donante joven aparentemente sano) y 1 % de antibiótico-antimicótico y se dejaron incubar por 24 horas a las condiciones previamente descritas antes de su uso para la síntesis del microbot.

Para caracterizar a los monocitos se llevó a cabo una evaluación del perfil de liberación de citocinas mediante citometría de flujo (BD Accury™ C6, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) con un kit de citocinas TH1 de ratón (BD pharmigen, CA, EUA) utilizando como control positivo, monocitos activados con lipopolisacárido.

6.4 Obtención de macrófagos a partir de monocitos de ratón.

Para la obtención de macrófagos se empleó la técnica antes descrita para la

recuperación de monocitos de sangre periférica de ratón, pero en la separación de las células adherentes y no adherentes, una vez descartados los linfocitos, se agregan 3 ml de medio RPMI con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico en la misma placa y se deja reposar a las células por 1 hora a 37 °C en una atmósfera de 95 % de O₂ y 5% de CO₂. Posteriormente a esas mismas células se les estimuló con 1 µg de lipopolisacárido (LPS) bacteriano, en este caso de *Salmonella tiphymurium* (Sigma Aldrich) y se incubó a 37 °C en una atmósfera de 95 % de O₂ y 5% de CO₂ por 24 horas.

Para caracterizar a los macrófagos se llevó a cabo una evaluación del perfil de liberación de citocinas mediante citometría de flujo con un kit de citocinas TH1 de ratón (BD pharmigen) utilizando como control negativo, monocitos obtenidos de sangre periférica de ratón sin estímulo.

6.5 Generación de los microbots de monocito y macrófago.

De manera general la síntesis de los microbots se llevó a cabo mediante el anclaje de los nanocomplejos a la membrana del monocito y macrófago mediante interacción por cargas y un agente entrecruzante-estabilizador de cargas.

6.5.1 Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en monocito y macrófago.

Para generar un microbot funcional fue necesario evaluar cuantas células podían interactuar con 50 µg de estos nanocomplejos sin alterar su potencial de membrana o sin responder de manera agresiva (fagocitosis) a estos.

Para realizar el ensayo de capacidad de carga se sintetizaron nanocomplejos magnéticos con 50 µg de pADN, interactuando con soluciones a diferentes densidades celulares.

Las soluciones celulares contenían 1×10^7 hasta 1×10^9 células, a cada una de estas se les trató con nanocomplejos magnéticos con 50 µg de pDNA y se les agregó 187.5 µl de TPP, además de aforar con PBS para un volumen final de 1.3 ml, esto para monocitos y macrófagos respectivamente. Se mezcló todo por pipeteo y se incubó en agitación a 950 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 3000 g por 10 min, se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados más con 1ml de

PBS, después del último lavado se resuspendieron a un volumen final de 100 μ l de PBS.

Posteriormente a los microbots se les determinó el potencial zeta para poder evaluar la cantidad de células que se podían poner en contacto con los nanocomplejos sin alterar la integridad de la membrana.

6.5.2 Caracterización del estado de activación microbots.

Para evaluar que los complejos fueron adheridos en las células, los microbots se observaron por microscopia de fuerza atómica, con una evaluación del perfil de liberación de citocinas mediante citometría de flujo con un kit de citocinas TH1 de ratón previamente descrito y siguiendo las instrucciones del proveedor (BD pharmigen).

6.5.3 Caracterización de los microbots por microscopia de fuerza atómica.

Las células se mantuvieron en cajas Petri con medio RPMI sin enriquecer por dos horas para generar adhesión. Posteriormente sin fijar, las células fueron observadas en el microscopio de fuerza atómica.

6.6 Evaluación *in vivo* de los microbots.

Para determinar la eficacia de transporte y entrega, así como la expresión génica, se realizaron evaluaciones *in vivo* con ratones C57BL/6 hembras de 6 a 8 semanas. A los objetos de estudio se les inocularon 500,000 células B16F10 de melanoma murino resuspendidas en 150 μ l de PBS, con jeringas de insulina (Ultra-fine 31G x 6mm, BD Becton, Dickinson and Company) de manera subcutánea en el muslo izquierdo del ratón. El desarrollo tumoral se supervisó por un tiempo aproximado de 10 días post-inoculación.

Una vez establecido el tumor, los ratones fueron inoculados con ambos sistemas de microbots para seleccionar el mejor sistema, preliminarmente se emplearon tres grupos con una n=3. Posteriormente se determinó usar el sistema de monocitos, en el cual se evaluaron 5 grupos diferentes con una n=3 descritos a continuación:

Para el estudio preliminar de macrófagos se utilizó:

- Grupo 1: Control negativo, ratones con tumor de aproximadamente 1 cm de diámetro sin tratamiento.
- Grupo 2: Ratones con tumor de aproximadamente 1 cm de diámetro tratados con

microbots basados en macrófagos con la influencia de un campo magnético estático externo.

- Grupo 3: Ratones con tumor de aproximadamente 1 cm de diámetro tratados con microbots basados en monocitos con la influencia de un campo magnético estático externo.

Para la evaluación de la efectividad del microbot basado en monocitos *in vivo* los grupos fueron:

- Grupo 1: Ratones con tumor de aproximadamente 1 cm de diámetro tratados con microbots basados en monocitos con la influencia de un campo magnético estático externo.
- Grupo 2: Ratones con tumor de aproximadamente 1 cm de diámetro tratados con microbots basados en monocitos sin la influencia de un campo magnético estático externo.
- Grupo 3: Ratones con tumor de aproximadamente 1 cm de diámetro tratados con 50 μg de nanocomplejos magnéticos con la influencia de un campo magnético estático externo.
- Grupo 4: Ratones con tumor de aproximadamente 1 cm de diámetro tratados con 50 μg de nanocomplejos magnéticos sin la influencia de un campo magnético estático externo.
- Grupo 5: Control negativo, ratones con tumor de aproximadamente 1 cm de diámetro sin tratamiento.

A los grupos que incluían la influencia de un campo magnético, se les colocó un magneto de neodimio con un diámetro de 3/8" e intensidad de 30,000 Gaus (3T) por una hora. El magneto fue colocado directamente sobre la zona tumoral (sujetándolos con bandas adhesivas) con la finalidad de dirigir el tratamiento a esa zona. Cuarenta y ocho horas después de la exposición al magneto, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, el tumor, así como diferentes órganos: corazón, hígado, pulmón, riñones y bazo fueron extraídos en condiciones de asepsia y congelados a -20°C para su posterior procesamiento.

Para procesar las muestras cada uno de los órganos fue lavado con el uso de PBS para eliminar trazas de sangre, en seguida fueron cortados en trozos pequeños con el uso de un bisturí para ser colocados en un tubo cónico de 2 ml y se les agregó 100 μl de PBS mas y posteriormente se les maceró con el uso de un taladro procesador de tejido.

Después con el uso de 500 µl de buffer RIPA (Thermo Scientific) enfriado a 4°C en cada tubo con tejido se centrifugó a 10,000 g por 15 min. El sobrenadante fue recolectado en otro tubo y se añadieron 200 µl más de buffer RIPA al tubo con el botón y se centrifugo nuevamente a 10,000 g por 15 min. El sobrenadante fue recolectado nuevamente en un tubo y congelado a -20 ° C para su posterior análisis.

6.6.1 Análisis de especificad del transporte mediado por el microbot.

Para la evaluación de la especificidad del sistema se midió la fluorescencia en cada muestra, para esto se tomaron 50 µl de la muestra y se mezclaron con 100 µl de PBS y los 150 µl resultantes se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (Costar ®, Corning Inc.). La fluorescencia de las NPMF fue evaluada con el uso de un lector de placas Varioskan Lux, con los parámetros previamente explicados.

6.6.2 Evaluación de la expresión génica.

Como parte final de la evaluación del sistema *in vivo*, se midió la expresión del gen de la luciferasa codificado en el plásmido pHRE_Luc. Para este análisis se utilizó el kit luciferase assay system (Promega). Para la determinación de luminiscencia se utilizaron 20 µl de cada muestra tumoral, los cuales fueron colocados en una placa de 96 pozos de fondo plano. Se le agrego a cada muestra 100 µl de luciferase assay reagent de acuerdo al protocolo brindado por el fabricante. La luminscencia del plásmido fue evaluada con el uso de un lector de placas Varioskan Lux.

6.6.3 Homogenización de datos.

Para poder contar con datos que no mantuvieran valores ambiguos influenciados por factores como, volumen, error humano de pipeteo, peso y tamaño de órganos, se decidió ajustar cada una de las muestras a fluorescencia y luminiscencia por mg de proteína. Para conocer la concentración total de proteína por muestra se midió la cantidad de proteína mediante el uso de un Nanodrop con su función de lectura de proteína A260 y posteriormente con una regla de tres se ajustaron los datos.

6.4.4 Análisis estadístico.

Para verificar la normalidad de los datos se empleó una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov utilizando el software estadístico SPSS versión 20. Una vez verificada la normalidad de los datos se procedió a hacer un ANOVA de dos vías,

seguida de una prueba post hoc para comparación de medidas múltiple con la prueba de Tukey, esto con el uso del software GraphPad Prism versión 7.0.

XIII. RESULTADOS

7.1 Elaboración y caracterización de nanocomplejos de nanopartículas magnéticas fluorescentes con quitosán y pADN.

7.1.1 Caracterización del plásmido pHRE-Luc.

El plásmido purificado y digerido se encuentra en la figura 18, donde se presenta el gel de electroforesis del ensayo de restricción, que contiene el plásmido pHRE sin digerir como control y este mismo digerido. El patrón muestra un fragmento de 3,851 pb dado por la enzima NcoI y uno en 1656 pb dado por la enzima XhoI. En el carril control podemos observar las dos bandas correspondientes a dos de las tres conformaciones características que presenta un plásmido en un corrimiento electroforético.

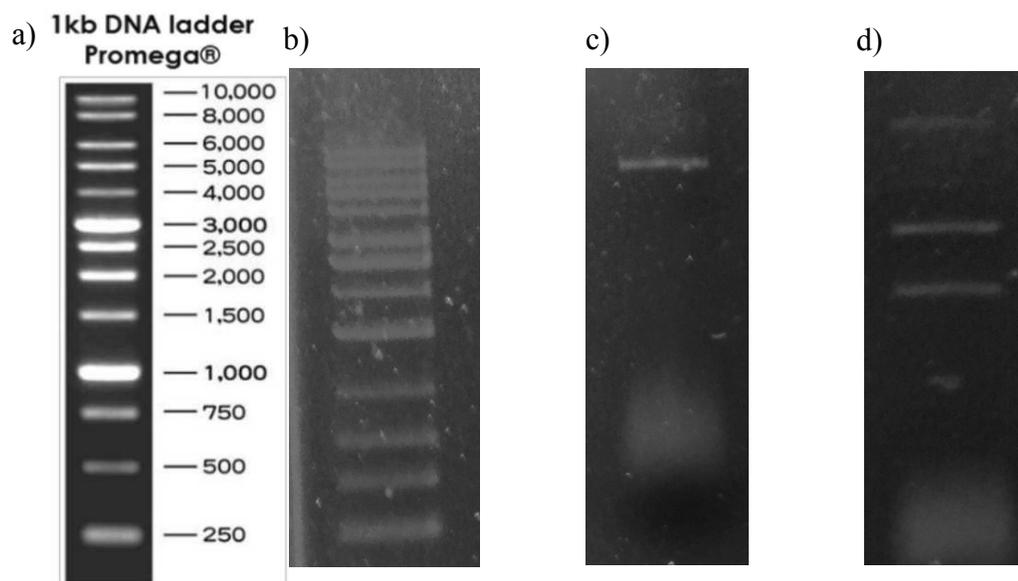


Figura 18. Caracterización del plásmido pHRE-Luc mediante digestión enzimática. Electroforesis realizada en gel de agarosa al 1%. a) Carril escalera. b) Marcador de peso molecular. c) Carril control. d) Carril de digestión enzimática.

