



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD Y FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS
ENTRE UN PÉPTIDO DE DISEÑO Y ADN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO**

PRESENTA

OSCAR DE JESÚS VARGAS DORANTES

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Armando Hernández García



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Ernesto Carrillo Nava
VOCAL: Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida
SECRETARIO: Dr. Armando Hernández García
1er. SUPLENTE: Dr. Federico Daniel Sandoval Ibarra
2° SUPLENTE: Dra. Francisca Morayna Gutiérrez Luna

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Biomacromoléculas 2, Departamento de Química de Biomacromoléculas,
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Armando Hernández García

SUSTENTANTE:

Oscar de Jesús Vargas Dorantes

Agradecimientos

Al Dr. Armando Hernández García, por su tiempo, paciencia y comprensión que aportó para realizar el proyecto.

A las Dra. Patricia Cano y a la Dra. Daniela Araiza por haber proporcionado materiales y reactivos con los cuales se realizó parte del proyecto.

A la Q. Eréndira García Ríos del Laboratorio de Cromatografía, que es a su vez del departamento de Servicios Analíticos del Instituto de Química de la UNAM, por haber realizado el ensayo de MALDI-TOF.

Índice

Términos y abreviaturas.....	3
Resumen.....	5
1. Introducción.....	6
2. Antecedentes	
2.1 Bionanotecnología.....	8
2.2 Uso terapéutico de los ácidos nucleicos.....	8
2.3 Limitaciones para la entrega de ácidos nucleicos.....	9
2.4 Acarreadores para entrega de ácidos nucleicos	9
2.5 Diseño de P4 como un sistema de entrega de RNAi y su origen.....	12
2.6 Sistema de entrega de P4 para RNAi.....	15
2.7 Cooperatividad	16
2.8 Métodos utilizados	
2.8.1 Ensayo del Cambio en la Movilidad Electroforética.....	18
2.8.2 Dispersión dinámica de la luz.....	19
3. Justificación.....	21
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos	
5.1 General.....	21
5.2 Particulares.....	21
6. Procedimiento experimental	

6.1 Obtención de DNA plasmídico y DNA de 25 pb	23
6.2 Espectrometría de masas por MALDI-TOF de P4.....	23
6.3 Evaluación de la unión de P4 a dsDNA de diferentes tamaños.....	24
6.4 Evaluación de la unión de P4 a dsDNA al variar el pH	26
6.5 Cinéticas de formación de complejos formados entre P4 y DNA	27
6.6 Liberación de ADN de los complejos formados entre P4 y DNA en medios fisiológicos	28
6.7 Determinación del tamaño de partícula de los complejos entre P4 y DNA.....	29
7. Resultados y Discusión	
7.1 Espectrometría de masas por MALDI-TOF.....	31
7.2 Evaluación de la unión de P4 a ácidos nucleicos.....	32
7.3 Determinación del tamaño de partícula.....	39
7.4 Efecto del pH sobre la unión de P4 a DNA	40
7.5 Cinéticas de la formación de los complejos entre P4 y DNA.....	45
7.6 Liberación de los complejos entre P4 y DNA en medios fisiológicos	48
8. Conclusiones.....	54
9. Bibliografía	55
APÉNDICE A. Reactivos y métodos.....	58
APÉNDICE B. Imágenes suplementarias.....	60

Términos y abreviaturas

DNA	Ácido 2'-desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
pDNA	DNA plasmídico
ssDNA	DNA de cadena sencilla
dsDNA	DNA de doble cadena
dsRNA	RNA de doble cadena
miRNA	MicroRNA
siRNA	RNA pequeño interferente
RNAi	RNA de interferencia
MALDI-TOF	Ionización Láser Asistida por Matriz que usa el detector de Tiempo de Vuelo
EMSA	Ensayo del Cambio en la Movilidad Electroforética
DLS	Dispersión Dinámica de la Luz
$C_x (y)$	Concentración de "x" en las unidades de "y"
$d (y)$	Diámetro en las unidades de "y"
$C_{x, madre} (y)$	Concentración de "x" de la disolución madre en las unidades de "y"
$V_x (y)$	Volumen de "x" en las unidades de "y"
A_x	Absorbancia a la longitud de onda x
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
H ₂ O, mQ	Agua desionizada
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico.
Y	Fracción ocupada
K_d	Constante de disociación
$K_{d,ap}$	Constante de disociación aparente
Bmax	Unión máxima
HCl	Ácido clorhídrico
pI	Punto isoeléctrico

P4-DNA	Complejos entre P4 y DNA
RPMI	Medio del Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero Fetal Bovino
TAE	Disolución amortiguadora que contiene Tris base, ácido acético y EDTA
Xlrpba	Proteína de unión a dsARN de <i>X. laevis</i>

Resumen

En este trabajo se estudió la estabilidad de formación de las nanopartículas formadas entre DNA y P4, un péptido de diseño, con el fin de poder explicar ciertos aspectos sobre la actividad *in vitro* e *in vivo* de las nanopartículas. En un primer acercamiento, se evaluó la afinidad de P4 para formar complejos supramoleculares con templados de mayor tamaño al siRNA e incluso con arquitectura diferente como es el caso de los plásmidos, por medio de ensayos del cambio en la movilidad electroforética. Se calcularon también las constantes aparentes de unión de P4 al DNA. Posteriormente, al elegirse uno de los templados utilizados y con la misma técnica, se estudió el efecto que ejerce el cambio de pH sobre la estabilidad de los complejos P4-DNA. Después, se evaluaron las cinéticas de formación de los complejos P4-DNA y se estableció el tiempo mínimo para formar las nanopartículas. También, se evaluó la estabilidad de los complejos en RPMI, un medio de cultivo de células de mamífero, con el fin de conocer si las nanopartículas podrían llegar a la célula. Finalmente, se caracterizaron las nanopartículas determinando el tamaño de las mismas por medio de la técnica de dispersión dinámica de la luz. Se encontró que P4 tiene mayor afinidad de unión a templados de mayor tamaño al siRNA y esto confiere cierta protección en el medio de cultivo utilizado, por lo que P4 puede utilizarse para la entrega de ácidos nucleicos de gran tamaño como el plasmídico. Se esperan realizar ensayos sobre la entrega de este tipo de ácidos nucleicos en diferentes líneas celulares de mamífero, además de una caracterización más completa de los complejos P4-pDNA.

1. Introducción

El uso potencial de los ácidos nucleicos como agentes terapéuticos se ha ido desarrollando y reportando a pesar de las dificultades que presentan (Erdman y Barciszewski, 2014). Las terapias pueden ser basadas tanto en DNA como en RNA (Sharma, Rungta y Prasad, 2014). En el caso del uso de DNA, pueden utilizarse plásmidos (Prazeres y Monteiro, 2014), aptámeros (cadenas de hebra única plegadas con capacidad de reconocimiento específico de ligandos), o incluso oligonucleótidos, ya sean en sus aplicaciones para terapia de antisentido. Por otro lado, el uso de los RNA se extiende a usar la terapia de interferencia, teniendo como ejemplos siRNA y miRNA, o RNA antisentido (Erdman y Barciszewski, 2014).

A pesar de que la entrega de material genético a la célula parece prometedora para el tratamiento y/o cura de enfermedades, como muestran estudios *in vitro*, la eficacia de entrega *in vivo* disminuye debido a factores como la degradación de nucleasas, estimulación del sistema inmune innato y tener un tiempo de vida media muy corto (menor a 30 minutos) (Kanasty, Dorkin, Vegas y Anderson, 2013) (Wittrup y Lieberman, 2015).

Para solucionar estos problemas, se han diseñado varias estrategias para la entrega de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos. Entre ellas destacan el acarrearlas con un vector, ya sea de tipo viral como los lentivirales o los adenovirales, o no virales como polímeros, lípidos y péptidos (Aliabadi et al., 2012).

Dentro del grupo de acarreadores no virales se ha sintetizado el péptido llamado "P4", que está compuesto de 47 aminoácidos. Se demostró que P4 encapsula RNAi (20 a 25 pb) y lo entrega al interior de las células neurales (neuronas y astrocitos) con alta eficiencia y menor toxicidad respecto a otros acarreadores comerciales como Lipofectamina® y N-TER™ (Hernandez-Garcia et al., s.f.).

P4 está formado por dos dominios, uno de unión a ácidos nucleicos (RNA o DNA) y un dominio de autoensamblaje responsable de formar partículas. Cuando P4 se une a los ácidos nucleicos presenta un cambio estructural, de una cola aleatoria sin

estructura (*random coil* en inglés), que lo lleva a autoensamblarse en nanopartículas supramoleculares esféricas con diámetros entre 200 nm y 300 nm. Estas nanopartículas confieren protección enzimática a los RNAi y alta estabilidad a concentraciones salinas fisiológicas (Hernandez-Garcia et al., s.f.).

A pesar de lo anterior, han surgido varias preguntas, una de las más importantes es si P4 es capaz de encapsular otros ácidos nucleicos diferentes a RNAi, por ejemplo, plásmidos y DNA lineal, y si sus propiedades de encapsulamiento y estabilidad cambian al variar el templado de DNA que encapsulan.

Por lo tanto, este trabajo busca evaluar la formación de nanopartículas y su estabilidad P4-DNA variando ciertas condiciones biofísicoquímicas, tales como el pH, el tiempo de formación (cinética de unión), tamaño y tipo de templado de DNA y la liberación de estos ácidos nucleicos en medios de cultivo fisiológicos de cultivo de células de mamíferos. Estos análisis tienen gran relevancia porque servirá para poder predecir y entender el comportamiento de los complejos supramoleculares entre P4-DNA en un sistema *in vitro* e *in vivo* (entrada a la célula y liberación dentro de los endosomas), lo que permitirá optimizar el péptido P4 como sistema de entrega, no solo de RNAi sino también de DNA de varios tamaños y arquitecturas (lineal o circular tipo plasmídico).

2. Antecedentes

2.1 Bionanotecnología

La nanotecnología se define como el estudio científico, entendimiento y control de materiales con dimensiones entre 1 nm y 100 nm aproximadamente (Hobson, 2011), estos materiales particulados y discretos se denominan nanopartículas.

Una de las ramas de la nanotecnología, la bionanotecnología, es definida como la aplicación de la biología a la nanotecnología, es decir, el uso de biomoléculas (polipéptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, entre otros) en materiales, instrumentos o sistemas de producción que entren en la nanoescala (Ramsden, 2016).

El desarrollo de la nanotecnología ha revolucionado campos como la investigación aeroespacial, militar y la medicina (Wong et al., 2017); en este último la bionanotecnología ha intervenido recientemente en áreas como el diagnóstico y la terapia, por ejemplo: en la creación de biosensores y la entrega de fármacos asistida por vectores de acarreamiento (Chan, 2006) (Wong et al., 2017).

2.2 Uso terapéutico de los ácidos nucleicos

La búsqueda de fármacos en la actualidad pretende descubrir moléculas activas biológicamente que sean específicas sobre los blancos responsables de la progresión de una enfermedad (Sharma, Rungta y Prasad, 2014). Con la culminación del Proyecto Genoma Humano y los avances en la Biología Molecular, se tiene ahora un entendimiento, desde el punto de vista genético, sobre procesos celulares y la patogénesis de una enfermedad, donde ciertos genes son responsables de alguna patología (Rodríguez, del Pozo-Rodríguez y Solinís, 2013).

El uso terapéutico de los ácidos nucleicos no solo se enfrenta al reto de la entrega de material genético en la célula, sino también de cuestiones éticas, sociales y de carácter comercial (Erdman y Barciszewski, 2014).

En la terapia basada en ácidos nucleicos se pueden utilizar tanto DNA como RNA (Erdman y Barciszewski, 2014). Se pueden entregar plásmidos (pDNA), aptámeros tanto de DNA como de RNA, RNAs mensajeros (mRNA), RNAs cortos interferentes (siRNA), microRNAs, deoxirribozimas, ribozimas y nucleótidos antisentido (Wong et al., 2017).

Se ha reportado el uso de pDNA para el tratamiento de enfermedades como la fibrosis quística o la Distrofia Muscular de Duchenne (Prazeres y Monteiro, 2014), además de la producción de vacunas de pADN (Liu y Ulmer, 2005).

Por otro lado, en la terapia de interferencia (siRNA, microRNA, entre otros), se utilizan pequeños fragmentos de dsRNA (21 pb a 23 pb) que se unen por complementariedad a la secuencia del mRNA blanco, impidiendo la expresión de la proteína, ejemplos de estos son el tratamiento de infecciones por virus como el VIH, influenza y hepatitis (Erdman y Barciszewski, 2014).

2.3 Limitaciones para la entrega de ácidos nucleicos

A pesar de que la entrega de los ácidos nucleicos con fines terapéuticos es una idea prometedora como muestran modelos *in vitro*, cuando se trasladan a estudios *in vivo* presenta dificultades debido a la naturaleza misma de los ácidos nucleicos (Kanasty, Dorkin, Vegas y Anderson, 2013).

Los factores principales son la degradación por parte de las nucleasas y el reconocimiento de éstos por el sistema inmunitario innato, por lo que tienen un perfil farmacocinético muy pobre (se excreta en menos de 30 minutos). (Kanasty, Dorkin, Vegas y Anderson, 2013), además de que los ácidos nucleicos son hidrofílicos y su entrada a la célula está impedida estéricamente por su gran tamaño (Wittrup y Lieberman, 2015).

2.4 Acarreadores para entrega de ácidos nucleicos

Debido a la dificultad de entregar ácidos nucleicos “desnudos” se han aplicado estrategias como la modificación del sistema de entrega. Una estrategia consta de

acarrear ácidos nucleicos con vectores que los protegen y facilitan su entrada a la célula mediante endocitosis. La endocitosis es la vía por la que ingresan las biomacromoléculas, ya que una vez que maduran los endosomas hay una disminución del pH para liberar el contenido dentro de ellos (Aliabadi, Landry, Sun, Tang y Uludağ, 2012).

Los acarreadores son de dos naturalezas: virales y no virales. Como se menciona en Aliabadi *et al.* (2012), la estrategia de usar virus radica en su habilidad natural de insertar el material genético en la célula huésped, y, por lo tanto, son sistemas de entrega eficientes, incluso en células donde es difícil la entrega de material genético como las células neurales (Merten y Al-Rubeai, 2011) (Ramamoorth, 2015).

Los Adenovirus (Ad) están clasificados en 6 especies (A-F). Dos variantes, Ad2 y Ad5 de la especie C, son los más utilizados en pruebas clínicas debido a que son los más efectivos para la creación de los vectores y su aplicación en terapia génica. Los Ads contienen un genoma lineal de dsDNA de 26-40 kb que está recubierto de una cápside. Su cápside que no contiene envoltura, es una proteína de forma icosaédrica con diámetro de 70-100 nm. Una ventaja que tiene el Ad es que puede infectar tanto células en división como en estado de quiescencia, además de no ser oncogénico, pero una de sus desventajas es que puede crear una respuesta tanto humoral como celular del sistema inmunitario a altas dosis del vector (Merten y Al-Rubeai, 2011).

Los retrovirus son conocidos por su habilidad de realizar la transcripción inversa de su genoma lineal de ssRNA. Son categorizados en simples (retrovirus oncogénicos) o complejos, como los lentivirus, siendo estos útiles sobre otros retrovirus. Su cápside de 80-100 nm de diámetro contiene el genoma viral con una envoltura compuesta de una bicapa lipídica. Usar este tipo de virus como vector tiene la desventaja de que no infectan células en estado de quiescencia, pero son estudiados por su utilidad en estudios de reparación de hueso (Merten y Al-Rubeai, 2011).

A pesar de la eficiencia que muestran para la entrega de ácidos nucleicos, existen muchas limitaciones clínicas respecto a su aplicación, tales como la citotoxicidad

residual, falla de los genes para integrarse dentro del genoma humano y expresión génica de corto plazo; por lo que se opta el uso de acarreadores no virales (Wong et al., 2017).

Los acarreadores del tipo no viral no solo ofrecen una mayor seguridad, sino que también son de menor costo y de producción más sencilla (Ramamoorth, 2015). Estos pueden ser lípidos, polímeros de origen natural o sintéticos, o péptidos (Kanasty, Dorkin, Vegas y Anderson, 2013).

El uso de lípidos como acarreadores se estudió inicialmente para el transporte de fármacos. Los lípidos forman liposomas cuyas ventajas son que aumentan la internalización del fármaco en la célula y el escape endosomal. Su uso se extendió a ácidos nucleicos, como RNAi (Aliabadi, Landry, Sun, Tang y Uludağ, 2012) y plásmidos (Kulkarni et al., 2017).

