



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

POLÍMEROS DE PROTEÍNA CATIÓNICOS QUE UNEN A OLIGONUCLEÓTIDOS  
DE ADN ANTISENTIDO: FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS, ESTABILIDAD Y  
ENSAYOS BIOLÓGICOS

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. Oscar de Jesús Vargas Dorantes

Dr. Armando Hernández García  
Instituto de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.,

agosto de 2020



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.

### **Miembros del jurado:**

<b>Presidente</b>	Dra. Anna Kozina	Instituto de Química, UNAM
<b>Vocal</b>	Dra. Mayra Silva Miranda	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
<b>Vocal</b>	Dra. Yareli Rojas Aguirre	IIM, UNAM
<b>Vocal</b>	Dra. Daniela Araiza Olivera Toro	Instituto de Química, UNAM
<b>Secretario</b>	Dr. Gerardo Leyva Gómez	Facultad de Química, UNAM

### **Sitio donde se desarrolló el proyecto:**

Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología, Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

### **Asesor:**

DR. ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA

### **Sustentante:**

Q. OSCAR DE JESÚS VARGAS DORANTES

## **Agradecimientos**

Agradezco a CONACyT por el apoyo (beca) otorgado de los semestres 2018-2 al 2020-1, con el correspondiente CVU, 888097. Así mismo, se agradece por el apoyo financiero otorgado para la realización del proyecto mismo, Atención a Problemas Nacionales 2016, proyecto 2103.

Por otra parte, se agradece al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por permitir el desarrollo de dicho proyecto.

También se agradece a la Dra. Bertha Espinoza del Instituto de Investigaciones Biomédicas, a la Dra. Daniela Araiza del Instituto de Química y al Dr. Luis Vaca Domínguez del Instituto de Fisiología Celular por haber proporcionado materiales y reactivos para la realización del proyecto, así como a la Q. María de la Paz Orta Pérez del Instituto de Química por permitir el uso de instrumentación necesaria para el mismo fin.

## 1. Introducción

Con la culminación del Proyecto del Genoma Humano, se conoce que la etiología de una patología puede ser genética y/o ambiental <sup>[1]</sup> tal como la fibrosis cística, la distrofia muscular de Duchenne, el cáncer, entre otras; por lo que interferir con la expresión del gen causante de la enfermedad es una alternativa para el tratamiento de éstas <sup>[2]</sup> <sup>[3]</sup>. La interferencia de genes se puede realizar con microRNAs, RNAs cortos interferentes u oligonucleótidos antisentido <sup>[1]</sup>.

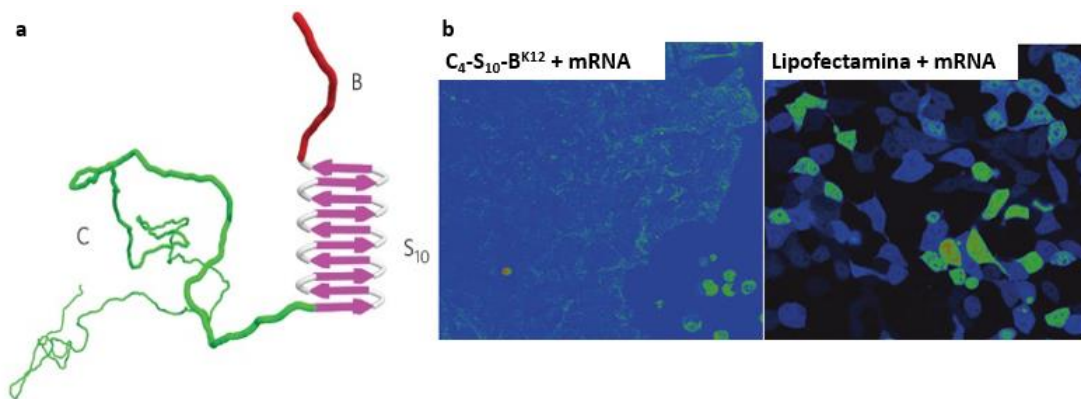
Los oligonucleótidos antisentido o ASO (del inglés *Antisense Oligonucleotides*) son ácidos nucleicos de hebra sencilla (8 a 50 bases) e inhiben la expresión de un gen <sup>[4]</sup>. Los ASO se unen por complementariedad a su mRNA blanco e impiden la traducción del transcrito por tres mecanismos: 1) evita la asociación del mRNA con el ribosoma mediante impedimento estérico; 2) impide estéricamente la asociación del pre-mRNA con el spliceosoma, o 3) promueve la degradación del mRNA al reclutar nucleasas, como la RNAasa H <sup>[5]</sup>. A pesar de ello, los ASO tienen limitaciones para su aplicación terapéutica debido a su naturaleza hidrofílica y su bajo peso molecular <sup>[6]</sup>. Entre las limitantes se encuentran: degradación por nucleasas en suero; incapacidad para atravesar la membrana celular, y tiempo de vida media menor a 30 min *in vivo* <sup>[6]</sup> <sup>[7]</sup>.

