

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Emérito Dr. Rodolfo R. Brenner

Transferencia génica asistida por campos magnéticos: Estudios en células gliales

*Magnetic field-assisted gene transfer:
Studies in glial cells*

*Transferência gênica assistida por campos
magnéticos: Estudos em células gliais*

► Joaquín Pardo^{1a*}, Yolanda Elena Sosa^{2a*}, Paula Cecilia Reggiani^{3a},
Magda Lorena Arciniegas^{4b}, Francisco Homero Sánchez^{5b}, Rodolfo Gustavo Goya^{6a}

1. Bioquímico.

2. Profesional Históloga.

3. Dra. de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

4. Ingeniera Física.

5. Dr. en Física.

6. Dr. en Bioquímica.

^a INIBIOLP-Cátedras de Histología B y Patología B, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

^b Instituto de Física, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina.

* Estos dos autores contribuyeron en igual medida a este trabajo.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

Las nanopartículas magnéticas (MNP) complejadas con vectores génicos pueden, en presencia de un campo magnético externo, amplificar sustancialmente la eficiencia de la transferencia génica. Esta técnica, denominada magnetofección, es de gran interés en el campo de la terapia génica. En este estudio se caracterizó la mejora de transferencia génica en células gliales B92 utilizando complejos constituidos por diferentes proporciones de MNP asociadas a dos vectores adenovirales, a saber: los complejos entre las MNP denominadas PEI-Mag2 asociadas al adenovector RAd-GFP que expresa la proteína fluorescente verde GFP o al adenovector RAd-DsRed que expresa la proteína fluorescente roja DsRed2. Se demostró que para ambos vectores, a medida que la relación MNP/partícula viral física (PVF) va aumentando, la amplificación de la transfección también aumenta hasta que se llega a una relación MNP/PVF a partir de la cual el factor de amplificación alcanza un *plateau*. Se determinó que para el complejo PEI-Mag2/RAd-GFP la relación a partir de la cual se alcanza el *plateau* es de aproximadamente 0,5 fg Fe/PVF mientras que para el complejo PEI-Mag2/RAd-DsRed, esta relación corresponde a aproximadamente 71 fg Fe/PVF. Se concluye que los dos complejos magnéticos estudiados representan promisorias herramientas para mejorar la eficiencia en la terapia génica en células cerebrales.

Palabras clave: nanotecnología * nanopartículas magnéticas * adenovectores * terapia génica * magnetofección * sistema nervioso * glia * proteína fluorescente verde * proteína fluorescente roja

Summary

It is known that certain types of magnetic nanoparticles (MNPs) complexed to gene vectors can, in the presence of an external magnetic field, greatly enhance gene transfer into cells. This technique, called magnetofection, is of great relevance to gene therapy. In the present study the ability of

MNP/adenovector complexes to enhance gene transfer to B92 glial cells was assessed. Two complexes were assessed, namely PEI-Mag2/RAd-GFP and PEI-Mag2/RAd-DsRed, which are constituted by the MNP PEI-Mag2 complexed to the adenovector RAd-GFP (expressing the green fluorescent protein GFP) and RAd-DsRed (expressing the red fluorescent protein DsRed2), respectively. It was shown that for both vectors, an increase in the ratio MNP/PVP (physical viral particle) is paralleled by an increase in transduction efficiency, up to a certain threshold value at which an efficiency plateau is reached. This threshold value was 0.5 fg Fe/PVP for the RAd-GFP complex and about 71 fg Fe/PVP for the RAd-DsRed complex. It can be concluded that both magnetic complexes assessed in this study represent promising tools for enhancing the efficiency of gene therapy in brain cells.

Key words: nanotechnology * magnetic nanoparticles * adenovectors * gene therapy * magnetofection * nervous system * glia * green fluorescent protein * red fluorescent protein