El origen de los polímeros puede ser natural, como la ciclodextrina y el quitosano, o de origen sintético como la polietilenimina o los dendrímeros. La ventaja de los acarreadores poliméricos radica en que se pueden modificar las propiedades fisicoquímicas del polímero para optimizar la entrada del sistema de entrega a la célula. Esto se logra a partir de la neutralización de las cargas del polímero y de los ácidos nucleicos (Aliabadi, Landry, Sun, Tang y Uludağ, 2012). Como ejemplo, a los dendrímeros tipo PAMAM se les puede agregar otro tipo de polímeros y poder así dar más estabilidad a los complejos formados con RNAi (Palmerston Mendes, Pan y Torchilin, 2017).

Los acarreadores peptídicos son péptidos con gran versatilidad debido a su composición química, y pueden aumentar la eficiencia de entrada a la célula debido a la presencia de residuos básicos, tales como la arginina y lisina (Aliabadi, Landry, Sun, Tang y Uludağ, 2012). Una clase especial de estos acarreadores, los llamados Péptidos Penetradores de Célula (CPP), es de interés, debido a que pueden transportar a través de la membrana celular diferentes moléculas como DNA, RNAi o péptidos. Algunos péptidos provienen de proteínas de origen viral como TAT del Virus de Inmunodeficiencia Humana-1 (VIH-1) (Guidotti, Brambilla y Rossi, 2017).

2.5 Diseño de P4 como un sistema de entrega de ARNi y su origen

P4 es un péptido de 47 aminoácidos (Figura 2.5.1). P4 está compuesto de dos segmentos: P2 y P3. El segmento P2 (27 aminoácidos) es la parte de un dominio de unión a RNA de doble hebra (dsRNA) de una proteína proveniente de la rana africana *X. laevis*, Xlrbpa-2 (Ryter, 1998); mientras que P3 (18 aminoácidos más dos glicinas de espaciador) es un dominio capaz de autoensamblarse y es de origen sintético (Wang, Bergenfeld, Arora y Canary, 2012), la síntesis de P4 se muestra en la figura 2.5.2. De manera interesante, P4 puede unirse a ácidos nucleicos de doble hebra con mayor afinidad que los de hebra única, sin importar si es DNA o RNA. (Hernandez-Garcia et al., s. f.).

SIRKLEYEIEELRLRIGGGTFVETGSGTSKQVAKRVAAEKLTKFKT

Figura 2.5.1 Secuencia de aminoácidos de P4. Se muestra en rojo el dominio de autoensamblaje, mientras que en azul el dominio de unión a DNA.

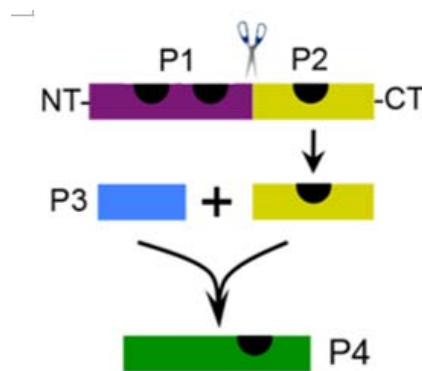


Figura 2.5.2 Síntesis de P4. El segmento P2 proviene de Xlrbpa-2 de *X. laevis* mientras que P3 tiene origen sintético (Modificado de Hernandez-Garcia et al., s. f.) .

La proteína Xlrbpa-2 de *X. laevis* tiene una secuencia de 299 aminoácidos y tiene un peso molecular 32,8 kDa (Eckmann y Jantsch, 1997), esta pertenece a un grupo de proteínas que se unen específicamente a dsRNA por reconocimiento molecular. Esto lo hace mediante el dominio de unión a dsRNA que consta de 68 residuos (Ryter, 1998).

La estructura de Xlrpba-2 determinada por difracción de rayos X tiene la forma N- α - β - β - β - α -C hallado en proteínas de este grupo, además de que entre las hojas β 1 y 2 hay un *bucle*, se muestra la estructura en la figura 2.5.3 (Ryter, 1998).



Figura 2.5.3 Estructura de Xlrpba-2. Se muestra la estructura determinada por difracción de rayos X del complejo formado entre Xlrpba-2 y dsRNA, las hojas β están en amarillo, mientras que las hélices α se muestran en rosa (Ryter y Schultz, 2018).

Cuando Xlrpba-2 forma complejos con dsRNA, el dominio de unión dsRNA reconoce tres regiones en el dsRNA sin necesidad de una secuencia específica: dos surcos menores adyacentes y el surco mayor en una cara de la doble hélice. La especificidad para reconocer dsRNA se debe al reconocimiento de los surcos menores (Ryter, 1998).

Como reporta Ryter (1998), en una región la hélice α del extremo N-terminal interactúa con el surco menor de dsRNA, en la segunda región el *bucle* entre las hojas β 1 y 2 interactúa con el surco menor adyacente, mientras que en la tercer región un fragmento que precede a la hélice α del extremo C-terminal e incluso la hélice α son las responsables de la interacción con el surco mayor.

Las interacciones antes mencionadas se establecen por puentes de hidrógeno ya sea de manera directa con los enlaces fosfodiéster o con los hidroxilos 2' de la ribosa mediadas por agua. En una de las regiones, la histidina-141, interactúa como puente entre ambas hélices debido a las interacciones entre el grupo 2'-OH de una cadena

con el carbonilo de la histidina y el grupo 2'-OH con la cadena lateral del mismo aminoácido (Ryter, 1998).

De todo el dominio de unión a dsRNA de Xlrbpa-2 se escogió la región que reconoce el surco mayor debido a que las otras regiones (referida como P1) hay secuencias muy hidrofóbicas, las cuales resultan en poca solubilidad en agua. La parte de la secuencia específica que se une a los ácidos nucleicos en P2 es TSKQVAK (Hernandez-Garcia et al., s. f.)

Por otra parte, P3 es un péptido de diseño cuya estructura es una hélice α , pero en presencia de Cu(II) cambia su estructura a una hoja β , además de que forma agregados en presencia de un exceso de este metal (Wang, Bergenfeld, Arora y Canary, 2012). Por lo tanto, se fusionó P2 con P3 bajo la hipótesis de que al fusionar el péptido P2 al péptido P3 porque P3 propiciaría la formación de los agregados, y por lo tanto, la formación de los complejos supramoleculares con RNAi.

Se comprobó por dicroísmo circular que P4 cambia de una estructura al azar a una hoja β . En la figura 2.5.4 se muestra que la fusión de P2 y P3 (P4) tiene mayor afinidad a siARN que solo P2 y se demuestra la hipótesis antes mencionada. (Hernandez-Garcia et al., s. f.).

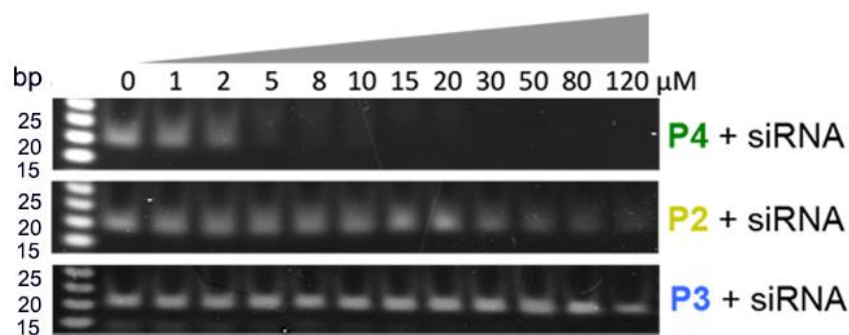


Figura 2.5.4(Modificado) Unión de P2, P3 y P4 a siARN. Se muestra que la fusión de P2 y P3 une con mayor afinidad siARN que P2 (Hernandez-Garcia et al., s. f.).

2.6 Sistema de entrega de P4 para ARNi

Hernandez-Garcia, et al. demostraron, por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión en condiciones criogénicas (cryo-TEM), la formación de partículas supramoleculares entre P4 y siRNA. Estas son esféricas, de diámetro entre 200 nm y 300 nm, por lo que son polidispersas, mostradas en la figura 2.6.1 (Hernandez-Garcia et al., s. f.).

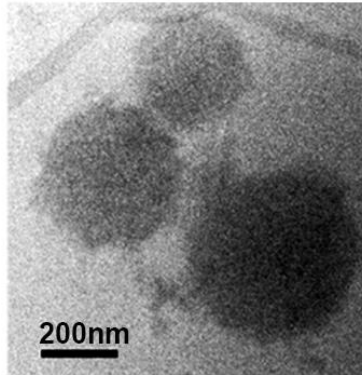


Figura 2.6.1 Imagen de cryo-TEM para las partículas formadas entre P4 y siARN (Tomada de Hernandez-Garcia et al., s. f.).

Además, se demostró que las nanopartículas formadas entre P4 y DNA son resistentes a la degradación de la DNAasa I, también que el siRNA no es liberado en concentraciones altas de sal, y que debido a que no hubo liberación del siRNA en disoluciones amortiguadoras con fuerza iónica alta, las interacciones electrostáticas no son las únicas responsables de la encapsulación de siRNA (Hernandez-Garcia et al., s. f.).

Hernandez-Garcia et al. reportan que las partículas formadas entre P4 y siRNA pueden entrar de manera eficiente en neuronas (74%) y astrocitos (78,5%) con eficiencia comparable respecto a sistemas comerciales: N-TER™ (neuronas: 68%, astrocitos: 34,3%) y Lipofectamina® 2000 (neuronas: 83%, astrocitos: 89%), pero a diferencia de estos, la supervivencia de las células con las nanopartículas de P4 con siARN no se ve afectada tanto como lo hacen estos sistemas comerciales. Esto se asocia al potencial ζ que es relativamente bajo en las nanopartículas de P4 con siARN (+4,7 mV).

2.7 Cooperatividad

En presencia de Cu(II) P3 sufre un cambio estructural. Como reportan Wang et al. (2012), la curva de titulación de una disolución del péptido del cual proviene P3 en función de la concentración de CuCl_2 muestra el comportamiento de la ecuación de un sitio específico de unión (discutida más adelante). Se encontró una K_d de $75 \mu\text{M}$ y un coeficiente de Hill de +3,4, lo que es un indicativo de cooperatividad positiva.

La cooperatividad es un tipo de comportamiento donde un número de componentes aparentemente independientes de un sistema actúan de manera colectiva, al unísono o cerca del unísono (Ferrell Jr, 2009).

Un ejemplo clásico de ello es la unión del oxígeno a la hemoglobina donde se obtiene una curva sigmoidea y no una de tipo Michaeliana en una curva de saturación de hemoglobina en función de la presión del oxígeno (figura 2.7.1), pero la cooperatividad es también importante en la señalización entre células, regulación transcripcional y procesos más complejos (Ferrell Jr, 2009).

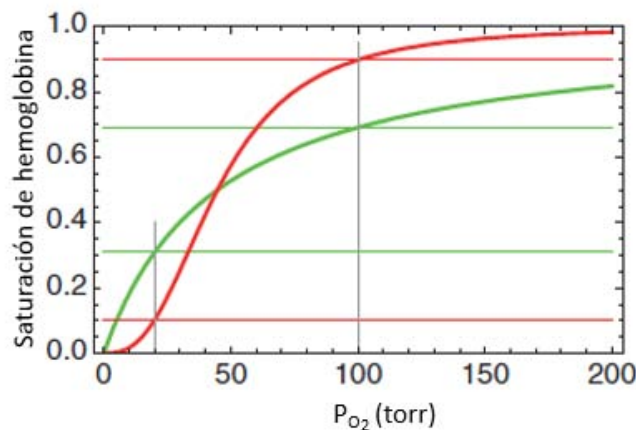


Figura 2.7.1 (Modificado). Gráfico de la saturación de la hemoglobina en función de la presión del oxígeno (rojo). Esta no sigue la ecuación de Lagnmuir (verde) (Ferrell Jr, 2009).

En un sentido más formal, se dice que una molécula receptora exhibe una unión cooperativa si su unión al ligando no sigue una tendencia lineal respecto a la concentración de ligando. Esta puede ser positiva si la unión de una molécula de ligando aumenta la afinidad aparentemente de su receptor, o negativa si sucede el efecto contrario (Stefan y Le Novère, 2013).

De acuerdo a lo que observó en el caso de la hemoglobina, A.V. Hill propuso una ecuación que explicaba el fenómeno (ecuación 2.1), donde Y representa la fracción del receptor ocupada, C_x la concentración del ligando, K_d es la constante de disociación aparente y n es el factor de Hill Notar que si $n > 1$ la cooperatividad es de carácter positivo y si $n < 1$ la cooperatividad es de carácter negativo (Stefan y Le Novère, 2013).

$$Y = \frac{C_x^n}{K_d + C_x^n}$$

Ecuación 2.1

La ecuación que se utilizará en este trabajo es donde se tienen varios sitios de unión en el DNA (receptor) y P4 solo tiene un solo sitio de unión al DNA (ligando), por lo que el modelo corresponde a la ecuación de un sitio específico de unión, la ecuación 2.2. El significado físico del valor de K_d es que corresponde con la cantidad de ligando necesaria para unirse a la mitad de su receptor (Bisswanger, 2008):

$$Y = \frac{C_x}{K_d + C_x}$$

Ecuación 2.2

La forma final de la ecuación se muestra a continuación, ecuación 2.3, que relaciona el porcentaje de DNA unido en (%ADN, unido) en función de la concentración de P4, donde B_{max} es la máxima unión al DNA, esto es 100% porque en un exceso de P4 todo el DNA se unió a P4. Por último, se representa la constante de disociación aparente como $K_{d,ap}$.

$$\%ADN, unido = \frac{B_{max} * C_{P4}}{K_{d,ap} + C_{P4}}$$

Ecuación 2.3

2.8 Métodos utilizados

2.8.1 Ensayo del Cambio en la Movilidad Electroforética

Las interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos juegan un papel importante en la coordinación de procesos celulares. Estas interacciones han sido estudiadas por el Ensayo del Cambio en la Movilidad electroforética (EMSA por sus siglas en inglés) (DeLong y Zhou, 2015).

EMSA es un método rápido, y sensible en ciertas condiciones para detectar interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos. Está basado en la observación de que la movilidad de un complejo entre una proteína y los ácidos nucleicos es menor que la de los ácidos nucleicos durante una electroforesis (figura 2.8.1.1) (Hellman y Fried, 2007). EMSA puede utilizarse tanto para fines cualitativos como cuantitativos, como la determinación de la $K_{d,ap}$.

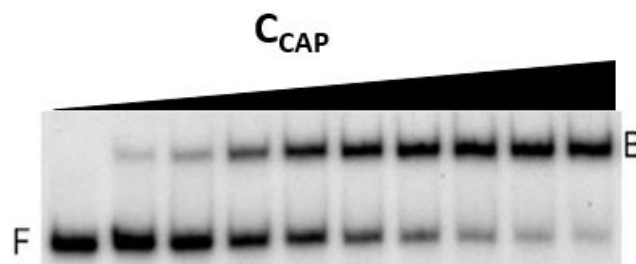


Figura 2.8.1.1 Titulación de un fragmento de DNA (promotor *lac*) con la proteína CAP de *E. coli*. Se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) de varias mezclas DNA con CAP, la estequiometría es 1:1. F indica DNA libre y B DNA unido a CAP (tomado de Hellman y Fried, 2007).

EMSA tiene ventajas sobre otros métodos porque es un método sencillo, robusto y puede ajustarse a gran variedad de condiciones, además de que se necesitan volúmenes pequeños de muestra (menor a 20 μ L) y se pueden utilizar ácidos nucleicos de varios tamaños y de diferentes estructuras; pero también tiene ciertas limitaciones. Una de las limitaciones es que puede sobreestimarse la unión ya que la sensibilidad del ensayo solo permite evaluar concentraciones micromolares de proteína y los complejos no están en equilibrio durante la electroforesis, además de

que la movilidad de los complejos no solo depende del tamaño de la proteína (Hellman y Fried, 2007).

2.8.2 Dispersión dinámica de la luz

Las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales tales como la carga, el tamaño o las impurezas contribuyen hacia el comportamiento de las mismas en un ambiente biológico, para ello, la caracterización adecuada de las mismas es esencial para obtener información confiable (Bhattacharjee, 2016).