7.1.2 Caracterización de perfil de retención y liberación de plásmido pHRE-Luc de los nanocomplejos de Q/pADN.

7.1.2.1 Perfil de retención de los nanocomplejos de Q/pADN.

Una vez formados los complejos a distintos radios, estos fueron cargados en un gel de agarosa al 1% para evaluar la capacidad de retención del pADN. Se agregó como control pADN correspondiente a pHRE-Luc, y en los carriles siguientes los diferentes radios proporcionales. Como muestra la figura 19, el radio proporcional 10:1 muestra liberación del pADN y en los siguientes carriles esto no se observa, siendo así el radio 60:1 el que retiene de mejor manera el pADN.

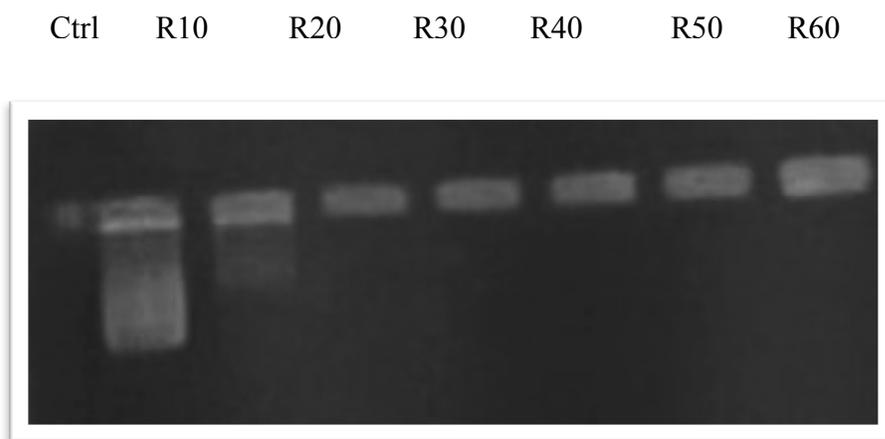


Figura 19. Perfil de retención de pADN por parte de los nanocomplejos sintetizados a partir de diferentes radios de Q:pADN.

7.1.2.2 Caracterización del perfil de liberación de pADN de los nanocomplejos de Q/pADN

En el ensayo de liberación de plásmido pudimos observar una liberación total de 326 ng/ μ l del nanocomplejo al sobrenadante, obteniendo como total una liberación del 32.6 % con respecto a los 1000 ng/ μ l que se añadieron en la formación del nanocomplejo, mostrando el punto más alto de liberación a las 12 horas.

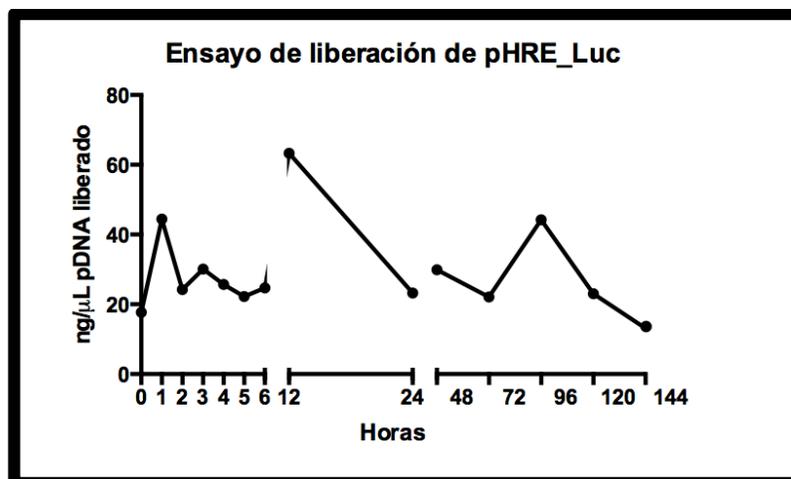


Figura 20. Liberación de plásmido a lo largo de 144 horas.

7.1.3 Caracterización en tamaño y potencial zeta de los nanocomplejos de Q/pADN/NPMF.

Una vez establecido que el radio a utilizar era el 60:1 se procedió a evaluar los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF usando 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPMF acomplejadas a 1 μg de pDNA en un volumen final de 60 μl en tamaño, homogeneidad por medio de dispersión de luz dinámica, mostrando una alta homogeneidad en la muestra y manteniendo un tamaño de 229.5 nm, tal y como se muestra en la figura 21. Respecto al potencial zeta de los nanocomplejos, en la figura 22 se muestra la gráfica obtenida de esta medición, obteniendo como resultado un potencial zeta positivo de 8.38 mV en el 100% de la muestra.

Z-Average (d.nm): 201.3
Pdl: 0.179
Intercept: 0.896
Result quality : Good

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Peak 1:	229.5	100.0	84.79
Peak 2:	0.000	0.0	0.000
Peak 3:	0.000	0.0	0.000

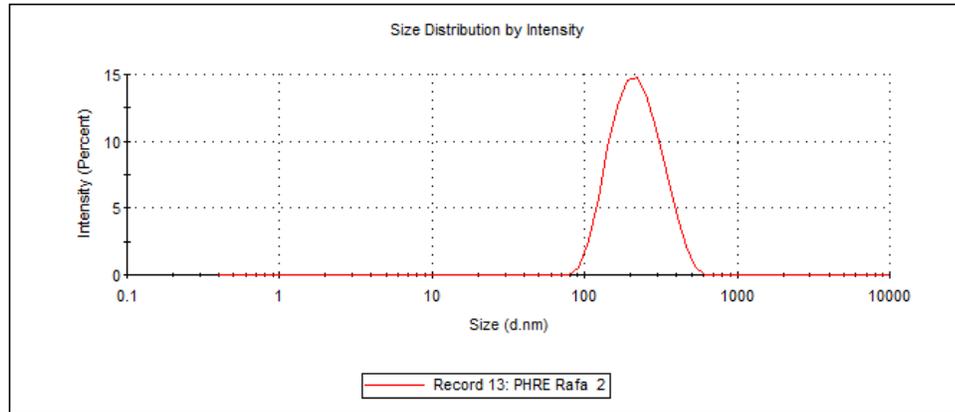


Figura 21. Caracterización en tamaño y homogeneidad de los nanocomplejos de Q/pDNA/NPMF, usando el radio Q:pADN 60:1.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 8.38	Peak 1: 8.38	100.0	5.42
Zeta Deviation (mV): 5.42	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.07	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : **Good**

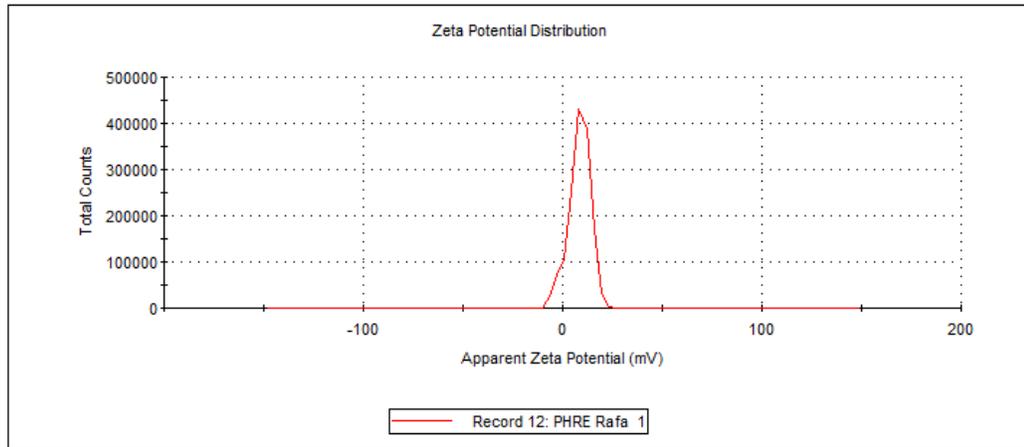


Figura 22. Caracterización en potencial zeta de los nanocomplejos de Q/pADN/NPMF.

7.1.4 Evaluación de la citotoxicidad de los nanocomplejos de Q/pADN/NPMF

La tabla 3 muestra la CC_{50} correspondiente a las gráficas de cada uno de los tratamientos mostrados en la figura 23 para los nanocomplejos y cada uno de sus componentes.

Tabla 3. Concentración citotóxica 50 para cada uno de los componentes de síntesis y nanocomplejos en 100,000 monocitos.

	Nanocomplejos	NPMF	TPP	Quitosán
CC_{50}	6.37 μg	17.23 μg	5.30 μg	37.09 μg

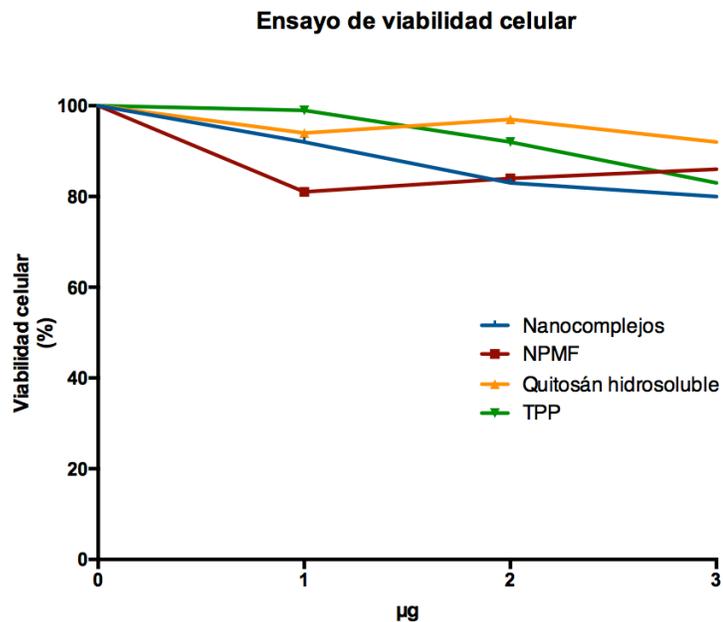


Figura 23. Viabilidad de monocitos expuestos a nanocomplejos y a cada uno de los componentes. Gráficas lineales obtenidas a partir de las absorbancias obtenidas con diferentes concentraciones de los componentes de los nanocomplejos y con estos mismos en 100,000 células.