Resumo

As nanopartículas magnéticas (MNPs) complexadas com vetores de genes podem, em presença de um campo magnético externo, aumentar consideravelmente a eficiência da transferência gênica. Esta técnica, chamada magnetofecção, é de grande relevância para a terapia genética. No presente estudo, foi caracterizada a melhoria de transferência de genes em células gliais B92 utilizando complexos constituídos por diferentes proporções de MNP associadas a dois vetores adenovirais, a saber: os complexos entre as MNP denominadas PEI-Mag2 associadas ao adenovector RAd-GFP que expressa a proteína fluorescente verde GFP ou ao adenovector RAd-DsRed que expressa a proteína fluorescente vermelha DsRed2. Foi demonstrado que para ambos os vetores, enquanto a relação MNP/partícula viral física (PVF) vai aumentando, a amplificação da transfecção também aumenta até que se chega a uma relação MNP/PVF a partir da qual o fator de amplificação alcança um limiar. Determinou-se que para o complexo PEI-Mag2/RAd-GFP a relação a partir da qual se atinge o limiar é de aproximadamente 0,5 fg Fe/PVF ao passo que para o complexo PEI-Mag2/RAd-DsRed, esta relação corresponde a aproximadamente 71 fg Fe/PVF. Conclui-se que os dois complexos magnéticos estudados representam promissoras ferramentas para melhorar a eficiência na terapia de genes em células cerebrais.

Palavras-chave: nanotecnologia * nanopartículas magnéticas * adenovetores * geneterapia * magnetofecção * sistema nervoso * glia * proteína fluorescente verde * proteína fluorescente vermelha

Introducción

La terapia génica en el sistema nervioso central (SNC) constituye un particular desafío tecnológico debido a la relativa inaccesibilidad del cerebro y la médula espinal, y a la extraordinaria complejidad de las estructuras nerviosas centrales. Por otra parte, esta estrategia terapéutica ofrece ventajas únicas para la expresión prolongada de moléculas neuroprotectoras en regiones específicas del SNC afectadas por procesos degenerativos.

A pesar de que los resultados documentados sobre la terapia génica para factores neurotróficos en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas son prometedores (1)(2), hasta ahora la única forma de administrar estos factores es mediante la inyección de los vectores génicos por vía estereotáxica directamente en las áreas blanco del cerebro. La invasividad de este procedimiento limita significativamente su eventual implementación en pacientes humanos. Una posible vía para superar este problema surge de la asociación de la transferencia génica con la nanotecnología, combinación que ofrece ahora la posibilidad de desarrollar estrategias de terapia génica intracerebral de alta eficiencia e invasividad mínima.

Este abordaje combina al Direccionamiento Magnético de Drogas (MDT, *magnetic drug targeting*) con la magnetofección, dos tecnologías emergentes basadas en el uso de nanopartículas magnéticas (MNP). El propósito de la MDT es el de concentrar nanocomplejos terapéuticos magnéticos en regiones precisas del organismo por medio de campos magnéticos externos. Hasta ahora la principal aplicación de la MDT ha sido la terapia oncológica. Típicamente, se utilizan MNP funcionalizadas con compuestos terapéuticos, las cuales son inyectadas en una de las arterias que irrigan al tumor, concentrándolas en la región blanco por medio de un campo magnético externo. Esta estrategia ha alcanzado resultados promisorios en ensayos clínicos (3-5) aunque debe señalarse la ausencia de estudios clínicos publicados en años recientes. También se han utilizado transportadores (*carriers*) magnéticos para direccionar drogas citotóxicas (doxorubicina) en sarcomas implantados en la cola de rata (6). Los resultados iniciales fueron alentadores ya que se observó una total remisión de los tumores en contraste con ratas inyectadas con 10 veces la dosis de doxorubicina sin *carrier*, en las que no se observó remisión. Posteriormente a este estudio, hubo publicaciones adicionales documentando el éxito en la aplicación direccionada de drogas ci-

totóxicas en el tratamiento de modelos animales como el cerdo (7) (8), el conejo (9) y la rata (10-12).

Por su parte, la magnetofección es una metodología desarrollada a principios de la década del 2000 por el grupo liderado por Christian Plank en Munich (13) (14). Esta técnica se basa en la asociación de MNP con vectores virales o no virales con el objeto de optimizar la transferencia génica en presencia de un campo magnético. De este modo, el grupo alemán pudo desarrollar nanocomplejos magnéticos no virales capaces de alcanzar altas eficiencias en la transferencia génica por magnetofección en cultivos celulares (15). El mismo grupo logró desarrollar nanocomplejos magnéticos que mejoran sustancialmente la eficiencia de transferencia génica mediada por vectores adenovirales (16). Recientemente se ha descrito la implementación exitosa de magnetofección en el cerebro fetal. En este estudio se utilizaron complejos de adenovectores con MNP que se inyectaron intracerebro-ventricularmente (ICV) en fetos de ratón en presencia de un campo magnético externo unilateral. Al final de la preñez se observó que se había logrado una expresión significativa del transgén (beta galactosidasa) en las células endoteliales del hemisferio cerebral que fue expuesto al campo (generado por un pequeño imán externo) mientras que en el hemisferio no expuesto la expresión transgénica fue despreciable (8). En el presente estudio se abordó la implementación de magnetofección en cultivos de células gliales B92 de rata empleando dos vectores adenovirales construidos en el laboratorio de los autores y MNP provistas por el grupo de Christian Plank en Munich.