En la actualidad existen métodos para determinar tamaño, forma o estabilidad de partículas tales como la Difracción de Rayos X a Ángulo Pequeño o la Microscopía Electrónica de Transmisión (Berbel Manaia et al., 2017), pero uno de los métodos más utilizados es la Dispersión Dinámica de la Luz (o DLS por sus siglas en inglés). DLS, que también es conocida como espectroscopía de correlación de fotones o dispersión cuasielástica de la luz, mide el tamaño hidrodinámico de partículas debido a su difusión que obedece el movimiento browniano (aleatorio) (Patel et al., 2017). El tamaño hidrodinámico se determina a partir de medir la fluctuación de la intensidad de la luz que es emanada de una muestra irradiada por un láser (Lomakin et al., 2005).

Las macromoléculas están en continuo movimiento en disolución debido al choque con las moléculas del disolvente. Las macromoléculas más grandes difundirán más lento que las pequeñas, resultando en un coeficiente de difusión menor. El coeficiente de difusión (D) medido usando la intensidad de las fluctuaciones de la luz pueden ser convertidas a radio hidrodinámico (R_h) usando la ecuación de Stokes-Einstein, ecuación 2.4,. k_B es el coeficiente de Boltzmann, T, la temperatura absoluta y η la viscosidad (Patel et al., 2017):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

Ecuación 2.4

En el método convencional de DLS, un fotomultiplicador es usado para recibir la luz dispersada de las nanopartículas, y un correlador digital es utilizado para obtener la función de autocorrelación de la intensidad de fluctuación, esta función refleja las características del movimiento browniano de las nanopartículas, por lo tanto, la información del tamaño de partícula (Zhou, Su y Cai, 2017). DLS es un método no invasivo, rápido y un método confiable para estudiar la homogeneidad y agregación de macromoléculas y sus complejos, pero tiene una limitación, ya que las partículas y agregados de masa molar elevada pueden interferir en la medición de R_h debido a que la dispersión de luz se incrementa siguiendo una función cúbica en función del tamaño (Patel et al., 2017).

3. Justificación

Se ha demostrado que P4 puede entregar siARN en células neurales, pero también ha surgido la pregunta sobre si el uso de P4 puede extenderse a la entrega de otros sistemas de interés terapéutico de mayor tamaño que siARN o con otras arquitecturas, por ejemplo, plásmidos o ADN lineal de doble hebra. Además, con el objetivo de poder optimizar el sistema de entrega de ácidos nucleicos es necesario comprender cómo los complejos péptido-ADN se comportan tanto en un sistema *in vivo* como *in vitro* (sobre todo la entrada a la célula y escape endosomal),.

4. Hipótesis

P4 forma complejos supramoleculares con ácidos nucleicos de doble hebra, por lo que si se modifican factores tales como el tamaño del templado, el pH, la liberación de estos complejos en medios de cultivo y el tamaño de las partículas, que puedan alterar la unión de P4 hacia los ácidos nucleicos, entonces se podrá optimizar el uso de P4 en un sistema de entrega de ácidos nucleicos, además de poder diseñar versiones mejoradas del péptido para la transfección en sistemas *in vivo* e *in vitro*.

5. Objetivos

5.1 General

Evaluar la formación y estabilidad de los complejos entre P4 y ADN bajo diversas condiciones como el efecto del tamaño y arquitectura del templado, el pH, la cinética de formación y la liberación de estos complejos en RPMI para poder extender el uso de P4 como acarreador de otros sistemas diferentes al siARN y predecir la estabilidad de estos complejos *in vitro* e *in vivo*.

5.2 Particulares

- Evaluar la capacidad de unión del péptido P4 a distintos templados de ADN lineales y a ADN plasmídico.
- Determinar el efecto del tamaño del templado de ADN sobre la cooperatividad de unión del péptido P4.

- Evaluar el efecto del pH sobre la formación de complejos P4-ADN.
- Evaluar la cinética de formación de los complejos formados entre P4 y ADN.
- Evaluar el efecto del tamaño del templado del ADN en la estabilidad de los complejos entre P4 y ADN en presencia de medio para cultivo de células mamíferas.
- Determinar el tamaño de las partículas formadas entre P4 y ADN plasmídico.

6. Procedimiento experimental

6.1 Obtención de DNA plasmídico (pDNA) y dsDNA de 25 pb

pADN

Se sembraron células de *E. coli* BL21 previamente transformadas con el plásmido de 2675 pb, 15ABQD6P_1727136_dsRBD-REDOX_switch (Life Technologies) en 4 tubos estériles con ~20 mL de medio LB-Luria en Kanamicina 1x (Apéndice A). Se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Se aisló y purificó el pADN de acuerdo con el manual GenElute™ Plasmid Miniprep Kit PLN70-1KT (Sigma-Aldrich). La recuperación del DNA se realizó con agua desionizada.

Se determinó la concentración del DNA y su calidad se verificaron con la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} por medio de NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

dsDNA de 25 pb

Dos ssDNA complementarios entre sí, DNA_25pb_a y DNA_25pb_b, previamente sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies) y con concentraciones de 98,33 μM y 97,23 μM respectivamente (NanoDrop 2000), fueron mezclados tal que la concentración de ambos fuese 10,0 μM en 100 μL de disolución total con agua desionizada. Se llevó la reacción de hibridización a 90 °C en un baño maría durante 10 minutos y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante 2 horas. Se mantuvieron a 4 °C hasta su posterior uso.

6.2 Espectrometría de masas por MALDI-TOF de P4

El péptido P4 es un sólido que fue sintetizado por el Instituto Simpson Querrey para BioNanotecnología de la Universidad de Northwestern, el método fue síntesis de péptidos en fase sólida usando un sintetizador automatizado con microondas. Los péptidos fueron purificados mediante cromatografía líquida en fase reversa a una

pureza de 95% corroborada por espectrometría de masas (Hernandez-Garcia et al., s.f.).

50 μL de una disolución de 100 μM de péptido P4 fue entregada al Laboratorio de Servicios Analíticos del Instituto de Química UNAM para esta prueba. Se utilizó como matriz, al ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA).

Se preparó una disolución de la matriz CHCA saturada, en 60% de acetonitrilo, 40% de agua y 0,1% de ácido trifluoroacético. Posteriormente se colocó en una placa la mezcla de 5 μL de matriz con 1 μL de la disolución 100 μM de P4 para su cocrystalización y realizar el análisis. El equipo de MALDI-TOF utilizado fue microflex (Bruker Daltonics, Estados Unidos) con las siguientes características:

- Láser de N_2 a 237 nm
- Polaridad positiva
- Voltaje de aceleración de 20 kV
- Modo de operación lineal

6.3 Evaluación de la unión de P4 a dsDNA de diferentes tamaños

Los templados de 100 pb, 400 pb y 2000 pb se adquirieron de Thermo Fisher Scientific (NoLimits™ Individual DNA Fragments) y fueron utilizados en estos ensayos, incluyendo los templados de 25 pb y pDNA de 2675 pb. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Preparación de las mezclas de P4 con dsDNA

En la tabla 6.3.1, se muestran los volúmenes añadidos para preparar mezclas entre P4 y DNA de los diferentes templados. Cabe mencionar que en todos los casos se usó la misma cantidad en masa de DNA (243,8 ng), lo que indica que cada templado de DNA tiene el mismo número de sitios de unión. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una noche en disolución amortiguadora HEPES con una concentración de 25 mM y pH de 7.4. Se utilizaron dos disoluciones madre de P4: una de 125 μM y otra de 625 μM .

Tabla 6.3.1. Preparación de mezclas de P4 con dsDNA

C_{P4} (μM)	0,0	5,0	10,0	15,0	20,0	37,5	50,0	100,0	150,0	250,0	500,0
$V_{\text{HEPES}}(\mu\text{L})$ *	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
$V_{\text{DNA}}(\mu\text{L})$ **	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
$V_{P4}(\mu\text{L})$	0,0	1,2	2,4	3,6	6,0	9,0	1,2	2,4	3,6	6,0	12
$V_{\text{H}_2\text{O, mQ}}(\mu\text{L})$	12	10,8	9,6	8,4	6,0	3,0	10,8	9,6	8,4	6,0	0,0

* $C_{\text{HEPES, madre}}(\text{mM}) = 250$; ** $C_{\text{DNA, madre}}(\text{ng}/\mu\text{L}) = 162,5$

Ensayo del Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA)

A cada ensayo se agregó amortiguador de carga 6x (Thermo Fisher Scientific), 3 μL , seguido de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% no desnaturizante (25 pb y 100 pb), o en gel de agarosa (400 pb y 2000 pb con Agarose LE de Denville Scientific o pADN 2600 pb con Top Vision Agarose de Thermo Fisher Scientific) en TAE 1x (Jena Bioscience) a 10 V/cm durante el tiempo necesario para la separación del DNA de los complejos (Apéndice A). Para el pDNA se agregó un marcador de 1kb (GeneRuler 1kb DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific). La cantidad de DNA utilizada durante la electroforesis fue de 162,5 ng.

Se detectaron los ácidos nucleicos tiñendo el gel con Sybr® Green I (Thermo Fisher Scientific) diluido en TAE 1x. Posteriormente se reveló a 365 nm con Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad, Estados Unidos), o con C300 de Azure Biosystems (Estados Unidos). El análisis de la densidad de las bandas del DNA libre se realizó con el software de libre ImageJ 1.518j (National Institutes of Health).

Determinación de $K_{d,ap}$

De acuerdo a la ecuación 2,3, se hizo un ajuste de los datos experimentales y se calculó el valor de $K_{d,ap}$, mediante el uso del software Origin ® 8,5 (OriginLab Corporation).

6.4 Evaluación de la unión de P4 a dsDNA al variar el pH

El templado seleccionado para este análisis fue el de 2000 pb. También se prepararon disoluciones amortiguadoras de fosfatos (Na_2HPO_4) con citratos (Ácido Cítrico) (ambos de Sigma-Aldrich) a pH 4 y 6 con concentración de 250 mM, además de HCl previamente normalizado, 0,09 N, (J. T. Baker) para pH 2 (Apéndice A). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Preparación de las mezclas de P4 con ADN

En la tabla 6.4.1, se muestran los volúmenes añadidos para preparar mezclas de P4 con DNA del templado de 2000 pb a los diferentes pH. Se utilizaron dos disoluciones madre de P4: 125 μM y 12,5 μM . Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una noche en la disolución amortiguadora correspondiente con una concentración de 25 mM a excepción del HCl, cuya concentración final fue de 0,009 N.

EMSA

De manera análoga al apartado 6.3, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Agarose LE de Denville Scientific) al 1% en TAE 1x a 10 V/cm. La cantidad de ADN utilizada durante la electroforesis fue de 32,5 ng. La tinción y detección de ácidos nucleicos se realizó de la misma manera que en el apartado 6.3. El análisis de la densidad de las bandas de DNA libre se realizó con el software *ImageJ* 1.518j.

Tabla 6.4.1 Preparación de mezclas de P4 con dsDNA.

C_{P4} (μM)	0,0	2,0	3,0	5,0	7,5	10,0	20,0	30,0	50,0	100,0
$V_{\text{búfer}}$ (μL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V_{DNA} (μL) *	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V_{P4} (μL)	0,0	2,4	3,6	6,0	9,0	1,2	2,4	3,6	6,0	12
$V_{\text{H}_2\text{O, mQ}}$ (μL)	12	9,6	8,4	6,0	3,0	10,8	9,6	8,4	6,0	0,0

* $C_{\text{DNA, madre}}$ (ng/ μL) = 32,5

Determinación de $K_{d,ap}$

Se hizo un ajuste de los datos experimentales de acuerdo a la ecuación 2.3 y se calculó el parámetro de $K_{d,ap}$ mediante el uso del software Origin® 8,5 (OriginLab Corporation). En el caso de pH 2 no se puede ajustar la ecuación 2,3, debido a que la unión máxima observada es del 60% y, por lo tanto, no es comparable con los demás.

Cálculo del punto isoeléctrico

Para ello se recurrió al portal de recursos de bioinformática EXPASy. Se ingresó la secuencia del péptido P4 y se obtuvo la relación pI/ Masa molar. Además, para obtener la carga neta de P4 en función del pH se usó pepcalc.com (InnovaGen AB®), un portal para calcular las propiedades de péptidos.

6.5 Cinéticas de formación de complejos formados entre P4 y DNA

Preparación de las mezclas entre P4 y DNA

Se continuó trabajando con el templado de 2000 pb. La cantidad de DNA utilizado fue 48,8 ng. En la tabla 6.5.1 se muestran las concentraciones elegidas para seguir las cinéticas de la formación de complejos entre P4 y DNA, con cada concentración por duplicado. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente hasta el tiempo t , es decir, hasta el momento de realizar la electroforesis. El tiempo cero fue de la adición de P4 en todos los ensayos. Los tiempos fueron 35 minutos, dos horas, seis horas, 15 horas y 24 horas.

Tabla 6.5.1 Preparación de mezclas entre P4 y DNA.

C_{P4} (μM)	0,0	2,0	4,0	10,0	75,0
$V_{\text{HEPES}}(\mu\text{L})^*$	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
$V_{\text{DNA}}(\mu\text{L})^{**}$	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
$V_{P4}(\mu\text{L})$	0,0	2,4	4,8	1,2	9,0
$V_{\text{H}_2\text{O, mQ}}(\mu\text{L})$	12	9,6	7,2	10,8	3,0

* $C_{\text{HEPES, madre}}(\text{mM}) = 250$; ** $C_{\text{DNA, madre}}(\text{ng}/\mu\text{L}) = 32,5$

EMSA

Se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 6.3. El análisis de la densidad de las bandas de DNA libre se realizó con el software *ImageJ* 1.518j.

6.6 Liberación de DNA de los complejos formados entre P4 y DNA en medios fisiológicos

Para revisar esto, se prepararon dos medios fisiológicos: RPMI 1640 Corning™ Cellgro™ 0,5x, sin y con la adición de SFB al 5% (Corning). Los templados utilizados fueron el de 25 pb y el plásmido de 2675 pb. Los ensayos se realizaron por duplicado. Las disoluciones de P4, HEPES y DNA se filtraron con un filtro de 0,22 µM (Millex-GS) antes de su primer uso.

Preparación de las mezclas entre P4 y DNA

Se mezcló DNA (25 pb o pDNA) con P4 100 µM en HEPES 25 µM con pH 7,4 de acuerdo a la tabla 6.6.1 en una campana de flujo laminar y se dejó incubando durante una noche para asegurar la formación de los complejos entre P4 y DNA. Cabe mencionar que de la mezcla entre P4 y DNA se prepararon 12 ensayos: uno para formar complejos P4-DNA sin adición del medio y a los demás se les adicionó el medio.

Liberación del DNA de los complejos formados

Se prosiguió a la adición de 15 µL de medio RPMI (con o sin SFB 5%) en condiciones de esterilidad para los 11 ensayos marcados como P4 100 µM. Uno de estos fue guardado en congelación y fue considerado como tiempo cero; los demás ensayos se guardaron en congelación durante los siguientes tiempos: 10 min, 30min, 45 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h.

Electroforesis

Después de 24 horas, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% (pDNA) o en gel de poliacrilamida al 6 % no desnaturizante (25 pb) de acuerdo a las condiciones del apartado 6.3.2, agregando el amortiguador de carga unos

momentos antes de iniciar la electroforesis (Loading Dye 6x de Thermo Fisher Scientific). Se utilizó la misma cantidad en masa de DNA para cada experimento, 325 ng. Para el pDNA se agregó un marcador de 1kb (GeneRuler 1kb DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific). Una vez terminada la electroforesis se revelaron los ácidos nucleicos Sybr® Green I (Thermo Fisher Scientific) y se registró en el documentador de geles (C300 de Azure Biosystems). El análisis de la densidad de las bandas reveladas del DNA libre se realizó con ImageJ 1.518j.

Tabla 6.6.1 Preparación de mezclas entre P4 y DNA.

Tratamiento	DNA	P4-DNA sin RPMI	P4-DNA con RPMI
$V_{\text{búfer}}(\mu\text{L})$ *	1,5	1,5	1,5
$V_{\text{DNA}}(\mu\text{L})$ **	3,0	3,0	3,0
$V_{\text{P4}}(\mu\text{L})$	0,0	7,5	7,5
$V_{\text{H}_2\text{O, mQ}}(\mu\text{L})$	10,5	3,0	3,0

* $C_{\text{HEPES, madre}}(\text{mM}) = 250$; ** $C_{\text{DNA, madre}}(\text{ng}/\mu\text{L}) = 162,5$

6.7 Determinación del tamaño de partícula de los complejos entre P4 y DNA

Preparación de P4, pDNA y P4 con pDNA

Se pasó por un filtro de 0,22 μm (Millex ®-GS) disoluciones de P4 1 mg/mL y HEPES 250 mM, además de que se filtró agua desionizada. Se mezclaron pDNA, P4 1 mg/mL, HEPES 250 mM y agua desionizada de acuerdo a la tabla 6.7.1 para formar los complejos entre pDNA y P4 con sus respectivos controles.