7.1.5 Caracterización en forma y tamaño de las NPMF y los nanocomplejos de Q/pADN/NPMF por MFA.

Se caracterizaron las nanopartículas en forma y tamaño por medio de MFA para corroborar los datos obtenidos por el Zetasizer y poder hipotetizar un modelo que nos permita dilucidar la interacción de la célula con el nanocomplejo (figura 24). El tamaño resulto ser de 57 nm para las NPMF con una forma esferoidea y de 250 a 350 nm para los nanocomplejos con una forma completamente irregular.

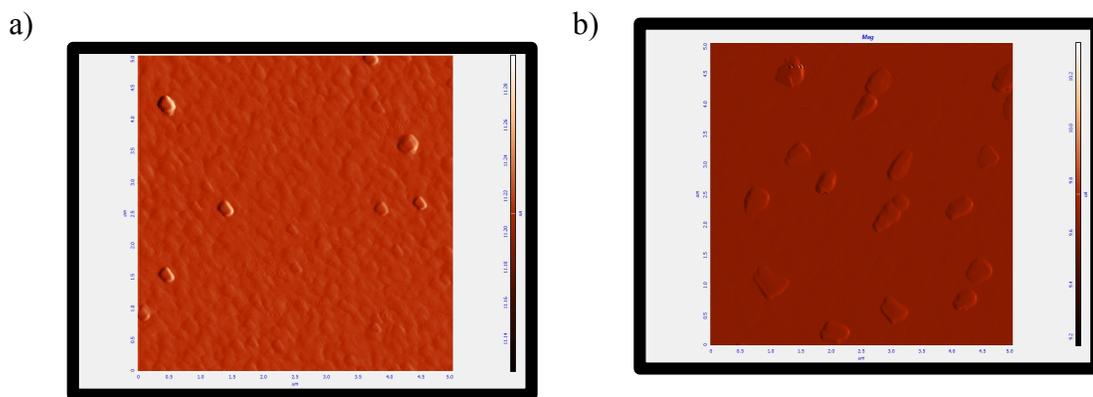


Figura 24. Caracterización por AFM de NPMF y de los nanocomplejos. a) Nanopartículas magnéticas fluorescentes. b) Nanocomplejos de NPMF, quitosán, TPP y pADN.

7.2 Obtención de células.

7.2.1 Obtención de monocitos a partir de sangre periférica de ratón.

La muestra se incubó 48 horas, dentro de las cuales, se visualizó la muestra bajo microscopía óptica a las 2, 12, 24 y 48 horas, para analizar el desarrollo de las células y sus cambios morfológicos. En un periodo de 2 horas los monocitos se mantienen sin cambios morfológicos evidentes, al igual que a las 12 horas, sin embargo, a las 24 y 48 horas se comienza a observar cambios morfológicos, indicando un posible estado de activación como se observa en la figura 25.

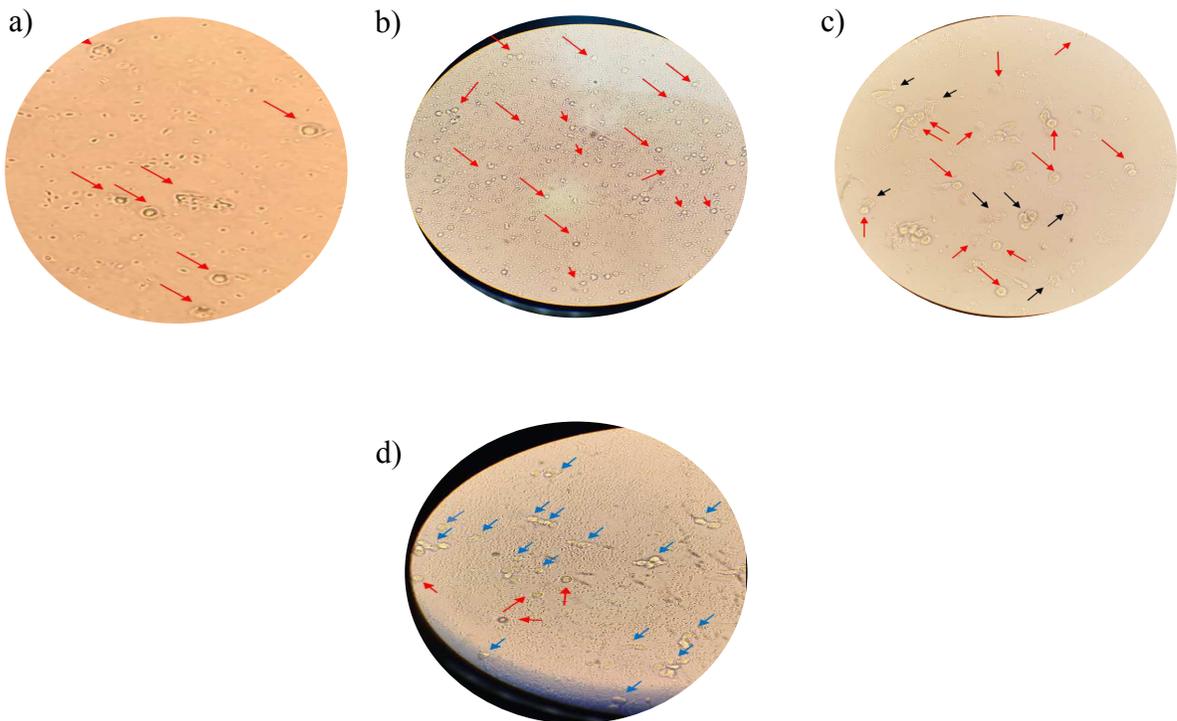


Figura 25. Cambios morfológicos de monocitos de acuerdo a tiempo de cultivo. a) Monocitos a 2 horas de siembra en medio de cultivo. b) Monocitos a 12 horas de cultivo. c) Monocitos a 24 horas de cultivo. d) Monocitos a 48 horas de cultivo.

7.2.2 Obtención de macrófagos a partir de monocitos de ratón.

Para el cultivo de macrófagos, los monocitos se incubaron por 24 horas con 1 μg de lipopolisacárido para generar su activación, resultando un 100% de confluencia de macrófagos a las 24 horas de aplicación como se muestra en la figura 26.

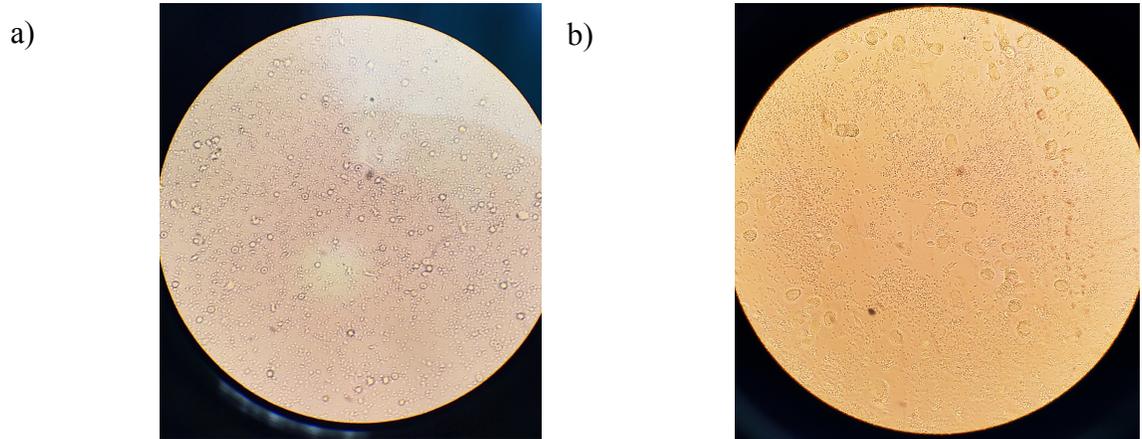


Figura 26. Activación de monocitos a macrófago mediante la adición de LPS. a) Monocitos a 2 horas de siembra en medio de cultivo RPMI enriquecido con 10% de suero fetal bovino, 10% de suero AB humano y 1% de antibiótico y antimicótico, incubado a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. b) Monocitos a 24 horas de exposición al LPS.

7.3 Caracterización celular por medio de perfil de liberación de citocinas.

Se realizó un ensayo de medición de citocinas en sobrenadante por citometría de flujo mostrado en la figura 27, para analizar el estado de activación de las células, mostrando que ambas células corresponden directamente según su perfil a un monocito M0 cultivadas por 24 horas y a M1 a las células cultivadas con la adición de lipopolisacárido.

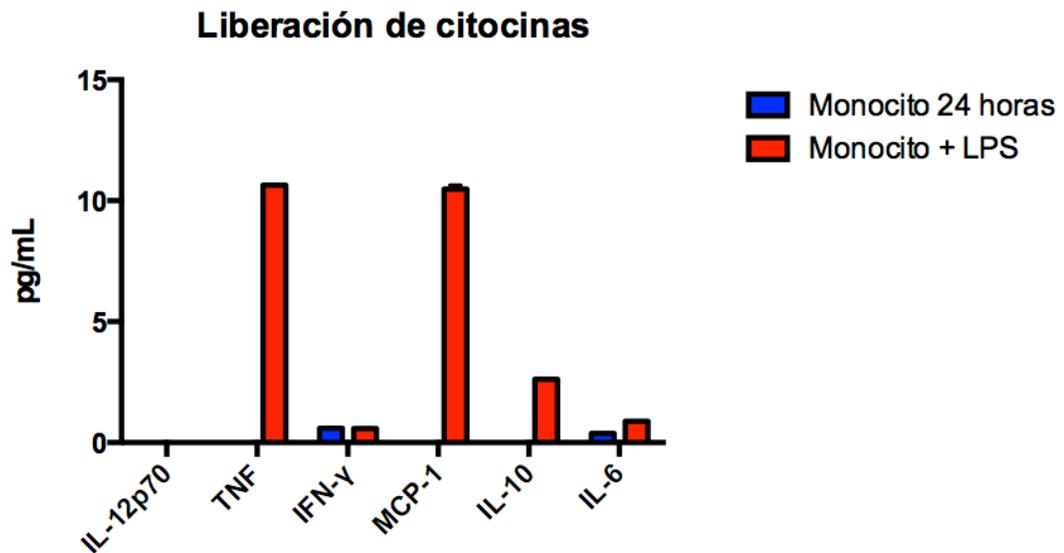


Figura 27. Perfil de liberación de citocinas. La columna azul corresponde a la concentración dada en pg/mL de citocinas liberadas por los monocitos cultivados por 24 horas y la barra roja a los monocitos activados por la presencia de 1 μ g de LPS.

7.4 Caracterización de los microbots basados en monocitos/macrófagos y nanocomplejos.

Para poder caracterizar a los microbots se llevaron a cabo distintas evaluaciones, principalmente morfológicas, mediante MFA, en capacidad de carga mediante la medición del potencial zeta de las células y su cambio una vez en contacto con el nanocomplejo, al igual que un ensayo de liberación de citocinas y una caracterización por medio de anticuerpos en citometría de flujo para conocer si los nanocomplejos eran capaces de llevar a cabo una activación de los monocitos o si ejercían una repolarización de M1 de los macrófagos a M2.

7.4.1.1 Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en monocitos y nanocomplejos mediante medición de potencial zeta.