Materiales y Métodos

VECTORES ADENOVIRALES RECOMBINANTES (RAD)

RAAd-GFP. Este adenovector expresa el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequorea victoria* bajo el control del promotor del citomegalovirus murino (mCMV), poseyendo aguas abajo del transgén la señal de poliadenilación del Simian Virus 40 (Fig. 1A).

RAAd-DsRed2. Este adenovector expresa el gen de la proteína fluorescente roja (DsRed2) de *Discosoma sp.* bajo el control del promotor del mCMV, poseyendo aguas abajo del transgén, la señal de poliadenilación del Simian Virus 40 (Fig. 1B).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES FÍSICAS

La titulación de RAAd-GFP y RAAd-DsRed se realizó por duplicado a una dilución 1/10 de la muestra del virus en 0,1% de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) en PBS (*buffer* fosfato-salina), utilizando la misma dilución del *buffer* de diálisis en 0,1% de SDS como control. La mezcla se homogeneizó con *vortex* y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos. Se determinó la densidad óptica del sobrenadante a 260 nm y a 280 nm. La relación DO_{260}/DO_{280} debía encontrarse en el rango de 1.3–1.6. Se calculó así la concentración de partículas virales físicas (PVF) a partir de la densidad óptica DO_{260} utilizando la siguiente ecuación:

$$PV/mL = (OD_{260} - OD_{320}) \times \text{factor de dilución} / 9,09 \cdot 10^{-13}$$

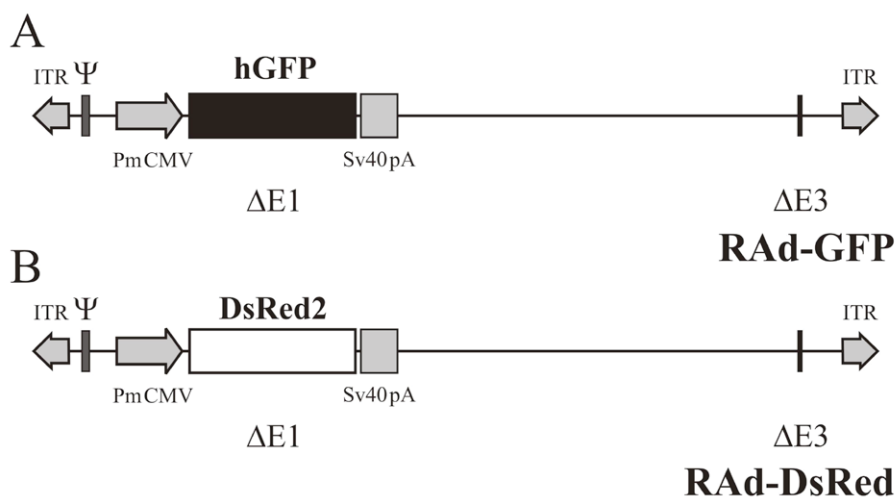


Figura 1. Estructura genética de los vectores adenovirales recombinantes (RAD) utilizados. (A) RAAd-GFP: Adenovector portador del gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequorea victoria*. (B), RAAd-DsRed: Adenovector portador del gen que codifica para la proteína fluorescente roja DsRed2 de *Discosoma sp.* Referencias: PmCMV, Promotor del citomegalovirus murino; ITR, terminales repetidos invertidos; ΔE1 y ΔE3, deleciones de los genes E1 y E3 en el genoma del Ad 5; SV40, señal de poliadenilación del Virus Simian 40; ψ, señal de empaquetamiento.

donde $9,09 \cdot 10^{-13}$ es el coeficiente de extinción para el adenovirus de tipo salvaje.

FORMULACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS UTILIZADAS

Inicialmente se evaluaron dos formulaciones: PB-Mag1-4 y PEI-Mag2. Las principales características físicas de las preparaciones se indican en la Tabla I. En base al número N de nanopartículas por partícula viral física (PVF) que se determinó para la relación de 1 fg Fe/PVP, se estimaron los diámetros de los complejos, que van desde 229 nm (relación 0,05) hasta 613 nm (relación 1,00). Datos no mostrados

APLICADOR DE CAMPO MAGNÉTICO PARA CÉLULAS EN CULTIVO

Se utilizó una placa magnética comercial (Oz Biosciences, Marsella, Francia) del tamaño de una microplaca estándar de ELISA. Esta consiste en un arreglo de magnetos permanentes con forma rectangular, de Nd-Fe-B (magneto de neodimio) dispuestos en una orientación paralela alternante. Esta placa produce una densidad de flujo magnético máxima de aproximadamente 0,3 T y gradientes de campo magnético en el rango de 67 a 123 T/m a una distancia de 2 mm para la superficie de los magnetos individuales, la cual es aproximadamente la posición donde las células estarán ubicadas. Esta inducción magnética lleva aproximadamente a 80% de saturación de las nanopartículas, si éstas son de magnetita de alta pureza, requiriéndose una inducción de 0,5-0,6 T para que la saturación sea completa.

PROTOCOLO DE MAGNETOFECCIÓN EN CULTIVOS CELULARES

La línea celular B92 (glial de tejido nervioso de rata) se cultivó en medio MEM (*Minimum Essential Medium*), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U de penicilina/mL, 0,1 mg de estreptomina/mL, y 0,25 µg de anfotericina B/mL; y se mantuvo a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Para el recuento celular se utilizó el método de recuento en cámara de Neubauer.

Para esto, partiendo de una botella con células B92 al 90% de confluencia, se procedió a realizar dos lavados con PBS. Posteriormente se añadieron 3 mL de solución cítrico salina (10 g/L de KCl, 4,4 g/L de citrato de sodio, estéril, conservada a 4 °C). Se incubó en cámara de cultivo hasta desprendimiento completo de la monocapa. Se agregaron 4 mL de PBS. Se tomaron 100 µL de la suspensión celular en PBS, y se agregaron 100 µL de Azul tripán (Trypan Blue, SIGMA). Se contaron por triplicado las células viables contenidas en los retículos de la cámara y en base a esa cantidad se hicieron los cálculos correspondientes para obtener el número de células viables por mL.

Las células B92 se sembraron (750.000 por mL) en placas de 12 pocillos hasta una confluencia del 80% en medio MEM conteniendo 10% de SFB y antibióticos. Los cultivos se incubaron entonces con complejos adenovirales magnéticos generados mezclando diferentes proporciones de MNP y adenovector. Inmediatamente después del agregado de los complejos magnéticos a los cultivos, éstos se sometieron a una densidad de flujo magnético de unos 0,3 T (generado por el aplicador anteriormente descrito) durante 30 min, continuándose luego con una incubación estandar a 37 °C y 5% CO₂ durante 48 h. La expresión de DsRed2 y GFP se siguió en las células vivas por microscopía de fluorescencia con un microscopio invertido. En el caso de las células magnetofectadas con el complejo que contenía RAd-GFP, la expresión de GFP se cuantificó por medición de fluorescencia en los correspondientes lisados celulares. Para este fin, se aspiró el sobrenadante celular, procediéndose después a lisar las células. Los lisados se transfirieron a placas de NUNC (96 Well Plate PS Optical Btm Polymer Base Non-Treated NS w/o Lid Blk. Nunc Code: 265301) de 96 pocillos con fondo óptico a fin de medir la fluorescencia en un lector de placas Beckman Coulter® DTX 880 Multimode Detector. Este procedimiento permitió determinar la relación MNP/RAd óptima.

Tabla I. Características de las nanopartículas magnéticas utilizadas en este estudio.