Todo este experimento fue planeado de tal manera que se formarán complejos entre DNA y péptido P4 de tal manera que en una mezcla no se encapsule al DNA por completo (P4 insaturado), mientras que en otra si se formarán los complejos (P4 saturado).

Tabla 6.7.1 Preparación de mezclas entre P4 y ADN.

Tratamiento	Blanco	DNA	P4 insaturado	P4 saturado	P4-DNA insaturado	P4-DNA insaturado
$C_{P4}(\mu\text{M})$	0,0	0,0	0,2	1,0	0,2	1,0
$V_{\text{HEPES}}(\mu\text{L})$	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
$V_{\text{DNA}}(\mu\text{L})^*$	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	7,0
$V_{P4}(\mu\text{L})^{**}$	0,0	0,0	0,6	3,0	0,6	3,0
$V_{\text{H}_2\text{O, mQ}}(\mu\text{L})$	13,5	8,5	12,9	10,5	5,9	3,5

* $C_{\text{pDNA, madre}}(\text{ng}/\mu\text{L}) = 162,5$; ** $C_{\text{P4, madre}}(\text{mg}/\text{mL}) = 5,0$

Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

Se lavó una cubeta de cuarzo ZEN2112 (Malvern Instruments Worldwide) con detergente y se enjuagó con agua. Posteriormente se volvió a enjuagar con agua desionizada se dejó secar. Por otra parte, se ejecutó el programa Zetasizer Nano Z 7.12 (Malvern Instruments Worldwide). Para todas las mediciones se utilizó el equipo Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments Worldwide, Inglaterra). Para todas las mediciones se utilizaron las siguientes condiciones mostrados en la tabla 6.7.2. Los datos colectados fueron los diámetros hidrodinámicos de las partículas.

Tabla 6.7.2 Condiciones impuestas en el equipo para DLS.

Parámetro	Condiciones	Observaciones
Temperatura (° C)	25,0	-
Dispersante	Agua	Índice de refracción: 1,30 Viscosidad (cP) = 0,8872
Ángulo	173 °	-
Mediciones	5	Repeticiones:10
Duración (s)	12	-
Láser	633 nm	-

7. Resultados y Discusión

7.1 Espectrometría de masas por MALDI-TOF

En la figura 7.1.1, se muestra el espectro de MALDI-TOF del péptido P4. Con esto se corrobora que el reactivo a utilizar se encuentra en buen estado y con un grado de pureza alto ya que la masa molar teórica esperada del péptido es de 5240,09 kDa, con variación menor al 1% (m/z , carga de +1) ("ExPASy - Compute pI/Mw tool", 2017), el cual forma un pico predominante (m/z_1). La segunda banda que se puede observar en 2620 corresponde a la mitad de la masa molar del péptido que corresponde a la relación masa/carga con carga de +2 (m/z_2).

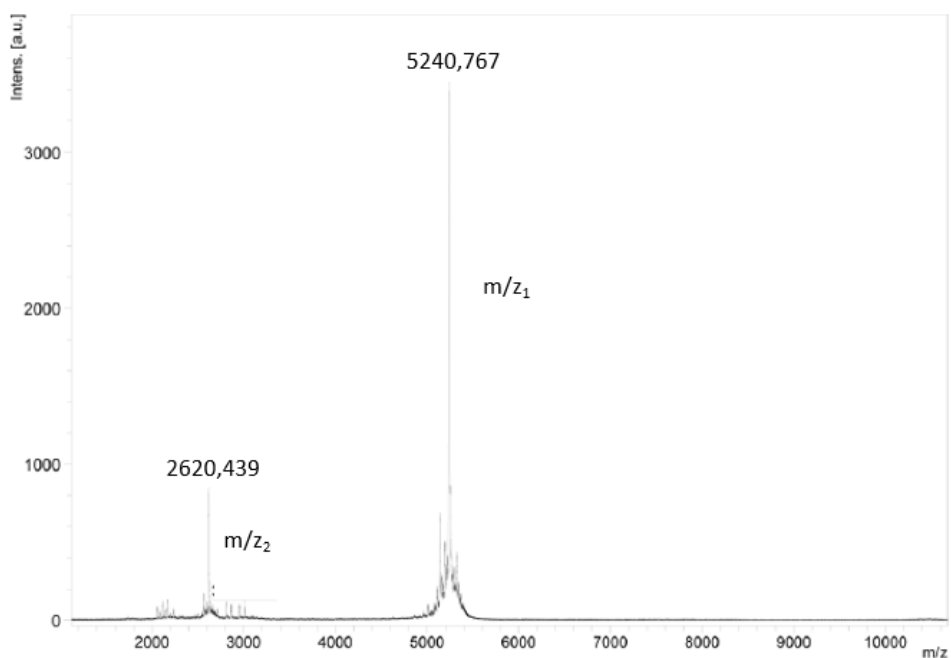


Figura 7.1.1 Resultados de MALDI-TOF. Se muestra que el péptido utilizado está en buen estado ya que la banda m/z_1 corresponde con la masa molar del péptido.

7.2 Evaluación de la unión de P4 a ácidos nucleicos

En la figura 7.2.1 se muestra el cambio en la movilidad electroforética de la formación de complejos entre P4-DNA con el templado de 25 pb. Se muestra con una flecha azul la banda del DNA libre, mientras que en que la roja muestra el DNA totalmente encapsulado, el DNA que no está completamente encapsulado es el barrido que se observa. Este barrido se debe a que son muchos estados de unión debido a que la estequiometría para formar los complejos no es 1 a 1.

Se observa que, efectivamente P4 encapsula al DNA al aumentar la concentración de péptido ya que la banda del DNA libre va desapareciendo

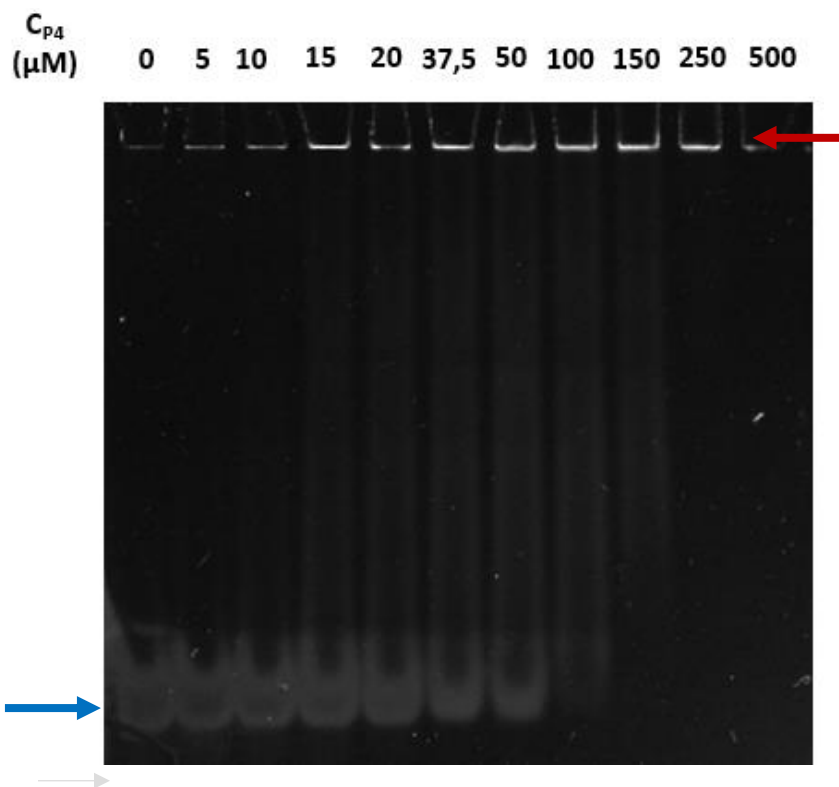


Figura 7.2.2 EMSA para el templado de 25 pb. Se observa la desaparición de la banda del DNA libre conforme aumenta la cantidad de P4.

En el caso del templado de 2000 pb (figura 7.2.2), se observa que el péptido P4 puede encapsular templados de mayor tamaño, por lo que se deduce que P4 es capaz de encapsular ADN de otros tamaños.

También se puede observar en la figura 7.2.2 que, respecto al EMSA de la figura 7.2.1, la concentración de P4 para encapsular o neutralizar completamente al DNA es menor que la requerida para neutralizar DNA de 25 pb. Otro fenómeno es que en el templado de 2000 pb hay dos bandas muy intensas, que indican la presencia de dos poblaciones coexistentes en ciertas concentraciones de P4: una población de DNA libre (forma A), es decir, sin péptido P4 unido y otra de DNA completamente encapsulado (forma B). Lo anterior no se observa cuando se usa DNA de 25 pb (figura 7.2.1).

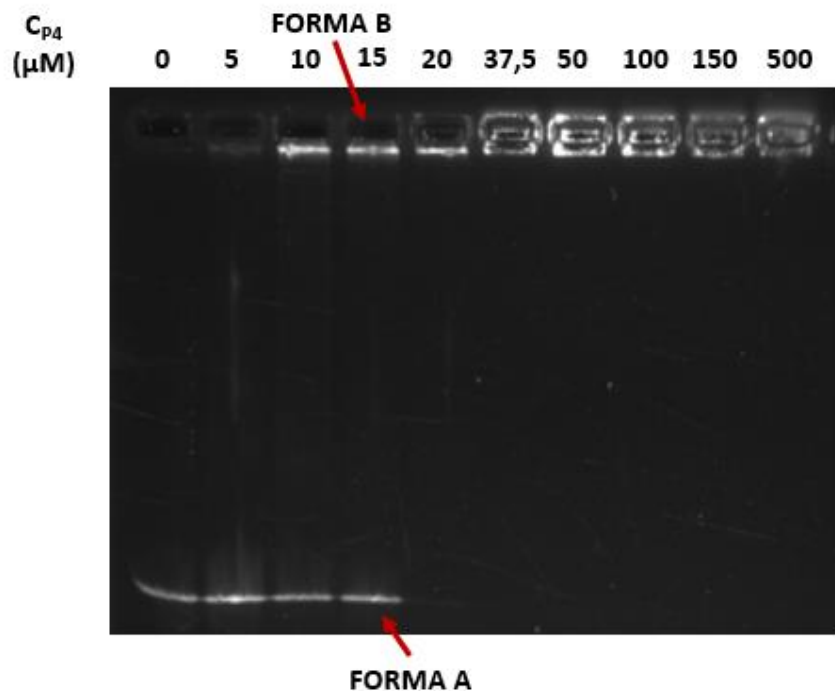


Figura 7.2.2 EMSA para el templado de 2000 pb. Las formas descritas como A y B se encuentran señaladas con una flecha roja.

En la figura 7.2.3, se puede observar la unión de P4 al pDNA o DNA plasmídico que se aisló y purificó. Se observan tres bandas predominantes que representan las diferentes conformaciones del DNA plasmídico: la forma superenrollada (flecha negra), la forma lineal (flecha azul) y la forma circular y relajada del pDNA (flecha

verde); además, se muestra el marcador (M) de pesos moleculares con los tamaños de las bandas importantes.

Se demuestra que P4 puede encapsular pDNA cuya arquitectura es circular y superenrollada, y que es diferente a las de los templados de 2000 pb y 25 pb, que es lineal.

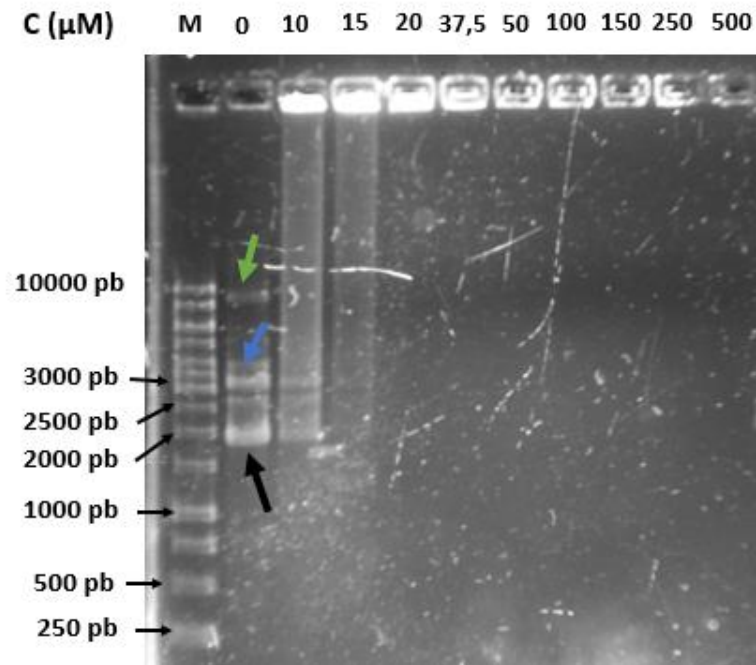


Figura 7.2.3 EMSA para el templado de pDNA. Se observa la encapsulación de pDNA al aumentar la concentración de P4. M indica el carril del marcador.

Finalmente, en la figura 7.2.4, se hace un comparativo de la unión de P4 a todos los templados evaluados. Se observa como la banda que corresponde a DNA libre va desapareciendo al aumentar la concentración de P4. Asimismo, la concentración necesaria para encapsular el 50% de DNA va disminuyendo de forma proporcional al tamaño del templado.

Con base en lo mostrado en la figura 7.2.4, se demuestra claramente que P4 puede ser usado para unir a distintos tipos de DNA de doble hebra de tamaño superior a 25 pb, así como de arquitectura distinta a la lineal, tal como la circular y superenrollada (plásmido). Se debe aclarar que al utilizar la misma cantidad en masa para todos los templados y en todos los experimentos, esto evita que haya un

sesgo derivado por la variación de la cantidad de DNA a recubrir, por lo que solo habrá variación sobre la forma en que P4 recubre los distintos templados.

Por lo tanto, P4 no sólo es capaz de encapsular DNA distinto al RNAi, sino que la formación de los complejos P4-DNA al aumentar el tamaño del templado se da con mayor “afinidad”.

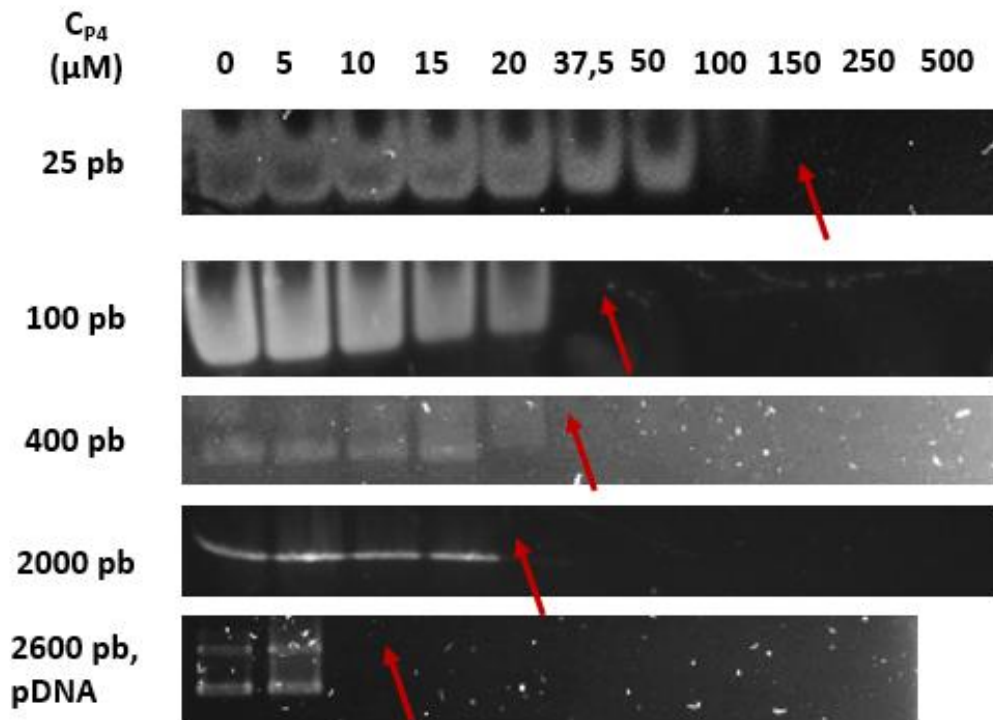


Figura 7.2.4 EMSA para todos los templados utilizados. Se observa la disminución de la cantidad necesaria para unirse P4 al aumentar el tamaño del templado. Se muestra con una flecha roja donde desapareció la banda del DNA libre.