En los resultados de caracterización de los monocitos en potencial zeta (Figura 28) tenemos que el potencial zeta de los monocitos es de -25.9 en PBS a pH 7.0 en una población promedio de 1,000,000 de células por mL. En el ensayo de capacidad de carga se usaron diferentes concentraciones de células como controles de tratamiento, que fueron desde 10,000 células hasta 10,000,000 células.

En el ensayo de capacidad de carga de monocito como podemos ver en la tabla 4, se muestra como condición más estable el uso de 10,000,000 de células para la generación del microbot, sin embargo, al ser un número muy alto de células, la obtención de las mismas se complica, por lo que se decidió mantener el millón de células para sintetizar los microbots.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -25.9	Peak 1: -25.9	100.0	5.18
Zeta Deviation (mV): 5.18	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.227	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : Good

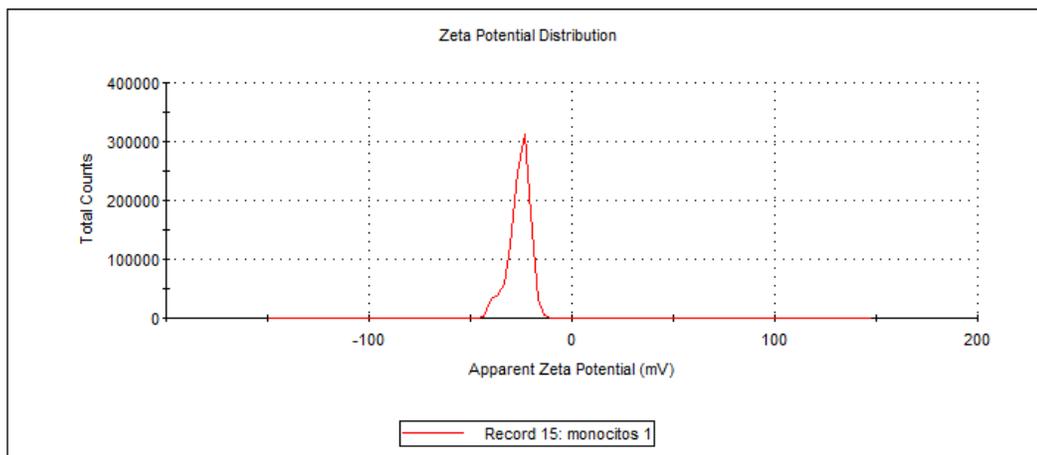


Figura 28. Medición del potencial zeta de monocitos. Las células se encuentran suspendidas en PBS a pH 7.0 en una concentración de 1,000,000 células por mililitro.

Tabla 4. Potencial zeta de monocitos a diferentes concentraciones, cargados con nanocomplejos al 50X.

<i>Células</i>	<i>Potencial Zeta Control</i>	<i>Potencial Zeta tratamiento</i>
1×10^4	-28.2 mV	-9.14 mV
1×10^5	-21.1 mV	-3.77 mV
1×10^6	-10.8 mV	-8.03 mV
1×10^7	-9.9 mV	-7.95 mV

7.4.1.2 Estandarización de la capacidad de carga de los microbots basados en macrófagos y nanocomplejos mediante medición de potencial zeta.

En los resultados de caracterización de los macrófagos en potencial zeta (Figura 29) se muestra que el potencial zeta de los macrófagos es de -25.9 en PBS a pH 7.0 en una población promedio de 1,000,000 de células por mL. En el caso de los macrófagos se decidió usar la concentración de 1,000,000 de células ya que no se observaba un cambio significativo en el potencial comparada con las otras concentraciones (Tabla 5).

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -32.8	Peak 1: -32.8	100.0	5.09
Zeta Deviation (mV): 5.09	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.103	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : Good

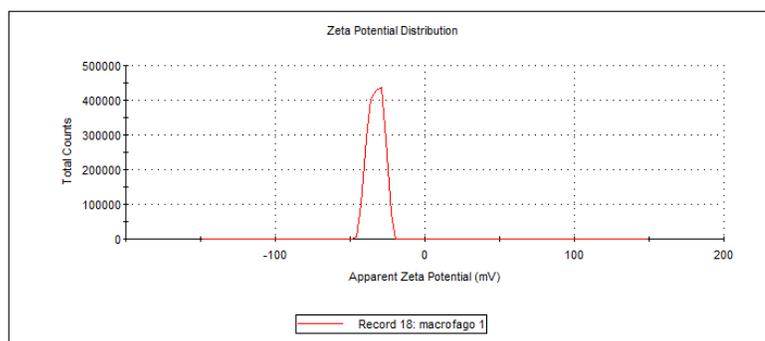


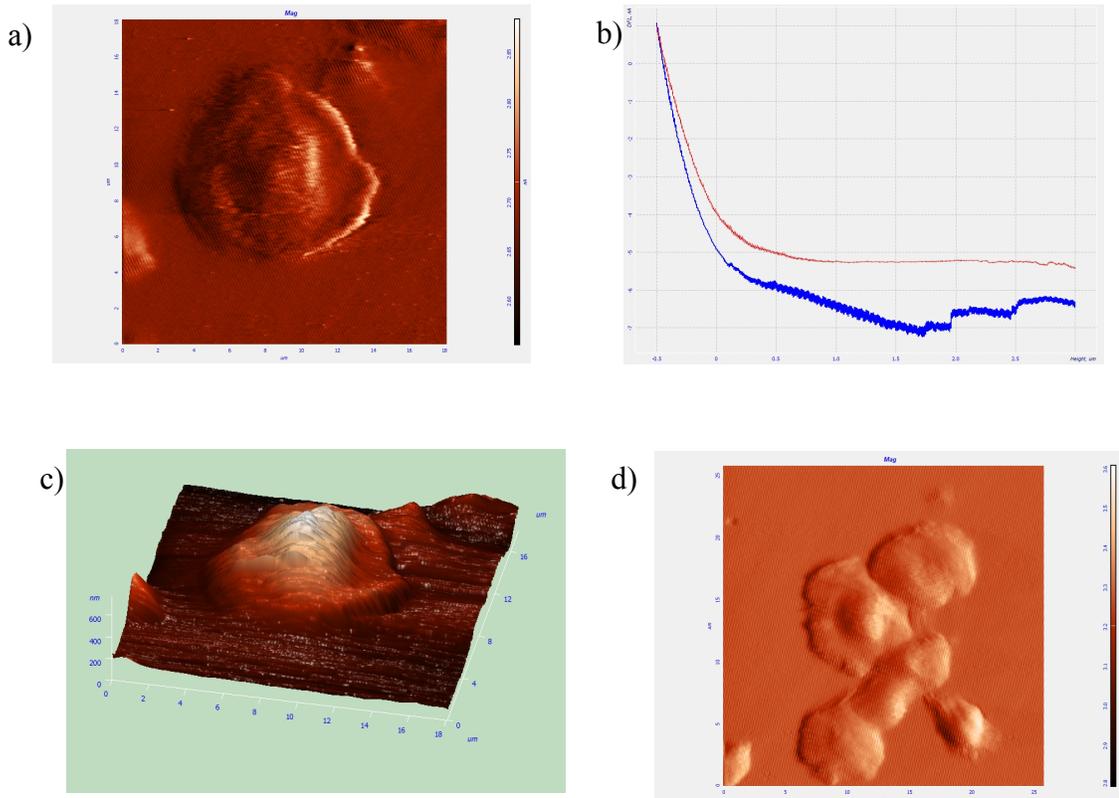
Figura 29. Medición del potencial zeta de macrófagos. Las células se encuentran suspendidas en PBS a pH 7.0 en una concentración de 1,000,000 células por mililitro.

Tabla 5. Potencial zeta de macrófagos a diferentes concentraciones, cargados con nanocomplejos al 50X.

<i>Células</i>	<i>Potencial Zeta Control</i>	<i>Potencial Zeta tratamiento</i>
1×10^4	-30.1 mV	1.73 mV
1×10^5	-24.5 mV	-0.39 mV
1×10^6	-14.3 mV	-6.17 mV
1×10^7	-11.9 mV	- 4.38 mV

7.4.2 Caracterización de los microbots basados en monocitos/macrófagos y nanocomplejos por MFA.

La figura 30 muestra imágenes de altura de un monocito completo (a), la gráfica de altura en la región de membrana (b), la imagen 3D resultante de la microscopia (c), así como un campo en donde se observan monocitos en mitosis (d) y su respectiva imagen en 3D (e,f). En este conjunto de imágenes se puede observar sus características morfológicas principales, como su núcleo prominente, su citoplasma redondeado y un tamaño de aproximadamente 12 a 15 μm .



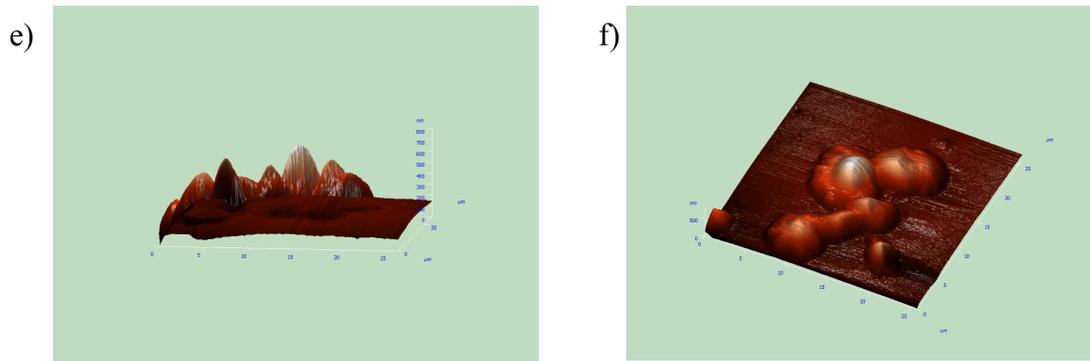


Figura 30. Microscopía de fuerza atómica de un monocito completo y monocitos en mitosis. a) Monocito en 2D. b) Gráfica de altura en región de membrana. c) Simulación 3D de altura del monocito. d) Monocito en mitosis en 2D. e) Simulación de monocitos en mitosis.

7.4.3 Caracterización del estado de activación de las células mediante un perfil de liberación de citocinas medidas por citometría de flujo.

Como parte de la caracterización de las células se incluyó un ensayo de liberación de citocinas, el cual dio como resultado que los monocitos cargados con nanocomplejos no liberan citocinas similares a las de un perfil de activación, al igual que los microbots generados con macrófagos no cambian su perfil de liberación de citocinas M1 a M2, como se muestra en la figura 31.