Nanopartículas magnéticas*	Composición del núcleo	Tamaño promedio del cristal de magnetita <d>(nm)	Saturación de la magnetización del núcleo M _s (emu/g hierro)	Diámetro hidrodinámico promedio D (nm)	Potencial electrocinético en el agua ε (mV)	Contenido de Hierro (g Fe / g peso seco)
PEI-Mag2	Magnetite	9	62	28 ± 2	+ 55,4 ± 1.6	0,56
PB-Mag1-4	Magnetite	12	73	64 ± 10	+41,3 ± 3.2	0,47

* Provistas por los Dres. Christian Plank y Olga Mykhaylyk, Universidad de Munich, Alemania.

Resultados

Las dos clases de MNP evaluadas mostraron una buena *performance in vitro* pero las recubiertas con polietilenimina (PEI-Mag2) fueron más efectivas *in vivo* que las PB-Mag 1-4, que están recubiertas con polibreno (resultados no mostrados). Por esta razón se focalizó la caracterización *in vitro* en el uso de las PEI-Mag2. La magnetofección con complejos PEI-Mag2/RAd-GFP mostró un máximo a una relación de 0,5 fg Fe/PVF, lo cual se evidenció a través de la comparación cualitativa de microfotografías correspondientes a una dosis subóptima de vector desnudo con imágenes correspondientes a diferentes relaciones MNP/vector en los complejos magnéticos (Fig. 2 A y B, Fig. 4), así como de la cuantificación de la fluorescencia intracelular de la GFP transgénica (Fig. 3). Los complejos PEI-Mag2/RAd-GFP mostraron una *performance* máxima que se mantuvo constante hasta al menos 12,5 fg Fe/PVF (Fig. 5). Con el complejo PEI-Mag2/RAd-DsRed también pudo evidenciarse un claro efecto de amplificación de la capacidad de transfección a través del análisis cualitativo de microfotografías 48 h post agregado del vector al cultivo celular (Fig. 2 C y D). La amplificación máxima de la capacidad de transfección (complejo /virus desnudo) que se registró en el presente estudio fue de 5,1 para PEI-Mag2/RAd-GFP a una relación MNP/vector de 0,5 fg Fe /PVF (Fig. 3).

Discusión y Conclusiones

El presente estudio confirma la notable propiedad de la magnetofección de incrementar la capacidad de

transducción de los vectores adenovirales. Se piensa que este fenómeno se debe en parte a que la sedimentación de los complejos magnéticos inducida por el campo genera una elevada concentración local de viriones en torno de las células adheridas al fondo de la placa de cultivo (17). Existe, sin embargo, creciente evidencia de que los complejos MNP/vector viral favorecen la internalización del vector a través de mecanismos independientes de los receptores celulares al adenovirus (18). Una línea de evidencia que apoya esta hipótesis es que la magnetofección con complejos MNP-adenovector permite la eficiente transfección de ciertas líneas celulares (como NIH3T3, K56215) o cultivos primarios de células como los linfocitos y los miocitos, todas las cuales casi no expresan el receptor adenoviral del virus *coxsackie* (CAR) y son por tanto refractarias a los adenovirus (19). Además, el análisis ultraestructural de los complejos MNP-adenovectores recombinantes por microscopía electrónica y microscopía de fuerza atómica demostró partículas adenovirales intactas completamente rodeadas por nanopartículas magnéticas que ocasionalmente asociaban varios viriones (16). En virtud de que esta configuración impide que los viriones se unan a sus receptores celulares de membrana, es posible que la internalización de los complejos se produzca por mecanismos aún no elucidados. Asimismo, estudios cinéticos con complejos RAd-MNP basados en óxidos de oro e hierro que se aplicaron a líneas celulares refractarias a los adenovirus, proveen evidencia adicional de la existencia de mecanismos de internalización que no son mediados por receptores virales de membrana (20).