En la figura 7.2.5 se muestra de manera representativa la curva de unión de P4 a DNA de 2000 pb y el ajuste correspondiente con Origin ® 8.5, también se muestra la ecuación a la que se ajusta y el valor del coeficiente de determinación R^2 .

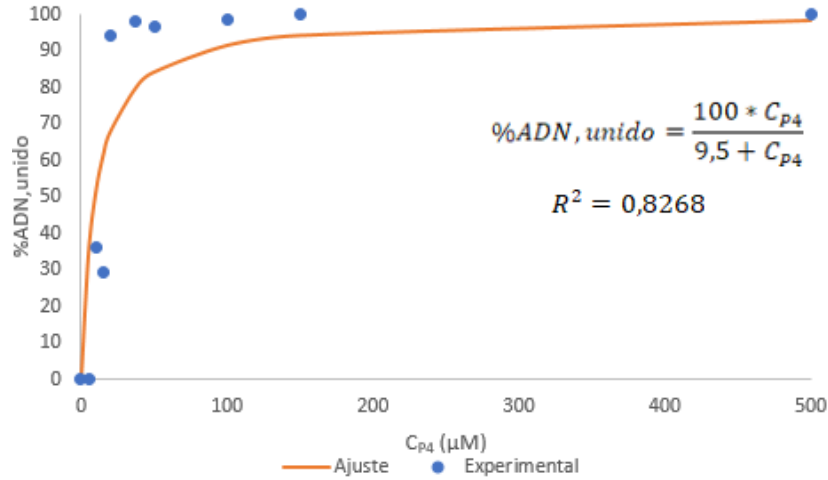


Figura 7.2.5 Curva de unión de P4 a DNA de 2000 pb en función de la concentración de P4. Se muestra a su vez la ecuación a la que se ajusta mejor y el valor de R².

En la figura 7.2.6, se muestran las curvas de unión de P4 a DNA para todos los templados y se comprueba lo antes mencionado, mientras que en la tabla 7.2.1 se muestran los valores de K_{d,ap} obtenidos mediante el ajuste de las curvas con la ecuación 2.3. Las curvas se muestran en función del logaritmo en base 10 de la concentración de P4 debido a que se puede observar con mayor claridad la tendencia observada en los geles.

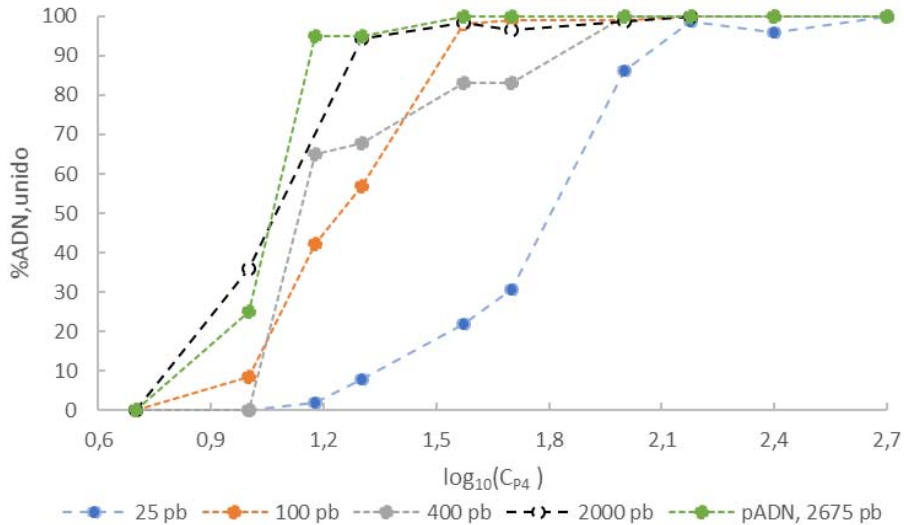


Figura 7.2.6 Curvas de unión de P4 a ADN para todos los templados en función de la concentración de P4. Se observa que la concentración de P4 necesaria para recubrir al ADN disminuye al aumentar el tamaño del templado de ADN es mucho más evidente en entre el templado de 25 pb y los demás.

Tabla 7.2.1 Constantes de disociación aparentes de los complejos P4-DNA ($n=2$)

Tamaño del templado	$K_{d,ap}$ promedio ($\pm \sigma$) [μM]	R^2
25 pb	61,2 (1,8)	0,8827
100 pb	23,0 (3,4)	0,8041
400 pb	14,5 (1,3)	0,7765
2000 pb	9,6 (3,8)	0,8379
2675 pb, pDNA	6,0 (0,8)	0,7866

El valor de $K_{d,ap}$ va disminuyendo siendo el valor mínimo para pDNA y el mayor para el templado de 25 pb: un valor de 61,2 en el caso de un templado de dsDNA de 25 pb y para el plásmido que presenta un valor de 6.

De manera adicional, en la figura 7.2.7 se muestra un diagrama de la variación de $K_{d,ap}$ en función del tamaño del templado. En este se muestra que la constante de disociación tiende a disminuir desde el templado de 25 pb hasta el de 400 pb, donde posteriormente la disminución es menor y podría considerarse casi constante.

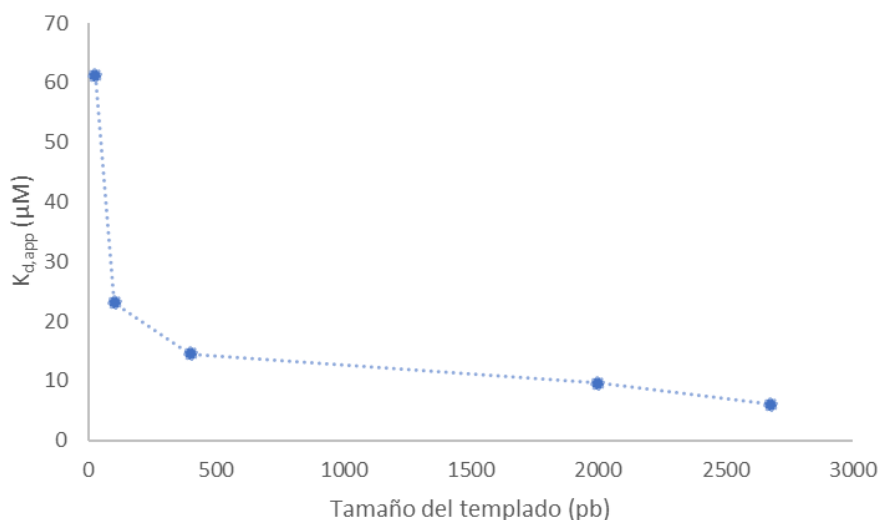


Figura 7.2.7 Variación de la constante aparente de disociación de P4 a DNA en función del tamaño del templado. Se observa la disminución radical hasta el templado de 400 pb, después de este punto la constante de disociación podría considerarse una constante.

La explicación del fenómeno antes mencionado podría deberse a que la unión de P4 a moléculas de DNA de mayor tamaño tiene un mayor carácter cooperativo respecto a las que tienen un menor tamaño, especialmente de 25 pb.

El efecto de la cooperatividad para la formación de los complejos entre P4 y los diferentes DNA se puede explicar de una manera sencilla con la figura 7.2.8, en el caso de un templado pequeño, P4 se une a una molécula de DNA y al aumentar la cantidad de P4 este se une a otro templado (7.2.8 a), pero en el caso de los templados de mayor tamaño, se da la situación de que al aumentar la concentración de P4 este tiene una mayor “afinidad” por unirse al DNA que ya se unió a P4 que al DNA libre (7.2.8 b).

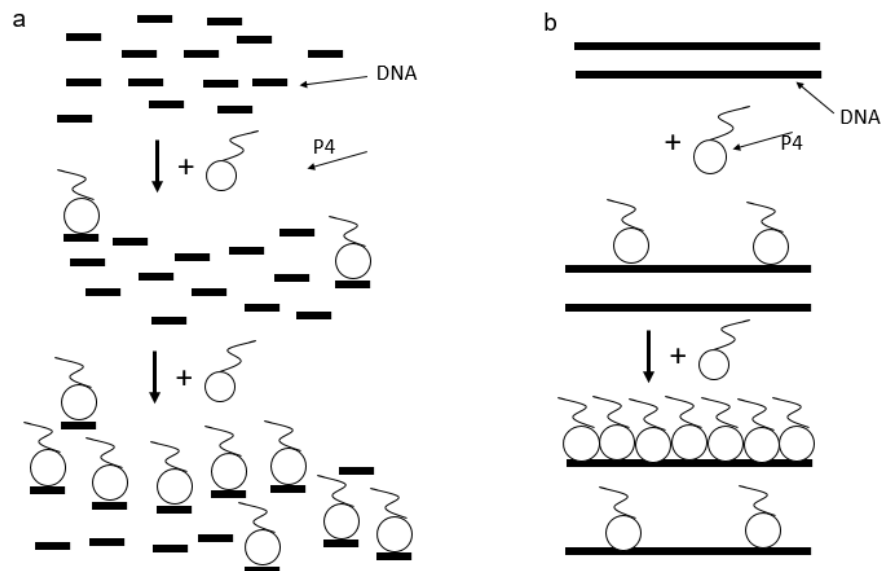


Figura 7.2.8 Transcurso de formación de complejos P4-DNA. Caso a. Templado corto. Se muestra que solo tiene un sitio posible de unión, pero no de nucleación. **Caso b.** Templado largo. Al haber más sitios de unión, también hay más sitios de nucleación.

Esto no se da en templados de menor tamaño ya que su longitud no permitiría la formación de sitios de nucleación (figura 7.2.8 a). Todo esto concuerda con lo mostrado (imágenes de gels y valores de $K_{d,ap}$). A pesar de que se muestra una explicación con base en los sitios de nucleación, se desconoce cuántos sitios de nucleación se pueden formar en cada templado.

Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual P4 se une a los ácidos nucleicos, el factor que ayuda a este “reclutamiento” sería el cambio estructural que sufre P4 al unirse a los ácidos nucleicos (de una estructura *random coil* a una hoja β).

Para el caso del pDNA, la cantidad necesaria de P4 para encapsularlo es la menor de todos debido a dos factores:

- Es el templado de mayor tamaño (2675 pb), por lo que el efecto de la cooperatividad es importante.
- Al tener una conformación superenrollada, característica de los plásmidos, en su mayoría, la interacción entre P4 (específicamente el dominio de unión a ácidos nucleicos) y el DNA se ve más favorecida debido a que hay una mayor concentración de carga por la superficie que ocupa.

7.3 Determinación del tamaño de partícula

En la tabla 7.3.1 se muestra el diámetro que proviene del radio hidrodinámico de las partículas de los complejos P4-pDNA formados.

Tabla 7.3.1 Diámetro de la partícula de formación de los complejos P4-pDNA.

Tratamiento	$d (\pm\sigma)$ (nm)
pDNA 162,5 μ M	54,2(9,8)
P4 1mg/mL	54,9(3,5)
P4-DNA insaturado	238,8 (18,1)
P4-DNA saturado	331,3(104,1)

De acuerdo a los resultados mostrados de los tamaños de partícula, se encontró que los complejos P4-pDNA son de un tamaño entre 200 y 400 nm, por lo que es un sistema polidisperso. Cuando no se forman los complejos completamente de manera completa se encuentran tamaños de partículas menores, esto puede deberse a que se forman los sitios de nucleación solamente. El tamaño de partícula es comparable al de siRNA (200 a 300 nm) y se debería corroborar con otra técnica.

7.4 Efecto del pH sobre la unión de P4 a DNA

En la figura 7.4.1 se muestran los EMSA de la unión de P4 al DNA en los diferentes pH. De acuerdo con la figura antes mencionada si se disminuye el pH hasta un valor de 4, no hay diferencia aparente entre la unión de P4 y DNA, lo que indicaría que la formación de los complejos no se ve afectada por la variación de pH. Cuando se baja a un pH de 2 se observa que la unión de P4 con el DNA se ve afectada.

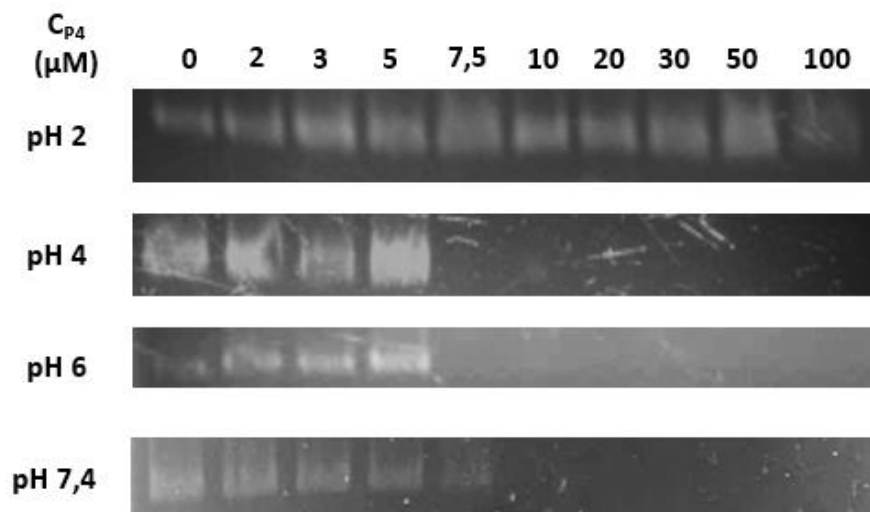


Figura 7.4.1 Unión de P4 a DNA de 2000 pb. Se aprecia hay un gran cambio de pH 2 a pH 4, pero a los demás pH no hay gran diferencia.

En la figura 7.4.2 se muestra el gel obtenido para las diferentes mezclas de P4 con DNA a pH 2, mientras que en la figura 7.4.3 se muestra el de pH 7,4. Se observa el cambio en la unión de P4 al ADN al modificar el pH. A pH 2, se observa que la unión

no es completa, esto puede ser un indicativo de que la unión entre P4 y DNA se ve afectada. La unión de P4 a DNA puede deberse a dos factores. El primero es la protonación de los aminoácidos ácidos en P4, por lo que pierde su carga y de alguna manera afecta la unión. El segundo, se podría atribuir al cambio en la carga del DNA, aunque posiblemente también pueda tratarse de una degradación del DNA.

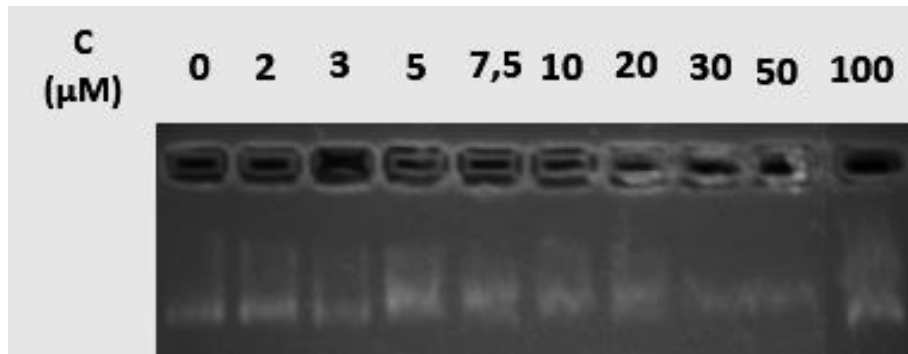


Figura 7.4.2 Unión de P4 a DNA de 2000 pb a pH 2. A este pH, la formación de los complejos entre P4 y DNA se ve afectada y no hay unión completa de DNA a P4.

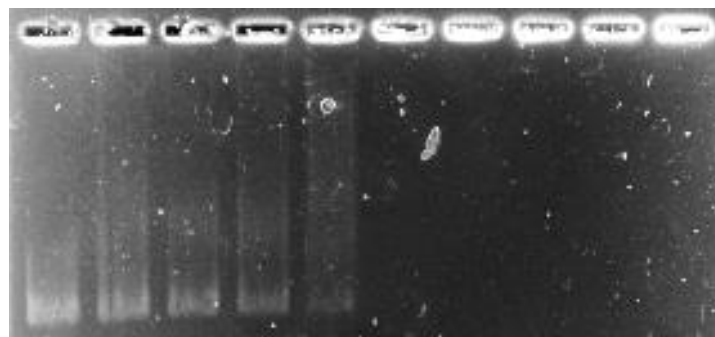


Figura 7.4.3 Unión de P4 a DNA de 2000 pb a pH 7,4. Se observa el mismo patrón de unión que los demás pH, a excepción de pH 2.