Liberación de citocinas a 24 hrs de contacto monocito/macrófago con nanocomplejo

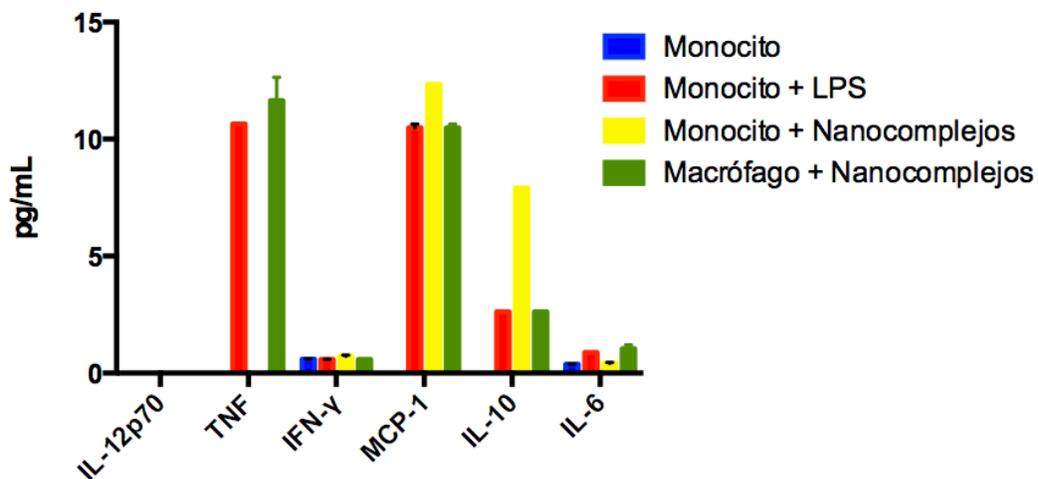


Figura 31. Gráfica de liberación de citocinas a 24 horas de contacto para monocito y macrófago con nanocomplejos al 1X.

7.5 Evaluación del microbot *in vivo* sistema monocito vs sistema macrófago.

Para evaluar la efectividad de llegada del microbot *in vivo* se usó la fluorescencia emitida por las nanopartículas magnéticas fluorescentes en cada uno de los órganos.

7.5.6 Análisis de fluorescencia emitida por las nanopartículas y los órganos para evaluación de capacidad de llegada del microbot.

La fluorescencia emitida de cada órgano, así como del tumor se muestra en la figura 32. Se observa que ambos microbots tienen una alta capacidad de llegada a tumor, sin embargo, la bioacumulación de los microbots basados en macrófagos en hígado es muy alta, seguida por la que se observa en riñón y por último en tumor.

El sistema de monocitos mantiene una relación muy buena de llegada específica y bioacumulación como, por lo tanto, decidimos evaluar la influencia del campo, la influencia de la quimiotaxis propia del monocito y otros parámetros en un segundo experimento *in vivo*.

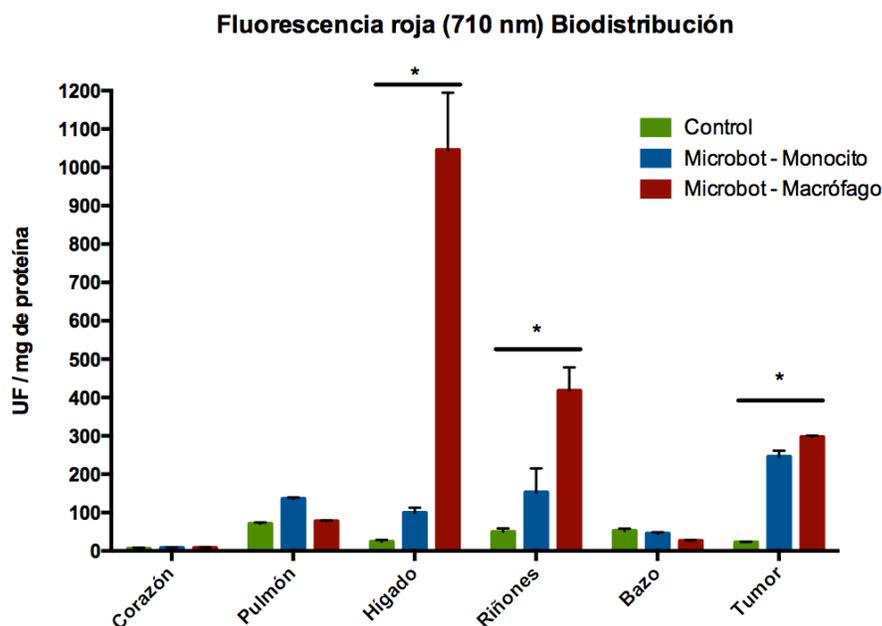


Figura 32. Fluorescencia de órganos y tumor de ratones inoculados con los diferentes microbots. Promedio de las mediciones (n=3) ex 673nm en 695nm. Barras de desviación estándar mostradas, 2way ANOV A, Tukey post ANOVA, * p>0.05.

7.6 Evaluación del microbot basado en monocitos *in vivo*.

Para evaluar la efectividad del microbot *in vivo* se usaron dos parámetros, la fluorescencia emitida por las nanopartículas magnéticas fluorescentes en cada uno de los órganos y la expresión génica mediante un ensayo de luciferasa.

7.6.1 Análisis de fluorescencia emitida por los órganos y por las NPM para la evaluación de la llegada específica del microbot.

El grupo control se tomó como blanco para poder observar datos de fluorescencia reales sin la influencia de la fluorescencia basal de los órganos y del tumor.

La fluorescencia emitida de cada órgano, así como del tumor se muestra en la figura 33 y figura 34. Se puede apreciar que cuando el microbot se encuentra con la influencia del campo magnético incrementa su llegada específica a tumor, sin embargo,

sin la influencia de este, llega a tumor, pero mantiene una bioacumulación considerable en otros lugares, tal es el caso de bazo y de hígado como se muestra en la figura 33.

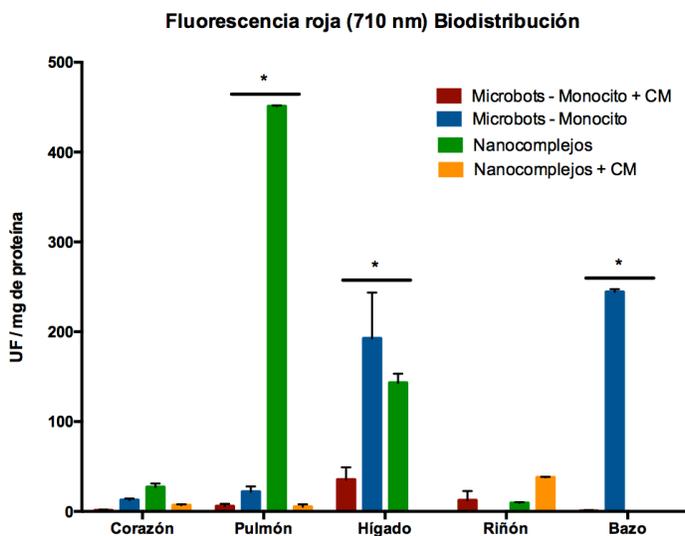


Figura 33. Fluorescencia de órganos de ratones inoculados con los diferentes tratamientos. Promedio de las mediciones (n=3) ex 673nm em 695nm. Barras de desviación estándar mostradas, 2way ANOV A, Tukey post ANOVA, * p>0.05.

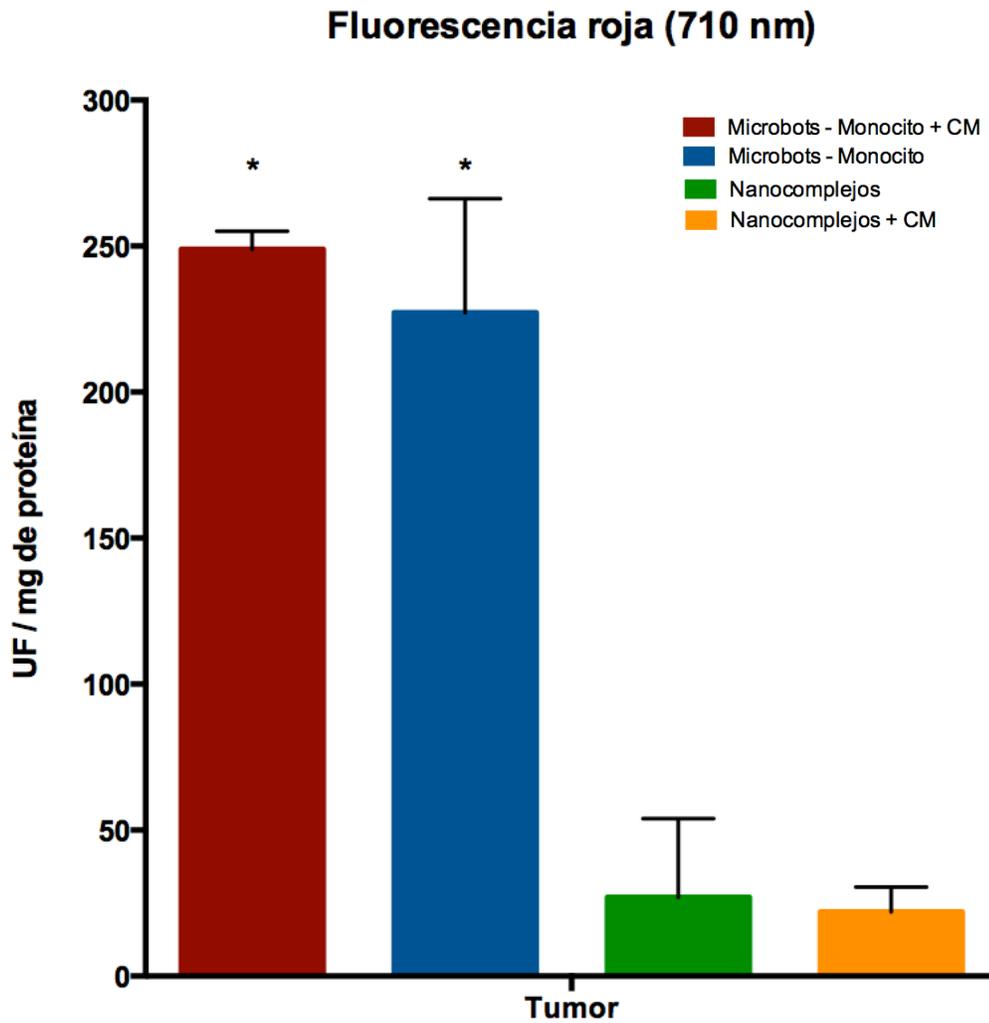


Figura 34. Fluorescencia de tumor de ratones inoculados con los diferentes tratamientos. Promedio de las mediciones (n=3) ex 673nm em 695nm. Barras de desviación estándar mostradas, 2way ANOVA, Tukey post ANOVA, * p>0.05.

7.6.2 Análisis de la expresión génica del plásmido pHRE_Luc en tumor.

La luminiscencia emitida por la degradación de la luciferina mediante la luciferasa codificada en el plásmido fue cuantificada, y como resultado, en la figura 35 podemos observar que la mayor cantidad de luminiscencia se encontró en el grupo que no tenía la influencia del campo magnético, sin embargo, el grupo que poseía la influencia del campo magnético también genera una expresión del gen, pero no a la misma escala.