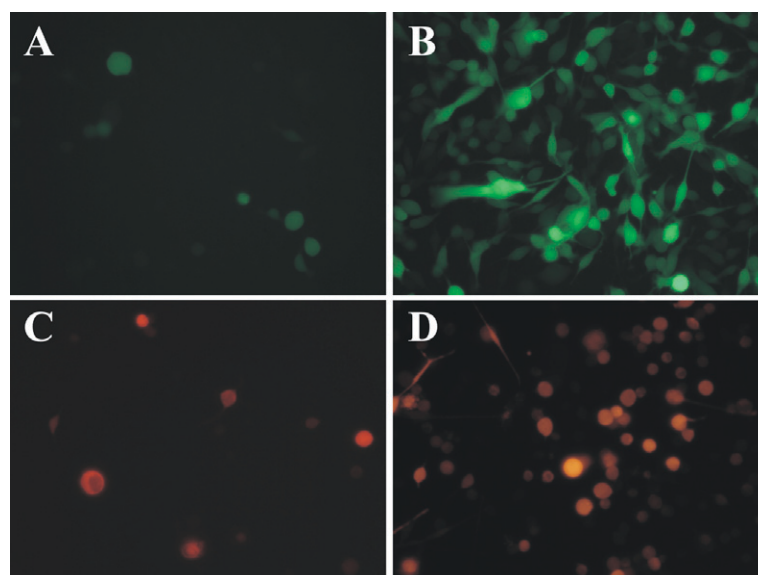


Figura 2. Magnetofección en células gliales B92. Se utilizaron los complejos magnéticos PEI-Mag2/RAd-GFP (B) y PEI-Mag2/RAd-DsRed (D). Como controles se usaron los adenovectores desnudos correspondientes (A y C). En los cuatro casos los adenovectores se usaron a dosis subóptimas a fin de hacer más evidente la amplificación de la transfección inducida por la magnetofección. La relación MNP/PVF del complejo magnético en B es de 0,5 fg Fe/PVF mientras que la correspondiente relación para D es 71 fg Fe/PVF. (20X).

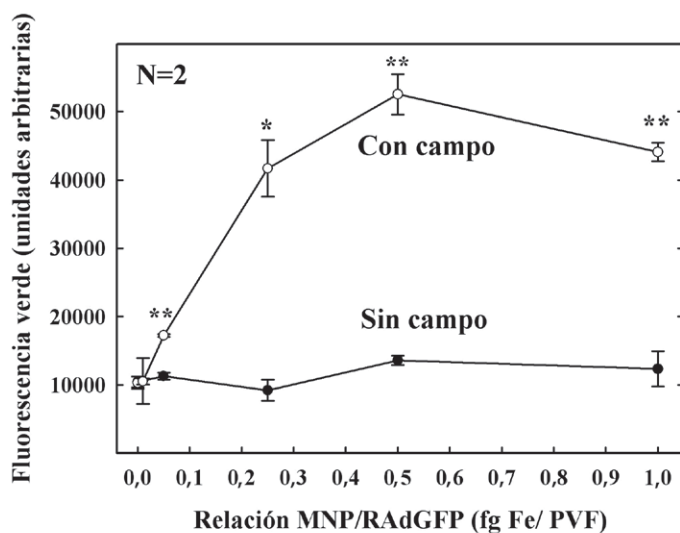


Figura 3. Variación de la eficiencia de la transfección del complejo PEI-Mag2/RAd-GFP en relación a la proporción de MNP/PVF. El efecto se estudió en presencia o ausencia de un campo magnético externo.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus el nivel de transducción (fluorescencia) del vector desnudo. Los experimentos se realizaron por duplicado.

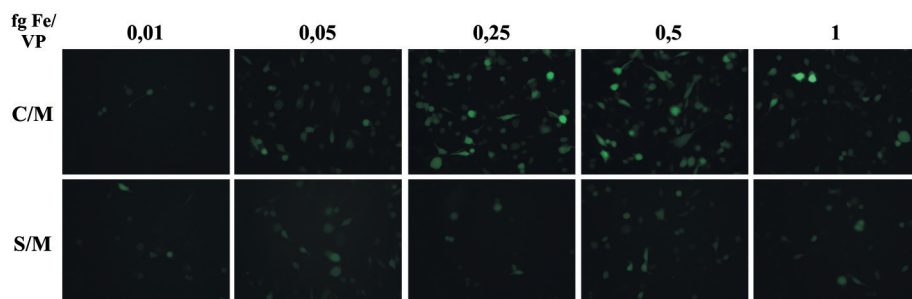


Figura 4. Microfotografías de células transfectadas con complejos PEI-Mag2/RAd-GFP variando la relación MNP/PVP. Se fotografiaron campos representativos de células B92 expresando la GFP para distintas relaciones MNP/PVP con imán (C/M) o sin éste (S/M). (20X).