En la figura 7.4.4 se muestra de manera representativa la curva de unión de P4 a DNA a pH 7,4, se muestra también el ajuste obtenido con Origin® 8.5, además de la ecuación que describe el comportamiento y el coeficiente de determinación R^2 .

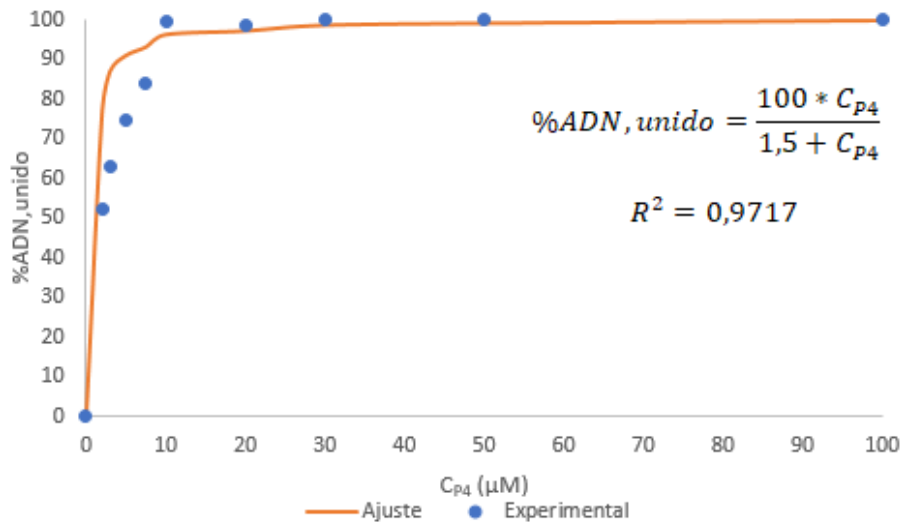


Figura 7.4.4 Curva de unión en función de la concentración de DNA a pH 7.4. Se muestra que al variar las concentraciones de péptido y DNA varía el valor de $K_{d,app}$.

En la figura 7.4.5 se muestran curvas de unión a DNA en función de la concentración a cada pH, respectivamente. Debido a que no hay unión completa (100%) de P4 a DNA a pH 2, por lo tanto, no se realizó el cálculo.

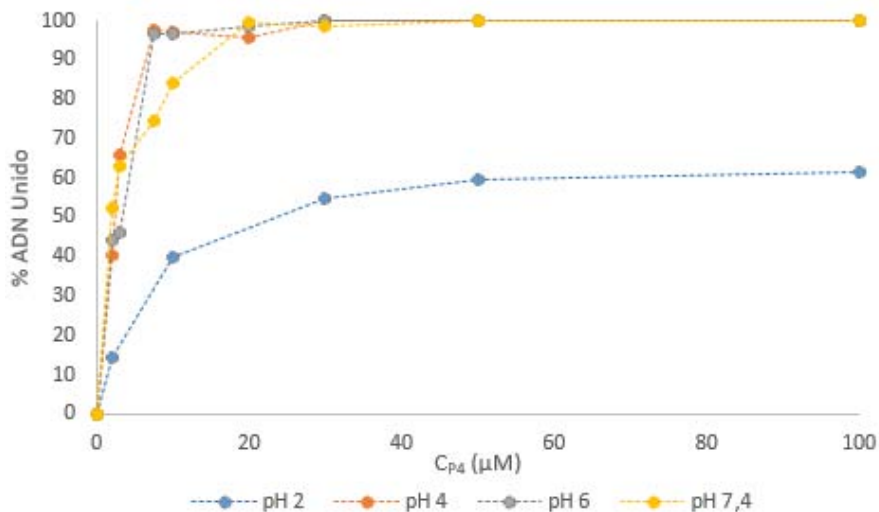


Figura 7.4.5 Curvas de unión en función de la concentración de DNA. Las curvas de unión para los pH 4, 6 y 7,4 no varían entre sí como lo hace la de pH 2. Se observa que a pH 2 hay una máxima unión del 60%.

De acuerdo a la tabla 7.4.1, donde se muestran las constantes de disociación aparentes, no hay variación para los pH 4 y 6, pero a pH 7,4 si la hay

Tabla 7.4.1 Constantes de disociación aparente de los complejos entre P4 y DNA para cada pH (n=2)

pH	$K_{d,ap}$ promedio ($\pm \sigma$) [μ M]	R^2
4	5,03 (0,58)	0,7402
6	5,05 (1,46)	0,7200
7,4	2,92 (1,41)	0,9717

Estos resultados se pueden explicar con el valor de punto isoeléctrico (pI) y la variación de la carga en función del pH. Para la secuencia de P4, el punto isoeléctrico calculado de manera teórica tiene un valor de 9,81 ("ExPASy - Compute pI/Mw tool", 2017). Esto quiere decir que la carga por debajo de este pH es positiva, por lo tanto, no habría cambio de carga positivo a negativo o viceversa en el intervalo trabajado.

En la figura 7.4.6, se muestra la variación de la carga neta de P4 en función del pH. Se observa que la carga neta del péptido es +4 prácticamente, en el intervalo de pH 5 hasta pH 9 ("PepCalc.com - Peptide calculator", 2017). Entonces, se podría asegurar que la unión de P4 al DNA no se ve afectada de pH 6 a pH 7,4. Si se compara lo anterior con la carga neta que tiene el péptido a pH 4, es más elevada pero el cambio en el valor de la constante de unión no se aprecia.

A pH 2 la carga de P4 es mayor, por lo que se sugiere que hay aminoácidos en su secuencia que se protonan, independientemente si se encuentran en la región de P2 o P3. Al analizar la secuencia de P4, se encontró que los glutamatos son los responsables, ya que el valor de pK_a para la cadena lateral es aproximadamente de $4,2 \pm 0,9$ en un péptido (Pace, Grimsley y Scholtz, 2009), por lo que al protonarse pierden su carga. En la figura 7.4.6 se muestra la secuencia de aminoácidos de P4 mostrando donde se localizan los glutamatos.

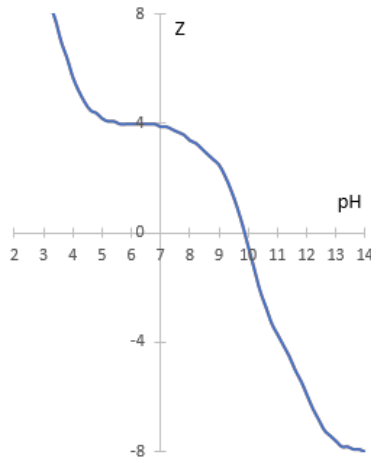


Figura 7.4.6 Curva de la variación de la carga neta del péptido P4 en función del pH. Se observa que de entre pH 5 y 9 hay variación de la carga, pero a pH 4 empieza a aumentar ("PepCalc.com - Peptide calculator", 2017).

De la figura 7.4.7 se observa que la mayor parte de los glutamatos está en la zona del dominio de estabilidad de complejos, por lo que se podría suponer que es la parte "sensible" a los cambios de pH. Entonces, la afinidad de P4 por el DNA a pH 2 se ve afectada debido al perder la carga el dominio de estabilidad de formación de complejos, impidiendo la agregación y formación de los complejos P4-DNA.



Figura 7.4.7 Secuencia de aminoácidos del péptido P4. Se muestran los glutamatos en color rojo, mientras que la secuencia responsable de la unión al DNA está marcada en color azul.

Además, como se había comentado, aunque se conoce que la secuencia responsable de la unión a los ácidos nucleicos en P4 es la mostrada en la figura 7.4.7, no se puede descartar que otros aminoácidos participen en la unión.

Otro factor que afecta en pH 2 la unión de P4 al DNA es la carga del DNA, ya que las bases nitrogenadas en el esqueleto pueden sufrir cambios debido a

protonaciones, las bases susceptibles son las derivadas de la purina, ya que a pH fisiológico están con carga neutra, estas son: Adenina ($pK_a = 3,5$) y Guanina ($pK_{a,2} = 1,6$). También la citosina puede sufrir esta protonación ($pK_a = 4,2$) (Thaplyal y Bevilacqua, 2014). Esto conlleva a que se pierdan los puentes de hidrógeno que se tenían en pH fisiológico, por lo que a este valor de pH, puede decirse que no hay unión de P4 al DNA.

Lo anterior indica que los complejos formados entre el DNA y P4 no pueden ser liberados de pH 4 hasta pH 7,4, por lo que deben interferir otros factores para que se liberen. La importancia de esto es que, cuando estos complejos entren a la célula por endocitosis y la vesícula madure a un lisosoma, los complejos no se liberan por el cambio de pH, de 7,4 a 4,5-5,0 (Alberts et al., 2008), sino que probablemente lo hacen por acción de enzimas hidrolíticas, en este caso serían las proteasas y las nucleasas, que son activas a pH ácido en el lisosoma.

7.5 Cinéticas de la formación de los complejos entre P4 y DNA

El tiempo de formación de los complejos entre P4-DNA se evaluó con el objetivo de encontrar el tiempo mínimo para la formación de los complejos, ya que si se plantea el uso terapéutico del sistema de entrega P4-DNA es importante saber que tan rápido se puede producir el sistema.

En las figuras subsecuentes, 7.5.1 y 7.5.2, se muestran las electroforesis de la formación de los complejos P4-ADN a los 35 minutos y a las dos horas de preparación de las mezclas de P4 con ADN respectivamente.

En los primeros 35 minutos no hay formación de complejos P4-DNA a excepción de la concentración mayor, sin embargo, después dos horas ya se forman complejos P4-DNA en la concentración de 10 μ M. También se observa que en la concentración de 4 μ M se observa que hay dos poblaciones: DNA completamente encapsulado y DNA libre por el efecto de la formación de los sitios de nucleación.

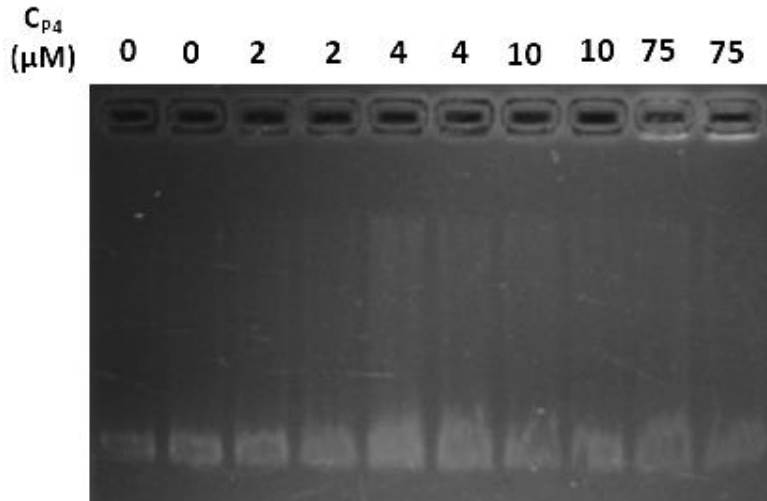


Figura 7.5.1 Formación de complejos después de incubar a temperatura ambiente por 35 minutos. Se muestra que no hay formación de complejos entre P4 y DNA en este tiempo.

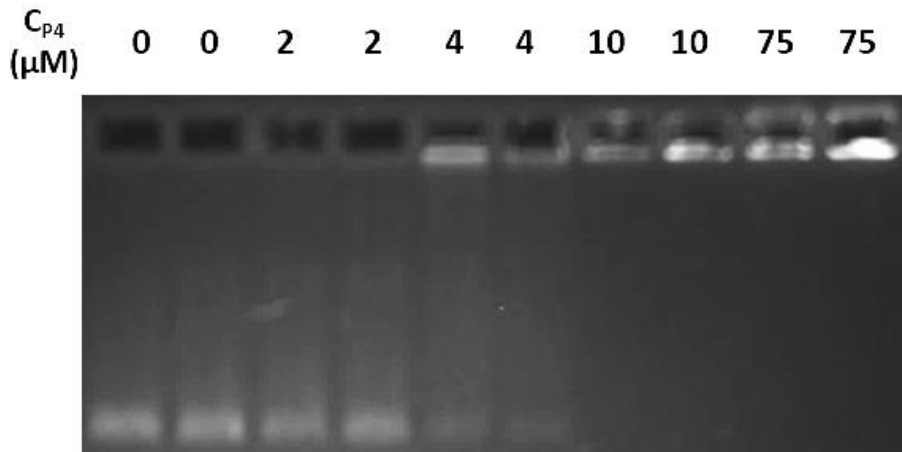


Figura 7.5.2 Formación de complejos después de incubar 2 horas a temperatura ambiente. En este caso se muestra una unión completa en las dos concentraciones mayores de P4.

En las siguientes figuras, 7.5.3 y 7.5.4, se muestra la formación de los complejos P4-DNA a las seis horas y a las 15 horas con 47 minutos. Al compararse estos resultados se observa que no hay cambio aparentemente. Por lo tanto, esto implica que el equilibrio de la formación de los complejos se establece entre estos tiempos.

C_{P4}
(μM) 0 0 2 2 4 4 10 10 75 75

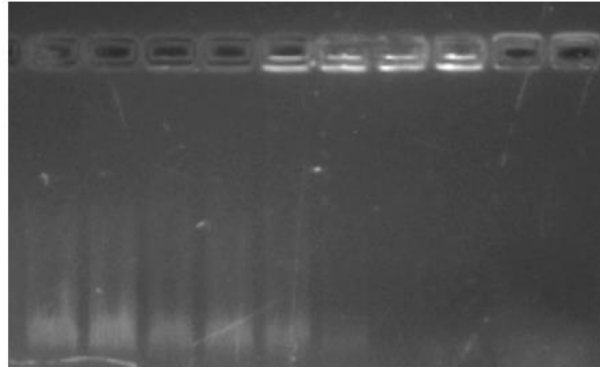


Figura 7.5.3 Formación de complejos después de incubar por seis horas a temperatura ambiente. La formación de los complejos P4-DNA se ha dado a partir de 4 μM .

C_{P4}
(μM) 0 0 2 2 4 4 10 10 75 75

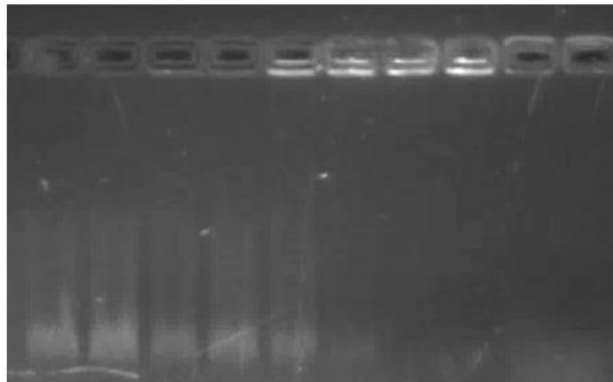


Figura 7.5.4 Formación de complejos después de incubar por 15 horas 47 minutos a temperatura ambiente. Parece no haber cambio respecto a la figura 7.5.3.

Los resultados mostrados se contrastarán con los de la figura 7.4.3. En la figura 7.5.5 se muestran las curvas de unión de P4 a DNA en función del tiempo. Con base en esta figura, a concentraciones de P4 mayores la encapsulación se da con mayor rapidez que a menores concentraciones, tal como es el caso de las concentraciones 10 μM y 75 μM , donde se podría decir que la mayor parte de la encapsulación se dio en dos horas prácticamente. En el caso de la concentración 4 μM , la tendencia no se observa debido a errores experimentales.