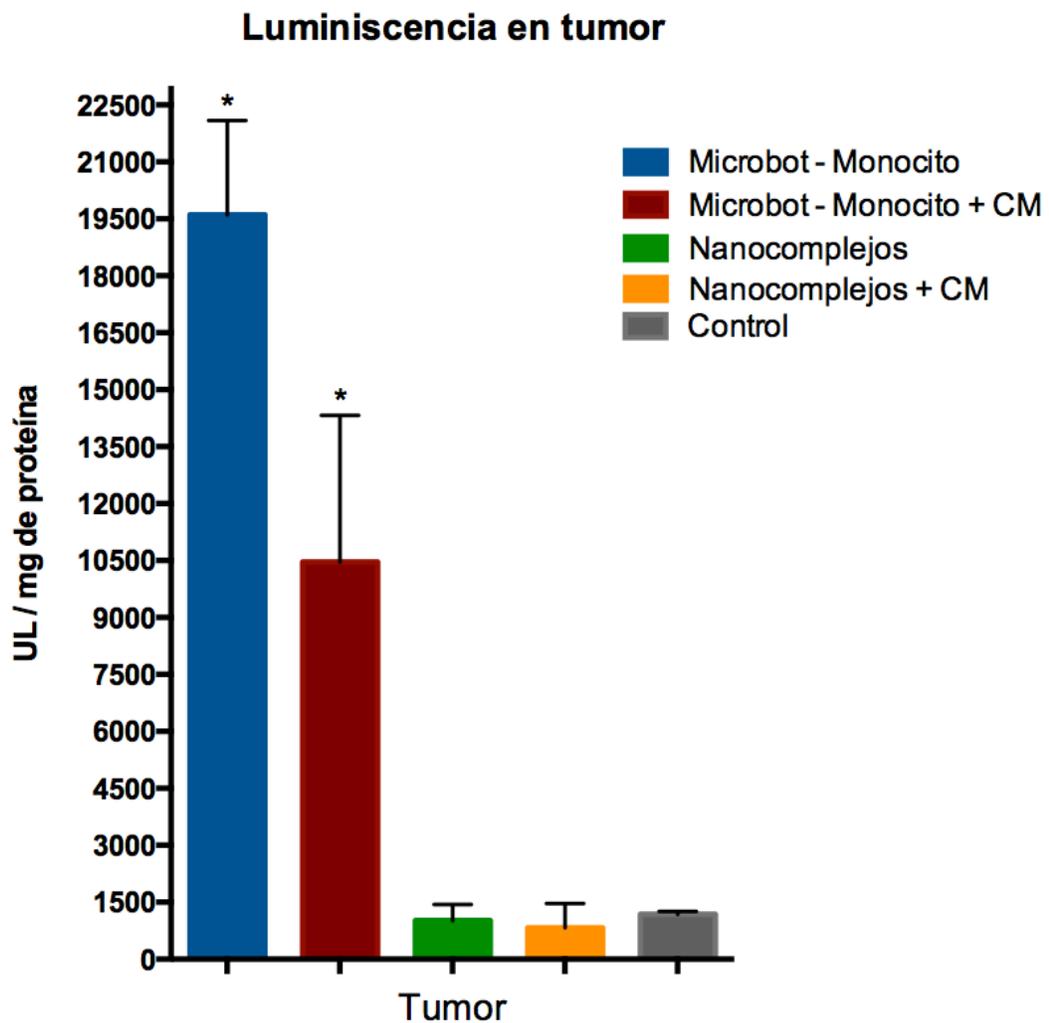


Figura 35. Luminiscencia de tumor de ratones inoculados con los diferentes tratamientos. Promedio de las mediciones (n=3). Barras de desviación estándar mostradas, 2way ANOVA, Tukey post ANOVA, *p<0.05.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se realizó una evaluación de un nuevo sistema de entrega específica de genes a tumor, tomando como modelo principal las células del sistema inmunológico, ya que como se sabe, una de las mayores barreras para cualquier terapia, es el sistema inmunológico y tomar células que puedan permitirles un paso libre a tumor.

Existen diversas células ya probadas como agentes de drug/gene delivery, tal es el caso de las células madre, en donde Huang y colaboradores en el 2013 usaron para hacer envío dirigido a tumores dentro de médula ósea gracias a la característica de estas células de “Homing”, sin embargo, tiene complicaciones implícitas, enviar una célula con un agente exógeno a una zona tumoral, es difícil, y más aún al considerar las interacciones que las células madre mantiene con el microambiente tumoral, puede diferenciarlas a células madre cancerígenas o en su defecto a alguna otra estirpe de célula que pueda favorecer al desarrollo del tumor.

También se ha probado el uso de linfocitos T citotóxicos para el envío dirigido, ya que estos tienen la capacidad de llegar a tumor y luchar contra él, sin embargo, se ha demostrado que pierden sus capacidades antitumorales una vez anclado algo a su membrana, y esto puede ser debido a la disposición de receptores en la membrana o a una señal de estrés celular que inactive ciertas cualidades de estas células (Stephan et al, 2010). Si bien el uso de linfocitos T infiltrantes de tumor se ha demostrado útil para estos sistemas acarreadores, también es cierto que atrae ciertas problemáticas como de manutención, producción a gran escala y también de replicación, ya que se necesitan condiciones altamente específicas para el correcto funcionamiento de estas células.

Algunas otras células no inmunitarias han sido probadas, tal es el caso de los eritrocitos, los cuales tienen la capacidad de migrar de manera pasiva al tumor, gracias a sus propiedades elásticas circulatorias, y claro, una ventaja más de obtención al ser las células más abundantes del cuerpo. Complicaciones pueden surgir de lo anterior, como

por ejemplo, una deformación en la membrana de estos y una posible expresión de fosfatidil serina al exterior, que puede ser interpretada como una señal “cómeme” para los macrófagos y por lo tanto disminuir su llegada a tumor, y esto en realidad hace mucho sentido, ya que al no tener ningún mecanismo de reparación esta célula es susceptible a cualquier tipo de estrés que su membrana pueda encontrar (Bhateria et al. 2010), sin embargo, el laboratorio ha sido capaz de lograr una llegada a tumor en cantidades interesantes sin hemólisis mecánica aparente.

Los monocitos y los macrófagos ya habían sido tomados en cuenta anteriormente para este tipo de sistemas de envío. Los macrófagos particularmente han sido utilizados para el envío de drogas encapsuladas en nanopartículas a tumor, mediante el proceso de fagocitosis el macrófago toma la terapia, y posteriormente la lleva con su capacidad migratoria por receptores quimiotácticos a tumor, si bien lo anterior es una muy buena idea, es importante considerar la liberación de este mismo y obviamente, la polarización final de estos macrófagos (Siwen Li et al. 2016).

Los monocitos ya se han utilizado para estudios *in vitro* de migración con drogas en su superficie, e inclusive obteniendo buenos resultados, tal es el caso de Sun Jung Park y colaboradores que en el 2015 lograron anclar en la membrana del monocito nanocomplejos que contenían nanopartículas PEG y un agente entrecruzante, haciéndolos migrar en un gel de agarosa de un punto A a un punto B, mediante un gradiente de quimiocinas. Lo interesante del trabajo anterior es que ellos utilizaron líneas celulares monocíticas, bien descritas y fenotipificadas, sin embargo, en su discusión, ellos hablan sobre la principal barrera de funcionalidad de este tipo de sistemas para pruebas *in vivo*, y es el HLA, ya que, un rechazo de HLA podría inducir al individuo de experimentación a un rechazo del tratamiento y a una fuerte respuesta inmunológica contra él, lo que lo puede llevar rápidamente a la muerte. Por lo anterior es que se decidió hacer un trasplante autólogo celular, en donde a ratones C57BL/6 se les extrajeron muestra sanguíneas para posterior obtención de monocitos.

Existen muchos métodos de obtención de células sanguíneas para cultivos primarios, por ejemplo, el método de separación por anticuerpos en columnas de perlas magnéticas, que es muy bueno y funcional, sin embargo, es muy caro en relación a otros métodos, principalmente comparándolo con el que nosotros utilizamos, que fue el gradiente de densidades. Probamos con diferentes agentes de densidades, como el ficoll, que tiene la capacidad de separar PBMCs y células polimorfo nucleares de los eritrocitos, con una gran capacidad, dependiendo la densidad que se utilice, sin embargo, el tener células polimorfo nucleares y mononucleares en cocultivo es complicado, ya que en el paso de selección de monocitos, es muy complicado generar la separación, ya que ambos tipos de células son adherentes, por lo que se decidió usar un agente que tuviera capacidad de separar ambos grupos, como el Polymorphoprep. Este agente tiene la capacidad de separar PBMCs de PMNCs y de los eritrocitos, en un doble anillo, lo que lo hace muy útil para nuestra investigación, ya que paso siguiente se siembran únicamente las PBMCs y se separan por adherencia, linfocitos como células no adherentes y a los monocitos como células adherentes.

Uno de los problemas más grandes con los que tuvimos que lidiar para esta investigación fue el estado de activación de las células, ya que al adherirse a la placa posterior a la separación de adherentes y no adherentes, enriqueciéndolas con 10% de SFB estas no duraban suficiente tiempo en un estado de liberación de citocinas M0, por lo cual consultando la literatura, encontramos que agregar 10% más de suero AB humano (Altex, 2012) facilitaba su proliferación y, las células logradas de esta proliferación no se adherían por completo y mantenían por 24 horas su estado M0.

La caracterización de células en un cultivo primario para tratamientos es fundamental, ya que muchas veces no se tiene la certeza de con que se está trabajando, sin embargo, para el caso de los monocitos, aparte de ser muy caro, es muy complicado porque son células que expresan una gran variedad de receptores de acuerdo al medio en el que se han cultivado, por lo tanto un método muy útil para diferenciarlos es el perfil de liberación de citocinas, que en realidad lo que hace, es discriminar entre células M0 que no libera citocinas, M0/M1 que liberan citocinas pro inflamatorias o M0/M2 que

liberan citocinas de freno para el sistema inmunológico (Sunderkötter C 2018). Como se observa en los resultados los monocitos mantuvieron un estado M0 durante el periodo de incubación con los nanocomplejos y los macrófagos que se utilizaron para el estudio, activados a partir de monocitos con lipopolisacárido, que corresponden a un estado de activación M1 o de macrófago activado por la vía clásica.

Los nanocomplejos que nosotros utilizamos fueron elaborados a base de quitosan, un agente derivado de la quitina de la corza de crustáceos, y en este caso, el tipo utilizado fue hidrosoluble, lo cual facilitó mucho su interacción con las células, ya que es estable a condiciones específicas que resultaron ser favorables para las células. Se han presentado reportes del uso de quitosan para nanocomplejos de drug delivery pero tiene a disminuir la viabilidad de las células, ya que para el uso de este es necesaria una hidrólisis con ácido acético, lo cual le cambia mucho sus características estructurales.

Las nanopartículas que se utilizaron para este trabajo son aprobadas por la FDA para imagenología, lo cual, con su cubierta de sílice, las hace óptimas para este tipo de ensayos en donde se les tiene que dar trazabilidad para conocer su llegada a distintos órganos y posibles bioacumulaciones en alguno de ellos, tal y como se denotó en los resultados.

El tamaño de los nanocomplejos fue de 229 nm lo cual lo hace beneficioso para nuestro trabajo, debido a que está reportado que los monocitos como tal no tienen la capacidad de fagocitar de primera instancia partículas de más de 120 nm, sin embargo, lo anterior es dependiente de tiempo y de dosis por eso se ajustaron estas características con los resultados del examen de capacidad de carga. La polaridad positiva de la superficie de los nanocomplejos se debe a la presencia de protones en el exterior de los extremos N- del quitosan, esto lo hace interactuar por carga con la membrana de la célula, pero aquí es en donde entra otra problemática del trabajo, que tanto pueden interactuar estos dos, ya que, al ser mediado por polaridades es muy importante tomar en cuenta que el potencial de membrana se puede ver alterado, y si es así, muchas

complicaciones se pueden dar para la célula, como por ejemplo una inducción a apoptosis.