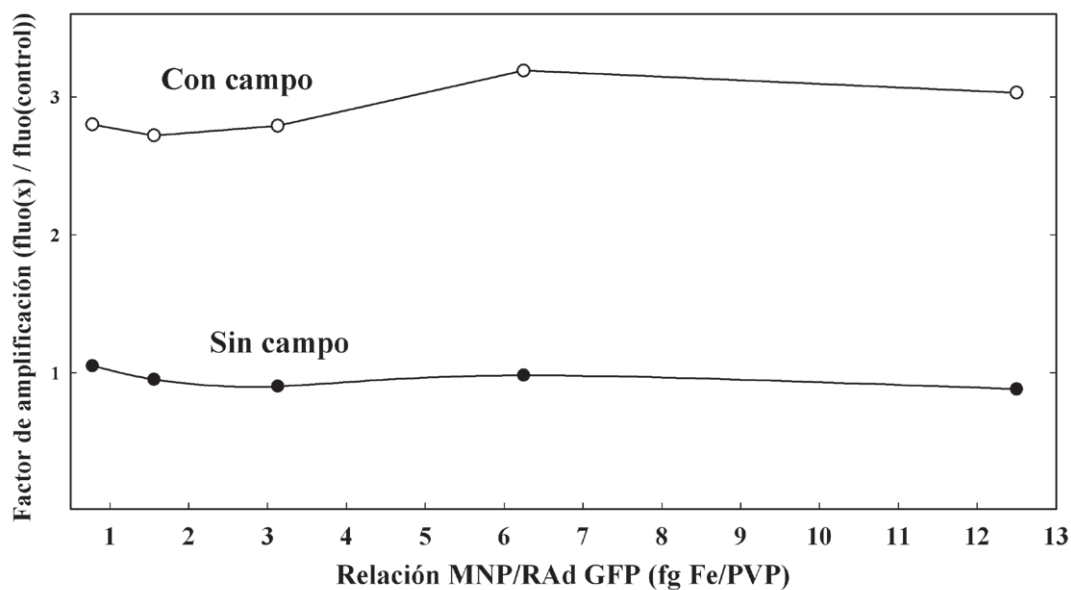


Figura 5. Factor de amplificación de la transfección en función de la proporción MNP/PVF en el complejo PEI-Mag2/RAd-GFP. El factor se calculó en ausencia y presencia del campo. $N=1$

En cuanto a si se internaliza en la célula el virión disociado de las MNP o el complejo completo, recientes estudios de análisis de imágenes por doble haz realizados en el Instituto de Nanociencias de Aragón por Asin *et al.* (21) revelan que el complejo magnético ingresa a la célula sin disociarse, ya que pueden observarse partículas de complejo en el interior celular.

En este estudio se utilizaron dos métodos para determinar la relación óptima MNP/vector. Uno es el método visual de imágenes seriadas de fluorescencia (Fig. 4); el otro es la determinación cuantitativa de fluorescencia de los correspondientes lisados celulares (Fig. 3). Mientras que el primero provee más información cualitativa sobre los efectos del complejo magnético sobre las células, el segundo es cuantitativamente más preciso. Ambos métodos se complementan.

Los resultados de este trabajo coinciden en general con estudios previos de otros grupos aunque la proporción óptima MNP/PVF encontrada en el presente estudio es algo más baja de la informada por Mykhaylyk *et al.* *in vivo* e *in vitro*, la cual está alrededor de los 2,5 fg Fe/PVF (16) (20). Debe señalarse además, que aunque en el presente estudio no se evaluó la toxicidad de los complejos, en un estudio previo se determinó que los complejos PEI-Mag/RAd-GFP poseen muy baja toxicidad sobre las células B92 cuando se utiliza una relación de 2,5 fg Fe/PV en un rango de multiplicidades de infección de 1 a 20 unidades formadoras de placa/célula (21).

De los datos aquí presentados se concluye que los vectores adenovirales utilizados muestran una marcada mejora en su desempeño *in vitro* cuando se los utiliza complejados a MNPs recubiertas con PEI o PB. Si bien estos resultados son alentadores, por el momento no hay suficientes estudios en modelos animales como para establecer con seguridad la efectividad de la magnetofección *in vivo*. Actualmente se está tratando de implementar la magnetofección *in vivo*, en el cerebro y músculo de rata.