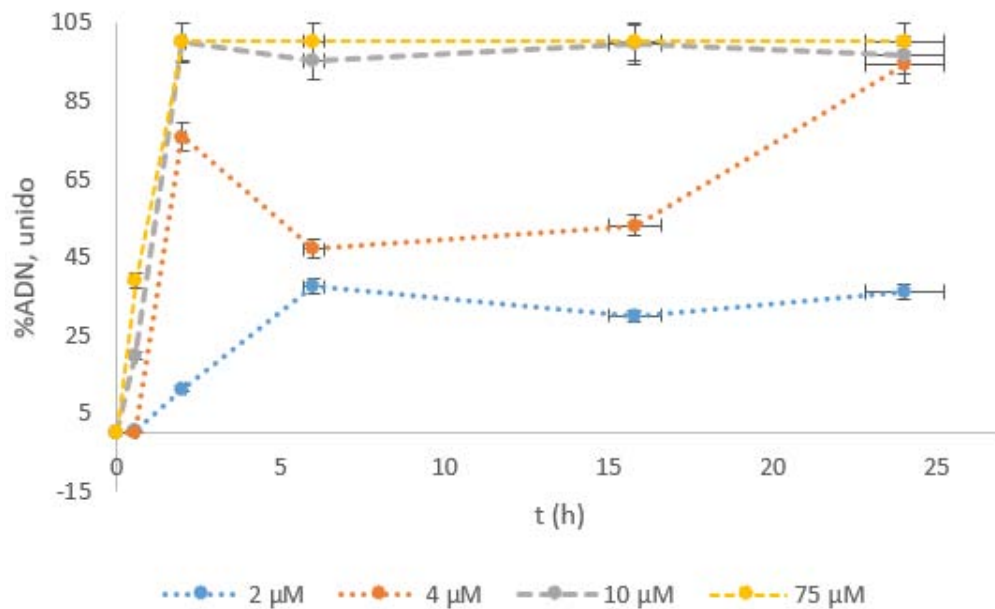


Figura 7.5.5 Formación de complejos P4-DNA en función del tiempo. Se muestran las barras de error porcentual (n=2).

De acuerdo con lo observado en la figura, y haciendo un consenso con todas las curvas de unión en función del tiempo, se determina que el tiempo mínimo para poder encapsular al ADN es de dos horas para concentraciones mayores a 10 μM de péptido. En el caso de la concentración 4 μM de P4 no se puede concluir algo, pero a la concentración de 2 μM se determina que el tiempo mínimo para formar los complejos es de 6 horas. La justificación por la cual se deja incubando una noche es que así se asegura la formación de los complejos P4-DNA independientemente de la concentración.

7.6 Liberación de los complejos entre P4 y DNA en medios fisiológicos

En RPMI 0,5x

El medio RPMI es un medio usado para el cultivo de células de mamífero. Este medio contiene sales tales como NaCl (6 g/L) y bicarbonato de sodio como

amortiguador (2 g/L), vitaminas (ácido fólico y riboflavina) y aminoácidos (como L-glutamina) ("RPMI-1640 Media Formulation", 2017).

En la figura 7.6.1 se muestra la electroforesis para la liberación de DNA de 25 pb de los complejos P4-DNA. Se observa que el DNA se va liberando poco a poco y en una hora esta banda desaparece de manera gradual. También se debe aclarar que no todo el DNA del control P4-DNA está en la forma de complejo.

t (h)	DNA	P4-DNA	0,17	0,5	0,75	1	1,5	2	4	6	8	24
-------	-----	--------	------	-----	------	---	-----	---	---	---	---	----

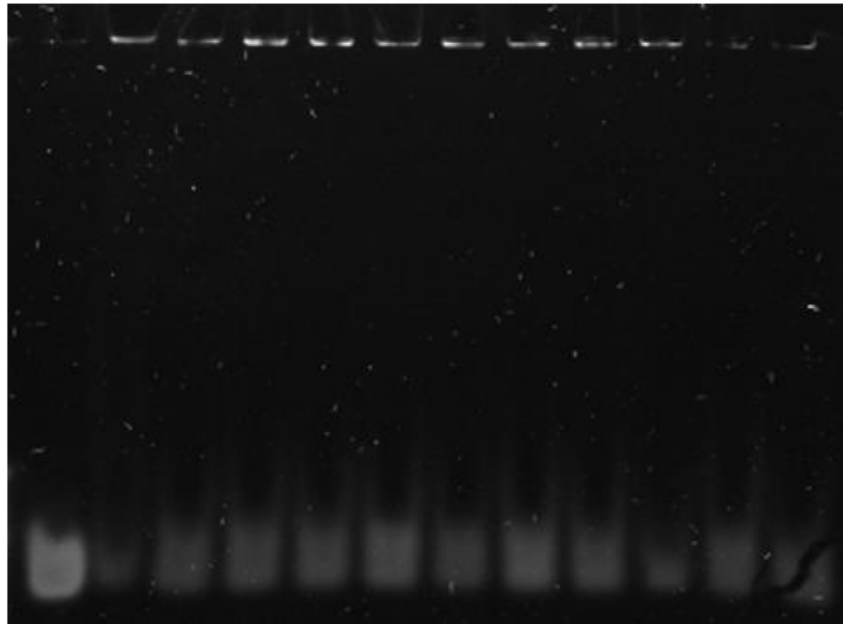


Figura 7.6.1 Liberación de DNA de los complejos P4-DNA de 25 pb en RPMI. Se observa que el DNA se va liberando y luego esta banda desaparece.

Por otra parte, en la figura 7.6.2 se muestra la curva de liberación del DNA en función del tiempo, comprobándose la tendencia que se explicaba. La posible explicación a lo sucedido no pudo ser la degradación ya que el ambiente estaba libre de nucleasas, pero probablemente la cantidad de sales en conjunto, en especial la del NaCl y de otros componentes como los aminoácidos eviten que la banda del DNA libre no se desplace de manera adecuada durante la electroforesis. Por lo tanto, se prueba que hay liberación de DNA pero no se pudo determinar cuanto es liberado de los complejos formados.

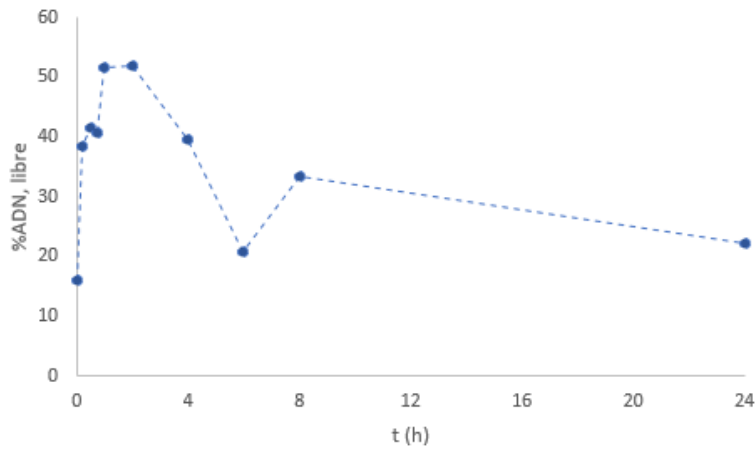


Figura 7.6.2 Curva de liberación del DNA en función del tiempo. Al cuantificarse el DNA libre, se puede determinar cuánto DNA se liberó al tiempo establecido.

Para el caso de pDNA de 2675 pb se muestra en la figura 7.6.3, que, a diferencia del templado de 25 pb, no hubo liberación de pDNA ya que también se observa en la parte superior del gel (en los pocillos) los complejos P4-pDNA. Si hubo liberación se necesitarían métodos más sensibles que EMSA para probarlo. Por lo tanto, se puede concluir que P4 además de recubrir ADN plasmídico lo protege de su liberación en presencia de medios relevantes fisiológicamente.

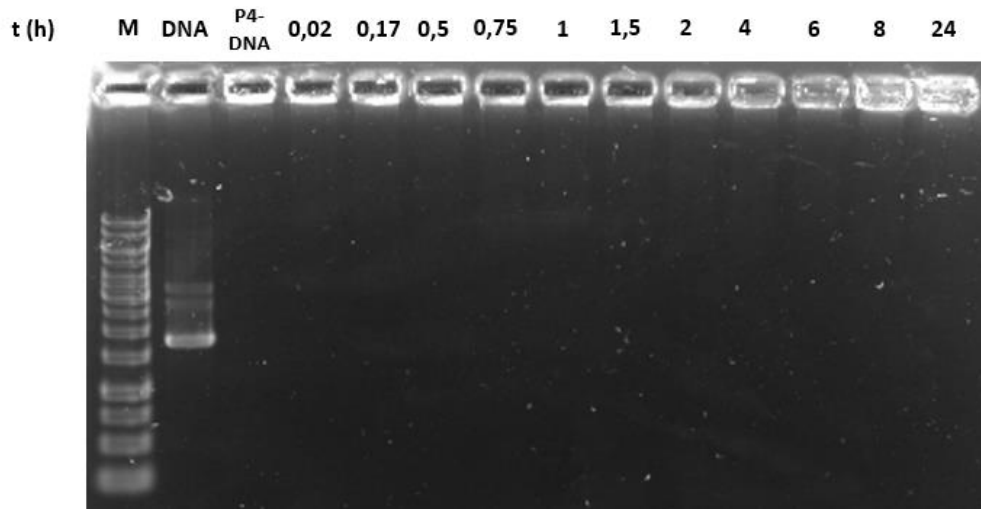


Figura 7.6.3 EMSA de la liberación de pDNA complejo con P4. M indica el marcador de pesos moleculares.

Lo anterior lleva a concluir que la cooperatividad tiene un efecto importante en la estabilidad de complejos P4-DNA. Esto se hace con base en la observación de que los complejos de P4 con el templado de DNA de 25 pb, que fueron menos cooperativos, también se disociaron más rápido en medios fisiológicos cuando son comparados con complejos formados por P4 y pADN (los cuales tuvieron una interacción más cooperativa).

En RPMI 0,45x + SFB 5%

Con el objetivo de simular un medio al que se vería en condiciones *in vitro* e *in vivo*, se usó un medio con mayor complejidad, RPMI suplementado con Suero Fetal Bovino al 5% (SFB). Esto permitió retar aún más la estabilidad de los complejos P4-DNA. Debido a la complejidad del medio se esperaba una mayor liberación de DNA, así como su degradación posterior a ello. El medio que contiene más proteínas, tales como la fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa, nucleasas, entre otras, llegando a contener de 3,2 a 7,0 g/dL de proteínas totales (Baker, 2016).

En la figura 7.6.4 se muestra la liberación de DNA de los complejos P4-DNA para el caso del templado de 25 pb. Lo que se encontró fue que no aumentó la intensidad de la banda del DNA libre, sino que disminuyó.

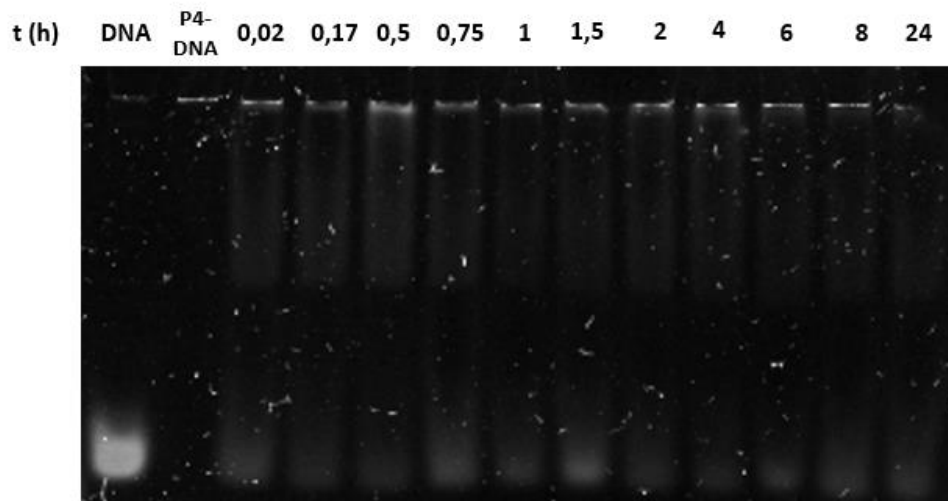


Figura 7.6.4 Liberación de DNA de 25 pb complejo con P4 en RPMI + SFB. SE observa que la intensidad de la banda disminuye.

Se muestra en la figura 7.6.5 la liberación del DNA del templado de 25 pb en función del tiempo. Se observa que probablemente a las dificultades anteriormente mencionadas, el DNA liberado no hay movilidad cuando se realiza la electroforesis por la cantidad de sales presentes, además de que el ADN se está uniendo a otras proteínas probablemente.

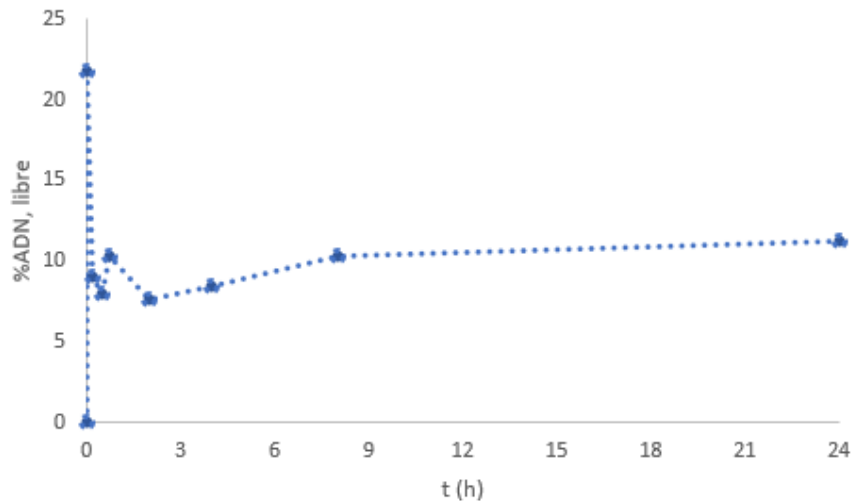


Figura 7.6.5 Curva de liberación de DNA de los complejos P4-DNA de 25 pb en RPMI + SFB. Se observa la liberación del ADN, el equilibrio se logra de manera rápida llegando a estar entre el 10% de lo liberado.

En la figura 7.6.6, se muestra una electroforesis de las diferentes mezclas entre P4 y pDNA en RPMI con SFB a 5%. Se observa que, como cuando se usó solo medio RPMI (figura 7.6.3), que no hay liberación significativa de pDNA, solo la presencia de un barrido tenue, pero mucho menor que para el DNA de 25 pb.

Lo observado en las figuras 7.6.3 y 7.6.6 es de importancia, ya que indica que el DNA plasmídico encapsulado con P4 no solo resiste mayormente a la liberación del medio celular en condiciones normales, sino que también lo hace bajo las condiciones relevantes a las fisiológicas encontradas en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Por consiguiente, P4 puede servir mejor para la entrega de templados de DNA de mucho mayor tamaño que el DNA de 25 pb (y por lo tanto de RNAi), cumpliendo con el objetivo que se había planeado al inicio del proyecto. Por lo tanto, puede

convenir que P4 se utilice para liberar templados de tamaño mucho mayor al RNAi debido a que otorgan mayor estabilidad en medios complejos.

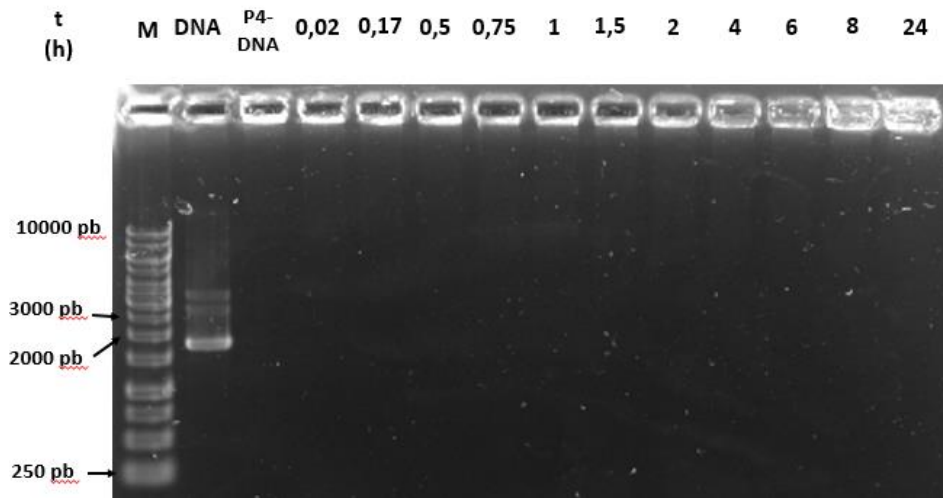


Figura 7.6.6 EMSA de la liberación de pDNA complejo con P4 en RPMI + SFB. M indica el marcador de pesos. No se observa liberación del plásmido en el intervalo de tiempo trabajado.

Finalmente, al ser la unión de P4 con pADN sea más cooperativa respecto al ADN de 25 pb, esta formación de los complejos supramoleculares confiere un grado de protección incluso en presencia de SFB.

Lo anterior, a pesar de que indica que puede sobrevivir a un medio celular, no se puede asegurar que el sistema de entrega con plásmidos pudiese entrar de manera eficiente en una célula, faltaría hacer estos estudios para determinar si se puede dar la entrada de las nanopartículas de P4-DNA en diferentes líneas celulares.