Como se puede observar en el ensayo de capacidad de carga, el monocito en interacción con 50 μg de nanocomplejos se comporta más estable cuando en cantidad, se tiene 1×10^7 de ellos, y esto hace sentido, ya que en cuanto mayor sea el número de células, menos interacciones tendrán estas con los nanocomplejos y por lo tanto el potencial no se verá afectado, o se estabilizará. A menor concentración de células se puede observar cómo se compromete el potencial, ya que cuando se tienen 10,000 células en interacción con los nanocomplejos el potencial se va hacia el lado positivo drásticamente, lo que nos indica un compromiso alto de este. Es por lo anterior que en un principio se consideró trabajar con 1×10^7 células, sin embargo, obtener ese número de células implica sacrificar muchos animales, así que decidimos optar por el millón de células.

Para el caso de los macrófagos los resultados fueron muy interesantes, ya que, como podemos observar, el cambio de potencial a positivo, nos muestra una posible exposición del lado positivo de la membrana, lo que se puede traducir, según algunos expertos en un ensayo electroquímico de fagocitosis, lo cual tiene mucho sentido, tomando en cuenta que las células con las que se trabajó mantenían un estado de activación M1, y este al ser activado por vía clásica es principalmente fagocítico. El potencial al igual que en el de los monocitos, se estabilizó conforme el número de células fue aumentando, y por referencia tomamos el millón de células para la síntesis del microbot.

Los resultados in vivo nos muestran una realidad ya marcada por la literatura, en realidad, en casi cualquier libro de inmunología. El macrófago si bien tiene una capacidad migratoria por gradiente quimiotáctico “buena” va a responder ante cualquier estímulo inmunogénico, y como está ya bien descrito, el órgano por excelencia de filtraje del cuerpo es el hígado, por ende ahí es en donde debería de haber una cantidad interesante de estímulos inmunogénicos, pero hay algo más, si bien el hecho de que se

bioacumulan en tal cantidad en hígado los hace poco viables para un tipo de terapia antitumoral que el modelo no involucre una neoplasia hepática, puede ser en respuesta a las células que se tomaron como modelo para este estudio, ya que se conoce que las B16F10 son altamente metastásicas y que estas migran a hígado, bazo y pulmón sin la necesidad de generar un tumor sólido rápidamente, sin embargo, como se puede observar en la figura, no existe la misma correlación de bioacumulación con el microbot generado a partir de monocitos; cabe recalcar que los microbots trabajados en este estudio mantenían la influencia de un campo magnético y es por ello que es necesario evaluar la funcionalidad del microbot de macrófagos sin la influencia de este campo, aunque teóricamente tendría que tener menos capacidad quimiotáctica debido otra vez, a su alta capacidad de respuesta.

Evaluando la capacidad de llegada de los microbots sintetizados a partir de monocitos pudimos observar que cuando el microbot recibe el estímulo del campo magnético, al cual la nanopartícula magnética responde, este tiene la capacidad de no acumularse en tejidos no deseados, sin embargo, cuando este no se encuentra presente hay una bioacumulación considerable en hígado y en bazo, esto nos hace pensar en una inespecificidad, lo cual no es del todo incorrecto, pero una vez más Díaz et al, en el 2018 hicieron un tracking de células B16F10 mediante la adición de Quantum Dots a la membrana de las células, y pudieron corroborar que en 144 horas, las células migran de manera metastásicas a pulmón, hígado y bazo, por lo cual a este punto es muy complicado decir si en realidad, los microbots tienen una llegada inespecífica sin el estímulo del campo magnético, o si en realidad están siguiendo a células metastásicas que aún no generan un tumor sólido y por lo tanto es importante hacer un tracking de estos microbots en tiempo real para conocer su dirección en el periodo de 48 horas y poder evaluar parámetro que permitían indicar de manera fehaciente que está pasando con ellos.

Los nanocomplejos sin la biofuncionalización proporcionada por la célula no tiene la capacidad de llegar ni en una décima parte de lo que llega el tratamiento con la presencia de monocitos, por lo tanto, indica que el primer objetivo del trabajo se

cumplió, se construyó un mecanismo que aumentara la llegada a tumor y que aparte aumentara la biocompatibilidad del sistema.

Como se mencionó anteriormente, el control para este tipo de análisis, o la fluorescencia nata de los órganos fue utilizada como blanco para descartar valores influenciados por esta.

Para la evaluación de la expresión génica es importante considerar que, como se mencionó anteriormente, en este tipo de terapias es importante resguardar al agente (encapsulación eficiente) y mantener una liberación adecuada dentro del sistema, ya que de nada sirve una llegada eficiente si el acarreo de la terapia es ineficiente. El hecho de que en el ensayo de liberación bajo condiciones específicas se hubiera logrado solo un 30% de liberación del plásmido es algo realmente bueno, porque las condiciones del estudio no evalúan pH, temperatura, movimiento ni interacciones célula-célula, solo evalúan vibración constante y el desprendimiento que esta pueda tener, por lo tanto se esperaba que el sistema llegara a tumor en una buena concentración y específicamente ahí se liberará, ya que el agente reportero de este trabajo está diseñado para responder específicamente al microambiente tumoral. En cuestión de pH, se conoce que el microambiente tumoral mantiene un pH ácido facilitando de esta manera el desacople del nanocomplejo con la célula por un cambio conformacional en el quitosán. El sistema mantiene un plásmido que responde a la hipoxia, la cual es una característica fisicoquímica muy importante del microambiente, ya que este permite la manutención de la región interna del tumor, la región necrótica, es por eso que una vez llegada a la región de normoxia el plásmido por cuestiones de pH e interacciones célula-célula se desacoplaría, ingresando a la región de hipoxia, y activándose el promotor que contiene seis elementos que responden a la proteína HIF-1alfa o proteína inductora de hipoxia, transcribiendo así el gen de la luciferasa, y posterior generación de la proteína, y mediante un ensayo de luciferasa/luciferina se pudiera medir la luminiscencia del gen reportero.

Los resultados de la evaluación de la expresión génica arrojan resultados que, si bien eran esperados, son un punto muy grande a considerar. Cuando el microbot llega mediante la influencia del campo magnético la expresión génica disminuye considerablemente, a la mitad, , sin embargo la literatura marca que debería ser lo contrario, ya que en presencia del imán, las células adoptan el plásmido por medio de magnetofección y de esta manera expresaría el plásmido en mayor medida, pero al parecer aquí ocurre algo más que con los resultados obtenidos es casi imposible de explicar, ya que sin la presencia del campo magnético la expresión del gen aumenta, ya que la luminiscencia aumenta al doble. Se puede pensar que el campo electromagnético podría estar afectando al monocito y probablemente limite su llegada y posteriormente fagocite al nanocomplejo y por lo tanto no se libere, entonces eso en realidad compromete la efectividad del sistema, ya que si bien, la fagocitosis le permite a la terapia llegar intacta liberarla en la zona tumoral es una tarea muy compleja (Siwen Li et al. 2016).

Es muy importante mencionar que este sistema de envío resultó ser efectivo, tanto con la influencia del imán como sin la influencia de este, sin embargo, hay que indagar en los posibles efectos del campo magnético sobre la función quimiotáctica del monocito, ya que en un ensayo post-tratamiento de citocinas circulantes, podemos ver un decremento considerable en MCP-1 en el grupo influido por el campo magnético, y en el que no mantiene influencia de este, aumenta MCP-1 de manera muy considerable, siendo benéfico para el sistema, ya que esta quimiocina tiene la capacidad de promover la diferenciación de monoblastos y la producción de monocitos, así como el reclutamiento de estos en zonas inflamadas, en general, podríamos decir que el sistema mantiene una red de auto estímulos que le permiten continuar llegando y funcionando. En el ensayo de citocinas no se muestra un perfil de inflamación sistémica por lo que es viable pensar que no se compromete la funcionalidad del organismo, por lo tanto, la vida del modelo.

IX. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método para la obtención de monocitos viables, además de su remanencia en un estado inactivado que favorece a su uso para terapias o sistemas de envío.

Se desarrollaron nanocomplejos a partir de nanopartículas magnéticas fluorescentes, quitosán y pDNA para reportar la llegada del sistema en cuestión, que posteriormente, pueden ser modificados para contener genes terapéuticos.

Se estableció una combinación adecuada de monocitos y nanocomplejos para elaborar microbots sin afectar la célula ni modificar su carga superficial.

Se estableció una combinación adecuada de macrófagos y nanocomplejos para elaborar microbots sin afectar la célula ni modificar su carga superficial.

El microbot construido a partir de macrófagos puede ser útil para tumores sólidos hepáticos, debido a su alta bioacumulación en él.

El microbot construido con monocitos demostró que es capaz de dirigirse y localizarse efectivamente en un tumor sólido.

El microbot construido con monocitos fue capaz de dirigir selectivamente la expresión de un gen exógeno en un tumor sólido.

El microbot está diseñado con componentes biocompatibles y no tóxicos que le confieren un amplio potencial para su aplicación en humanos.

El microbot prototipo diseñado en el presente estudio puede representar una nueva alternativa para el envío dirigido de genes a tumores.

X. PERSPECTIVAS

Los monocitos resultaron ser efectivos como agente acarreador de nanopartículas magnéticas para el envío dirigido a tumor, pero, es importante tomar en cuenta que existen puntos que requieren ser investigados más a fondo.

El microambiente tumoral es un sitio de gran importancia en cuanto a terapias refiere y el uso de este promotor que responde a hipoxia sugeriría que se podría evaluar una terapia génica dirigida contra células en la región de hipoxia, utilizando secuencias que codifiquen para proteínas pro-apoptóticas, aumentando la especificidad de la terapia.

La llegada de monocitos al microambiente tumoral podría significar un cambio importante en cuanto al estado de inflamación tumoral, ya que, el estado de M0 monocítico favorece a la sensibilidad de respuesta a estímulos pro inflamatorios. Suponiendo que los monocitos se polarizan a macrófagos M1 por la influencia de las citocinas pro-inflamatorias, esta terapia favorecería el estado inmunológico antitumoral, generando una especie de inmunoterapia. La presencia de MCP-1 en altas cantidades en la medición de citocinas periféricas post-tratamiento sugiere que la cantidad de células M0 que está siendo reclutada a tumor es alta, y por lo tanto la polarización a M1 tendría un efecto muy positivo para el objeto de estudio. Aunado a lo anterior, caracterizar el efecto real de la terapia en el microambiente tumoral, es un punto muy importante a evaluar.

Sería muy interesante evaluar el efecto conjunto de dos sistemas de microbots que el laboratorio posee hoy en día, el uso de microbots basados en bifidobacterias como agente de llegada específica, y el uso de microbots basados en monocitos que, aparte de ser un agente de llegada específica, es una célula del sistema inmunológico que podría generar una reacción inflamatoria en presencia de las bifidobacterias para potenciar la polarización de macrófagos a su estado fagocítico M1.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Aaron C. Anselmo, Samir Mitragotri. 2014. Cell-Mediated Delivery of Nanoparticles: Taking Advantage of Circulatory Cells to Target Nanoparticles. *Journal of Controlled release* 1-28.