CORRESPONDENCIA

DR. RODOLFO GOYA

INIBIOLP, Facultad de Medicina, UNLP, CC 455

(1900) LA PLATA, Buenos Aires, Argentina

Teléfono: (0221) 425-6735; Fax: (0221) 425-0924

E-mail: goya@isis.unlp.edu.ar

E-mail: joaquin_p88@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Hereñú CB, Cristina C, Rimoldi OJ, Becú-Villalobos D, Cambiaggi V, Portiansky EL, *et al.* Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Ther* 2007; 14(3): 237-45.
2. Nishida F, Morel GR, Hereñú CB, Schwerdt JI, Goya RG, Portiansky EL. Restorative effect of intracerebroventricular insulin-like growth factor-I gene therapy on motor performance in aging rats. *Neuroscience* 2011; 177: 195-206.
3. Lübbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, *et al.* Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res* 1996; 56(20): 4686-93.
4. Lübbe AS, Alexiou C, Bergemann C. Clinical applications of magnetic drug targeting. *J Surg Res* 2001; 95(2): 200-6.
5. Gallo JM, Häfeli U. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy and clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 3063-5.
6. Widder KJ, Morris RM, Poore GA, Howard DP, Senyei AE. Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19(1): 135-9.
7. Goodwin S, Peterson C, Hob C, Bittner C. Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy. *J Magn Magn Mater* 1999; 194: 132-9.
8. Goodwin SC, Bittner CA, Peterson CL, Wong G. Single-dose toxicity study of hepatic intra-arterial infusion of doxorubicin coupled to a novel magnetically targeted drug carrier. *Toxicol Sci* 2001; 60(1): 177-83.
9. Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, *et al.* Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res* 2000; 60(23): 6641-8.
10. Lübbe AS, Bergemann C, Brock J, McClure DG. Physiological aspects in magnetic drug-targeting. *J Magn Magn Mater* 1999; 194: 149-55.
11. Pulfer SK, Gallo JM. Enhanced brain tumor selectivity of cationic magnetic polysaccharide microspheres. *J Drug Target* 1998; 6(3): 215-27.
12. Pulfer SK, Ciccotto SL, Gallo JM. Distribution of small magnetic particles in brain tumor-bearing rats. *J Neurooncol* 1999; 41(2): 99-105.
13. Scherer F, Plank C. Magnetofection: Using magnetic particles and magnetic force to enhance and to target nucleic acid delivery. En: Smyth Templeton N, ed. *Gene and Cell Therapy: Therapeutic mechanisms and strategies*; 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2009; p. 379-404.
14. Plank C, Zelphati O, Mykhaylyk O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 1300-31.
15. Mykhaylyk O, Antequera YS, Vlaskou D, Plank C. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection *in vitro*. *Nat Protoc* 2007; 2(10): 2391-411.

16. Tresilwised N, Pithayanukul P, Mykhaylyk O, Holm PS, Holzmüller R, Anton M, *et al.* Boosting oncolytic adenovirus potency with magnetic nanoparticles and magnetic force. *Mol Pharm* 2010; 7(4): 1069-89.
17. Hashimoto M, Hisano Y. Directional gene-transfer into the brain by an adenoviral vector tagged with magnetic nanoparticles. *J Neurosci Methods* 2011; 194(2): 316-20.
18. Schwerdt JI, Goya GF, Calatayud MP, Hereñú CB, Reggiani PC, Goya RG. Magnetic field-assisted gene delivery: achievements and therapeutic potential. *Curr Gene Ther* 2012; 12(2): 116-26.
19. Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Krüger A, *et al.* Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 2002; 9(2): 102-9.
20. Kamei K, Mukai Y, Kojima H, Yoshikawa T, Yoshikawa M, Kiyohara G, *et al.* Direct cell entry of gold/iron-oxide magnetic nanoparticles in adenovirus mediated gene delivery. *Biomaterials* 2009; 30(9): 1809-14.
21. Asin L. Biomedical applications of magnetic nanoparticles: magnetic hyperthermia in dendritic cells and magnetofection of brain cells. Tesis Doctoral, Instituto de Nanociencia de Aragón, Universidad de Zaragoza, 2012. Disponible en: <http://zaguan.unizar.es/record/7369/files/TESIS-2012-059.pdf>. (Fecha de acceso: 21 de febrero de 2013).

Aceptado para su publicación el 26 de abril de 2013