8. Conclusiones

- El péptido P4 encapsula templados de DNA de mayor tamaño con una mayor “afinidad” respecto a los templados cortos, en el cual se ha evidenciado el efecto la cooperatividad en la formación de complejos P4-DNA, por lo que se requieren menores cantidades de P4 para encapsular templados de DNA más grandes respecto a los más pequeños.
- Al caracterizar los complejos P4-pDNA, se encontró que el tamaño de las partículas es de 200-400 nm, similar al que forman los complejos P4-RNAi reportados previamente.
- La estabilidad de los complejos P4-DNA, y por lo tanto la cooperatividad, no se ve afectada por el cambio de pH de interés biológico, esto es, de pH 7,4 a pH 4,5 a 5, por lo que el escape endosomal de los complejos P4-DNA se puede explicar por la acción de las proteasas.
- El tiempo mínimo para la formación de los complejos P4-DNA a cualquier concentraciones mayores que 10 μ M es de 2 horas, pero a cualquier concentración es de 16 horas.
- El efecto de la cooperatividad interviene en la estabilidad de los complejos debido a que se halló que los complejos P4-pDNA son más estables en un medio de cultivo de células de mamífero que uno de P4-DNA de 25 pb. Esto asegura la llegada del DNA a la célula, aunque no su entrada.
- P4 ha demostrado ser un sistema de entrega más apropiado para templados DNA grandes, por lo tanto, su uso podría trasladarse a la entrega de plásmidos, por ejemplo.

Se espera en un futuro cercano la caracterización de los complejos P4-pDNA por microscopía de fuerza atómica, además de que se realicen ensayos sobre la entrada de estos complejos en líneas celulares de mamífero, todo esto con el objetivo de extender el uso de P4 hacia templados de DNA como los plásmidos.

9. Bibliografía

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell* (6a ed., pp. 730,740-741). Nueva York: Garland Science Taylor & Francis.
2. Aliabadi, H., Landry, B., Sun, C., Tang, T., y Uludağ, H. (2012). *Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: Where do we stand?*. *Biomaterials*, 33(8), 2546-2569.
3. Baker, M. (2016). *Reproducibility: Respect your cells!*. *Nature*, 537(7620), 433-435.
4. Berbel Manaia, E., Paiva Abuçafy, M., Chiari-Andréo, B., Lallo Silva, B., Oshiro-Júnior, J., y Chiavacci, L. (2017). *Physicochemical characterization of drug nanocarriers*. *International Journal Of Nanomedicine*. Dovepress,12, 4991-5011.
5. Bhattacharjee, S. (2016). *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?*. *Journal Of Controlled Release*, 235, 337-351.
6. Bisswanger, H. (2008). *Enzyme kinetics* (pp. 10-14). Weinheim: Wiley-VCH.
7. Chan, W. (2006). *Bionanotechnology Progress and Advances*. *Biology Of Blood And Marrow Transplantation*, 12(1), 87-91.
8. Delong, R., y Zhou, Q. (2015). *Investigating Protein. Introductory Experiments On Biomolecules And Their Interactions* (pp.67-72). Estados Unidos: Academic.
9. Erdman, V., y Barciszewski, J. (2014). *From nucleic acids sequences to molecular medicine* (pp. 19-35). Londres: Springer.
10. Eckmann, C., y Jantsch, M. (1997). *Xlrpba, a Double-stranded RNA-binding Protein Associated with Ribosomes and Heterogeneous Nuclear RNPs*. *The Journal Of Cell Biology*, 138(2), 239-253.
11. ExPASy - Compute pI/Mw tool. (2017). Web.expasy.org. Último acceso el 24 Noviembre de 2017, de http://web.expasy.org/compute_pi/
12. Ferrell Jr, J. (2009). *Q&A: Cooperativity*. *Journal Of Biology*, 8(6), 53.

13. Guidotti, G., Brambilla, L., y Rossi, D. (2017). *Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics*. Trends In Pharmacological Sciences, 38(4), 406-424.
14. Hellman, L., y Fried, M. (2007). *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions*. Nature Protocols, 2(8), 1849-1861.
15. Hernandez Garcia, A. Álvarez, Z., Simkin, D., Madhan, A., Pariset, E., Tantakitti, E., Lee, S. S., Kiskinis, E. y Stupp, S. I. *Peptide-siARN supramolecular particles for neural cell transfection* (en proceso de publicación).
16. Hobson, D. (2011). *Nanotechnology. Comprehensive Biotechnology*, 3, 683-697.
17. Kanasty, R., Dorkin, J., Vegas, A., y Anderson, D. (2013). *Delivery materials for siRNA therapeutics*. Nature Materials, 12(11), 967-977.
18. Lomakin A., Teplow D.B., y Benedek G.B. (2005) Quasielastic Light Scattering for Protein Assembly Studies. En: *Sigurdsson E.M. (eds) Amyloid Proteins*. Methods in Molecular Biology, 299. Humana Press.
19. Merten, O., y Al-Rubeai, M. (2011). *Viral vectors for gene therapy (pp 10-27)*. Totowa (N.J.): Humana Press.
20. Palmerston Mendes, L., Pan, J., y Torchilin, V. (2017). *Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy*. Molecules, 22(9), 1401.
21. Patel, T., Chojnowski, G., Astha, Koul, A., McKenna, S., y Bujnicki, J. (2017). *Structural studies of RNA-protein complexes: A hybrid approach involving hydrodynamics, scattering, and computational methods*. Methods, 118-119, 146-162.
22. PepCalc.com - Peptide calculator. (2017). Pepcalc.com. Último acceso el 24 de Noviembre de 2017, de <http://pepcalc.com/>
23. Pace, C., Grimsley, G., y Scholtz, J. (2009). *Protein Ionizable Groups: pKa Values and Their Contribution to Protein Stability and Solubility*. Journal Of Biological Chemistry, 284(20), 13285-13289.

24. Prazeres, D., y Monteiro, G. (2014). *Plasmid Biopharmaceuticals*. Microbiology Spectrum, 2(6),1-2.
25. Ramsden, J. (2016). *Nanotechnology* (pp. 1-3, 62). William Andrew Applied Science.
26. Ryter, J. (1998). *Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA*. The EMBO Journal, 17(24), 7505-7513.
27. Ryter, J. and Schultz, S. (2018). *Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA*. [En línea] Rcsb.org. Disponible en : <https://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1DI2> [Consultado el 7 de enero de 2018].
28. RPMI-1640 Media Formulation. (2017). Sigma-Aldrich. Recuperado el 27 de noviembre de 2017, from <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-formulations/rpmi-1640.html>
29. Sharma, V., Rungta, P., y Prasad, A. (2014). *Nucleic acid therapeutics: basic concepts and recent developments*. RSC Advances, 4(32), 16618.
30. Stefan, M., y Le Novère, N. (2013). *Cooperative Binding*. Plos Computational Biology, 9(6), e1003106.
31. Thaplyal, P., y Bevilacqua, P. (2014). *Experimental Approaches for Measuring pKa's in RNA and DNA*. Methods In Enzymology, 189-219.
32. Wang, X., Bergenfeld, I., Arora, P., y Canary, J. (2012). *Reversible Redox Reconfiguration of Secondary Structures in a Designed Peptide*. Angewandte Chemie International Edition, 51(48), 12099-12101.
33. Wong, J., Mohseni, R., Hamidieh, A., MacLaren, R., Habib, N., y Seifalian, A. (2017). *Will Nanotechnology Bring New Hope for Gene Delivery?*. Trends in Biotechnology, 35(5), 434-451.
34. Zhou, W., Su, M., y Cai, X. (2017). *Advances in Nanoparticle Sizing in Suspensions: Dynamic Light Scattering and Ultrasonic Attenuation Spectroscopy*. KONA Powder And Particle Journal, 34(0), 168-182.

APÉNDICE A. Reactivos y métodos

A.1 Preparación del medio Luria-Bertani (LB)

Se disolvió 1,0 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura (Sigma-Aldrich™) y 1,0 g de NaCl en 100 mL de agua desionizada. Posteriormente, se esterilizó en la autoclave durante 15 minutos a 1 atm. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Antes de sembrar se agregó kanamicina 1000x (50 mg/mL), tal que la concentración final quedase 1x.

A.2 Preparación de geles para electroforesis

a. Gel de poliacrilamida al 6% no desnaturalizante

Se mezclaron 4128 µL de agua destilada, 1750 µL de TAE 4x, 1050 µL de mezcla acrilamida/bisacrilamida 29:1 al 40% preparada anteriormente (Sigma-Aldrich™), 12 µL de TEMED (Bio Rad®) y 60 µL de persulfato de amonio al 10% (Sigma-Aldrich™). Se vació esta mezcla en un molde de vidrio para un gel de 1 mm (Bio Rad®) y se colocó un peine de 15 pozos (Bio Rad®), se usó hasta la polimerización de la mezcla (15 a 20 minutos). El molde tiene las dimensiones de 10,1 cm por 7,3 cm.

b. Gel de agarosa (concentración requerida).

Se disolvió lo necesario de agarosa (Agarose LE de Denville Scientific o Top Vision Agarose de Thermo Fisher Scientific) para preparar 35,0 mL de gel. se agregó el volumen de TAE 1x en un matraz Erlenmeyer y se calentó hasta la disolución de la agarosa. Cuando se enfrió lo suficiente, se vertió en la cámara para preparar geles (Thermo Scientific™ Owl EasyCast B1), la cual tiene las dimensiones de 9 cm por 11 cm. Las concentraciones utilizadas para preparar los geles son de 1,5%, 1% y 1% para los templados de 400 pb, 2000 pb y 2600 pb, respectivamente.

A.3 Electroforesis de los diferentes templados

a. 25 pb: se realizó durante 30 minutos en la cámara Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell de Bio Rad ®.

b. 100 pb: se realizó durante 40 minutos en la cámara Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell de Bio Rad ®.

c. 400 pb: se realizó durante 45 minutos en la cámara Thermo Scientific™ Owl EasyCast B1.

d. 2000 pb: se realizó durante 50 minutos en la cámara Thermo Scientific™ Owl EasyCast B1.

e. 2675 pb, pDNA: se realizó durante 50 minutos en la cámara Thermo Scientific™ Owl EasyCast B1.

A.4 Preparación de disoluciones amortiguadoras

a. HEPES 20 mM: se disolvió 596 mg de HEPES (Sigma-Aldrich™) en 7 mL de agua, y se estableció el pH 7,4 con HCl concentrado. Llevar a volumen final de 10 mL.

b. Fosfatos con citratos: se agregaron los volúmenes de Na₂HPO₄ y ácido cítrico (Sigma-Aldrich™), ambos 250 mM, para alcanzar los valores de pH 4 y 6 en un volumen de 1 mL. En el caso de pH 4 se mezclaron 443 µL de ácido cítrico y 557 µL de Na₂HPO₄, mientras que para pH 6, 218 µL de ácido cítrico y 782 µL de Na₂HPO₄.

APÉNDICE B. Imágenes suplementarias

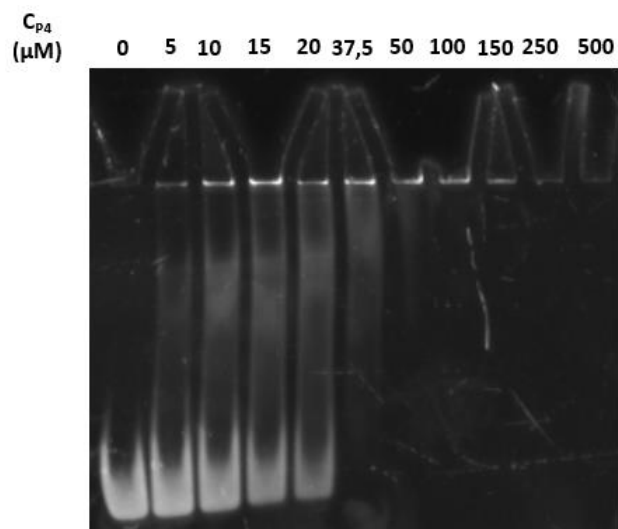


Figura B1. EMSA para el templado de 100 pb. Se realizó en gel de poliacrilamida al 6%. Se observa que el DNA es encapsulado por P4 hasta la concentración de 100 μM , aunque la unión completa se da a 37,5 μM .

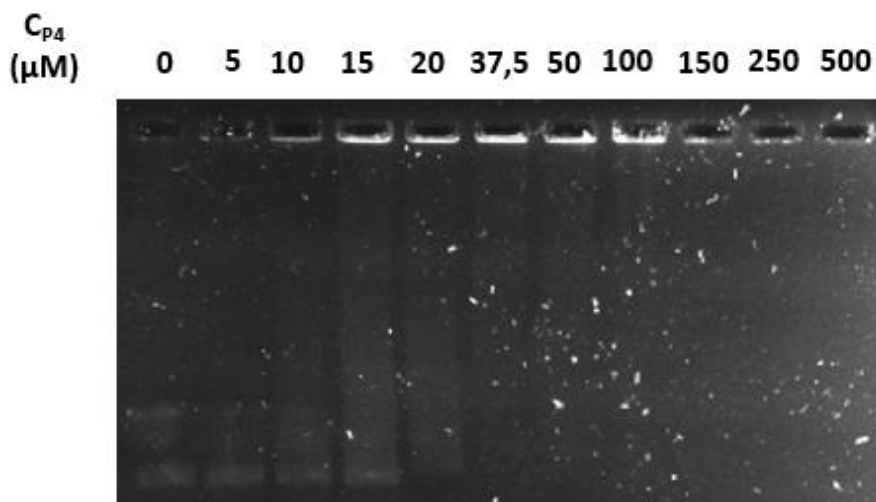


Figura B2. EMSA para el templado de 400 pb. Se realizó en gel de agarosa. Se observa que el ADN es encapsulado por P4 en una concentración similar respecto al templado de 100 pb.

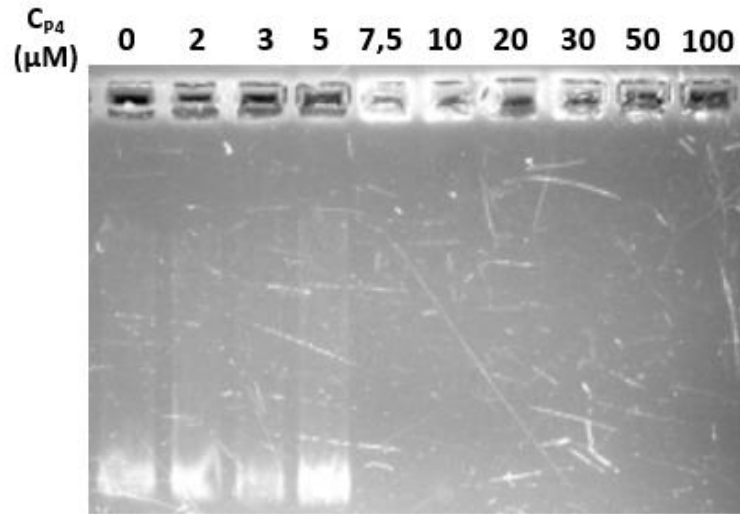


Figura B3. EMSA para el templado de 2000 pb a pH 4. Se observa que el DNA es encapsulado por P4 en una concentración similar respecto al pH 7,4.

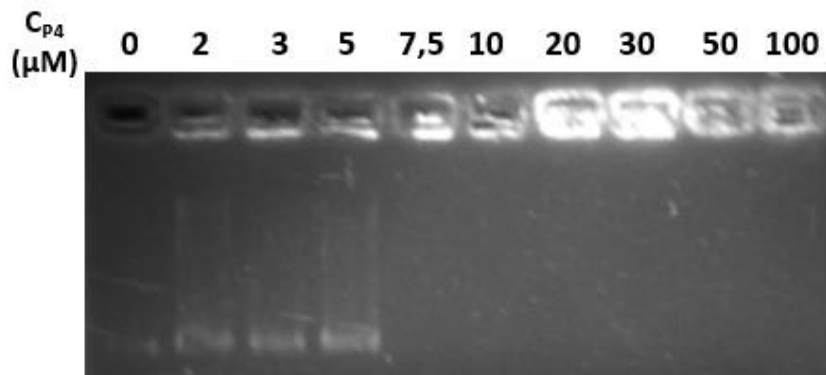


Figura B4. EMSA para el templado de 2000 pb a pH 6. Se observa que el DNA es encapsulado por P4 en una concentración similar respecto al pH 7,4, pero es el mismo que a pH 4.