Alessandro Parodi, et al. 2012. Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions. *Nature Nanotechnology* 8; 61-69.

AMERICAN CANCER SOCIETY. 2017. Cáncer. American Cancer Society, [Online]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>.

Apoorv Gupta, et al. 2012. Encapsulated Fusion Protein Confers "Sense and Respond" Activity to Chitosan-Alginate Capsules to Manipulate Bacterial Quorum Sensing. *Biotechnology and Bioengineering* 110;552-562

Avelino Fraga, Ricardo Ribeiro y Rui Mederos. 2009. Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urológicas Españolas* 9;33.

Benyettou F, Lalatone Y, Sainte-Catherine O, Monteil M, Motte L. 2009. Supramagnetic nanovector with anti-cancer properties: gamma Fe₂O₃ Zoledronate. *Int J Pharm* 379;324-327.

Brahim R. Khalil, et al. 2017. Bacterial-Derived Polymer Poly- γ -Glutamic Acid (γ -PGA)-Based Micro/Nanoparticles as a Delivery System for Antimicrobials and Other Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Science* 18;313.

Brian T. Luk, et al. 2016. Safe and Immunocompatible Nanocarriers Cloaked in RBC Membranes for Drug Delivery to Treat Solid Tumors. *Theranostics* 6;1001-1008.

Cancer Health Center. 2014. Cancer Overview. 2014, de webMD Disponible en: <http://www.webmd.com/cancer/default.htm>.

Chai Z, Hu X. 2017. Membrane-Coated Nanoparticles. *Theranostics* 6;1012-1022

Chao Wang, Xiaoqi Sun, Liang Cheng, Shengnan Yin, Guangbao Yang, Yonggang Li, and Zhuang Liu. 2014. Multifunctional Theranostic Red Blood Cells For Magnetic- Field-Enhanced in vivo Combination Therapy of Cancer. *Advanced Materials* 1-9.

Chao-Ming Hung, et al. 2017. Cyclophosphamide promotes breast cancer cell migration through CXCR4 and matrix metalloproteinases. *Cell Biology International* 41; 345–352.

Quail D, Joyce J. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature* 19;1423-1437.

Diana C Doeing, Jessica L Borowicz and Elahé T Crockett. 2003. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clinical Pathology* 3;6.

Elaztahry AA, Eldin MSM, Soliman E, Hassan EA. 2009. Evaluation of alginate-chitosan bioadhesive beads as a drug delivery system for the controlled release of theophylline 5;2452-2459.

Elizabeth C. Finger & Amato J. Giaccia. 2009. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastases* 29;285–293.

Elvin Blanco, et al. 2015. principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology* 33;941-952.

Emily K. Curran, et al. 2017. Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. *CellPress* 38;513-525.

Eomolbanin Ebrahimi, et al. 2014. Novel drug delivery system based on doxorubicin-encapsulated magnetic nanoparticles modified with PLGA-PEG1000 copolymer. *Informa Health Care* ;1-8

Fabienne Danhier, et al. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148; 135-146. 20.

Ochoa-Carrillo, Bravo-Cuellar. 2013. Los macrófagos, ángeles o demonios. *GAMO* 12;1-3.

Gang Chen, Jun-Yi Zhu, Zhi-Ling Zhang, Wei Zhang, et al. (2014). Transformation of Cell-Derived Microparticles into Quantum-Dot- Labeled Nanovectors for Antitumor siRNA Delivery. *Traceable Biogenic Nanovectors*, 126, 1 – 6.

H. Lee, et al. 2006. Antibiofouling polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging, *Journal of the American Chemical Society* 128;22,7383–7389.

Hao Zhou, et al. (2014). A Facile Approach to Functionalize Cell. *Rsc Advances* 4;32570-32578.

J. Kristl, et al. 2003. Interactions of solid lipid nanoparticles with model membranes and leukocytes studied by EPR. *International Journal of Pharmaceutics* 253;133–140.

Jacob S. Brenner, et al. 2018. Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude. *Nature* 9:2684, 1-14.

JAN BUBENIK. 2004. MHC class I down-regulation: Tumour escape from immune surveillance. *International Journal of Oncology* 25;487-491.

Javier Mestas and Christopher C. W. Hughes. 2018. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The journal of immunology* 172; 2731-2738.

Jim Klostergaard, Charles E. Seeney. 2012. Magnetic nanovectors for drug delivery. *Nanomedicine* 8;14.

Junjie Wu and David J Waxman. (2015). Metronomic cyclophosphamide eradicates large implanted GL261 gliomas by activating antitumor Cd8C T-cell responses and immune memory. *Oncoimmunology* 4;13.

Larysa Baraban, et al. 2013. Chemotactic Behavior of Catalytic Motors in Microfluidic Channels. *Angewandte communications*, 52;5552 –5556.

Lewis CE, Pollard JW. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66;605–12.

Liang Pang, et al. 2017. A novel strategy to achieve effective drug delivery: exploit cells as carrier combined with nanoparticles. *Drug Delivery* 24;83-9.

Liu, W. T, et al. 2015. Facile and simple preparation of pH-sensitive chitosan-mesoporous silica nanoparticles for future breast cancer treatment. *Express Polymer Letters*. 9;1068-1075

Correa MA, Rojas López MA. 2007. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, 26;73-86.

Maonan Wang, et al. 2016. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8;761-774.

Maria Guix, et al. 2014. Nano/Micromotors in (Bio)chemical Science Applications. *Chemical reviews*, 114;6285–6322.

Matthias T. Stephan, et al. 2010. Therapeutic cell engineering using surface-conjugated synthetic nanoparticles. *HHS Public Access*, 16(9); 1035–1041.

Metz T, Jones ML, Chen HM, et al. 2005. A new method for targeted drug delivery using polymeric microcapsules. *Cell Biochem Biophysics*, 43;77-85.

Nanotecnología de Chile. 2015. Nanotecnología. [Nanotecnologia.cl](http://www.nanotecnologia.cl). Disponible en: <http://www.nanotecnologia.cl/que-es-nanotecnologia/>.

Noelia A-Gonzalez, et al. 2017. Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*;16.

Oleg Lunov, et al. 2011. Modeling receptor-mediated endocytosis of polymer-functionalized iron oxide nanoparticles by human macrophages. *Biomaterials*, 32;547-555.

Parichehr Hassanzadeh, Isobel Fullwood, Sharmila Sothi and David Aldulaimi. 2011. Cancer nanotechnology. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench* 4;63-69.

Penberthy TW, Jiang Y, Graves DT. 1997. Leukocyte adhesion molecules. *Biol Med* 8;380–8.

Ramadas M, Paul W, Dileep KJ. 2000. Lipoinsulin encapsulated alginate-chitosan capsules: Intestinal delivery in diabetic rats. *J Microencapsule*, 17;405-411.

Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne MC, et al. 2011. The potential of combinations of drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells for glioma therapy. *Biomaterials* 32;2106–16.

S. Vimal. 2012. Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish. *Aquaculture*;14-22.

Saji Uthaman, et al. 2014. Polysaccharide-Coated Magnetic Nanoparticles for Imaging and Gene Therapy. *BioMed Research International*.

Sato K, Hoshina S, Anzai J. 2012. Preparation of polyelectrolyte giant capsules using cross-linked alginate gels as core material. *Polym bull* 68;891-900.

Satoshi Wada, et al. 2009. Cyclophosphamide Augments Antitumor Immunity: Studies in an Autochthonous Prostate Cancer Model. *Cancer Research*; 69, 10.

Siwen li, et al. 2016. Nanomedicine engulfed by macrophages for targeted tumor therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 11;4107–4124.

Steven A. Rosenberg. 2008. adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature*; 8, 10

Sung Jun Park, et al. 2014. Monocyte-Based Microrobot With Chemotactic Motility for Tumor Theragnosis. *Wiley Periodicals*, 111;2132-2138.

Sylvain Martel et al.(2012. Journey to the center of a tumor. *ieee spectrum*, 49-53

Takashi Nakamura y Hideyoshi Harashima. 2017. Integration of nano drug-delivery system with cancer immunotherapy. *Therapeutic Delivery*, 8(11);987–1000.

Tang, H et al. 2011. Facile synthesis of pH sensitive polymer-coated mesoporous silica nanoparticles and their application in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 421;388- 396.

Tang, H. et al. 2011. Facile synthesis of pH sensitive polymer-coated mesoporous silica nanoparticles and their application in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 421;388- 396.

Theerawut Chanmee , Pawared Ontong , Kenjiro Konno, Naoki Itano. 2014. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers*, 6; 1670-1690.

Thorsten Hagemann, et al. 2009. Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF- B. *Blood*, 113;3139-3146.

Víctor Manuel Díaz-garcía, et al. 2018. Biomimetic quantum dot-labeled B16F10 murine melanoma cells as a tool to monitor early steps of lung metastasis by in vivo imaging. *International Journal of Nanomedicine*, 18;6391–6412.

Vivek Agrahari, Vibhuti Agrahari & Ashim K. Mitra. 2016. Next generation drug delivery: circulatory cells- mediated nanotherapeutic approaches. *Expert Opinion*, 14:3;285-289.

Wassef Khaled, et al. 2018. In Vitro Distinction Between Proinflammatory and Antiinflammatory Macrophages With Gadolinium-Liposomes and Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles at 3.0T. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*; 8.

Xiaoyuan Miao, et al. 2017. The Current State of Nanoparticle-Induced Macrophage Polarization and Reprogramming Research. *International Journal of Molecular Science*; 18, 13.

Yareli Rojas-Aguirre, Karina Aguado-Castrejón e Israel González-Méndez. 2016. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?. *Educación química UNAM*, 27;286-291.

Yixue Su, et al. 2015. Design Strategies and Applications of Circulating Cell-Mediated Drug Delivery Systems. *ACS bioscience, biomaterials and bioengineering*,; 17.

Yong-HS, Wei GF. 2004. Hypoxia-inductible factor-1 in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterology*. 10;1082-7

Zander R, Vaupel P. 1985. Proposal for using standardized terminology on oxygen transport to tissue. *Adv Exp Med Biol*. 191;965-70.

Zhiwei Xie, et al. 2017. Immune Cell-Mediated Biodegradable Theranostic Nanoparticles for Melanoma Targeting and Drug Delivery. *Advanced Science News*, 160;31-21

RESUMEN BIOGRÁFICO

Rafael de la Hoz Camacho

Candidato para el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: USO DE MONOCITOS COMO ACARREADORES DE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS, ACOMPLEJADAS CON QUITOSÁN/ADN PARA EL
ENVÍO DIRIGIDO A TUMOR

Campo de estudio: Nanomedicina

Datos Personales: Nacido en Martínez de la Torre, Veracruz el 11 de julio de 1994, hijo de Rafael de la Hoz Torres y Claudia Camacho Pérez.

Educación: Egresado de la Universidad de las Américas Puebla, grado obtenido de Licenciado en Bioquímica Clínica en 2017.

Experiencia profesional: Químico analista de laboratorio en Clínica Ruiz Puebla del 2015 a 2016.