Para resolver estos problemas, se ha modificado el enlace fosfodiéster o las bases nitrogenadas para evitar el reconocimiento por nucleasas <sup>[6]</sup>, o se ha realizado su entrega asistida por acarreadores <sup>[6]</sup> <sup>[7]</sup> <sup>[8]</sup>. El uso comercial terapéutico de ASO modificados químicamente está disponible en fármacos como Mipomersen y Nusinersen para tratar la Hipercolesterolemia Familiar y la Atrofia Muscular Espinal respectivamente, o Formiversen (retirado en 2006) <sup>[9]</sup>.

Por otra parte, la entrega de ASO asistida por acarreadores no sólo protege al mismo de las nucleasas, también modifica sus propiedades farmacocinéticas al aumentar el peso molecular. Esto conlleva al incremento del tiempo de vida media en suero, modifica la biodistribución y aumenta la cantidad de ASO que entra a la célula <sup>[6]</sup> <sup>[8]</sup>. Estos acarreadores pueden ser polímeros, péptidos o proteínas y lípidos <sup>[10]</sup> <sup>[11]</sup>. Éstos son de naturaleza catiónica, ya que se unen a los fosfatos de los ácidos nucleicos por interacciones electrostáticas <sup>[12]</sup>. Además, tienen la ventaja de no ser inmunogénicos ni citotóxicos y son fáciles de sintetizar o modificar <sup>[11]</sup> <sup>[13]</sup>.

Los polímeros catiónicos del tipo  $C_4-S_n-B^{K12}$ , son proteínas de diseño que se componen de tres módulos:  $C_4$ , que es un módulo basado en la colágena que da estabilidad coloidal;  $S_n$ , es un módulo de autoensamblaje y consta de  $n$  repeticiones de un octapéptido (GAGAGAGQ) que pueden ser 4 o 10; y un módulo de 12 lisinas que se unen al DNA (Figura 1.1a) [14]. También se cuentan con proteínas bimodulares que constan solo del módulo de estabilidad coloidal y el módulo de unión:  $C_4-B^{K12}$  [15] y  $C_8Sso7d$  [16]. Estos polímeros catiónicos condensan al DNA y forman estructuras tipo rodillo [14]; sin embargo, la eficiencia de transfección (ingreso de material genético a la célula) es menor a la de la Lipofectamina, un agente de transfección comercial [17]. Se sugirió que la causa es el potencial  $\zeta$  ligeramente negativo de estas partículas (Figura 1.1b) [17].

El objetivo general de este proyecto fue seleccionar polímeros del tipo  $C_4-S_n-B^{K12}$  que pudiesen acarrear un ASO y evaluar su potencial de transfección. En particular, se analizó la formación, la estabilidad *in vitro*, la citotoxicidad, y la capacidad de dos polímeros catiónicos para entregar el ASO en líneas celulares tumorales respecto a un agente de transfección comercial, como la Lipofectamina 2000. Se espera que se pueda seleccionar alguno de estos polímeros catiónicos para conferir estabilidad a los ASO sin necesidad de la modificación química, se extienda el uso de estos polímeros como agente de transfección y que el sistema pueda optimizarse por medio del cambio en el diseño de los polímeros  $C_4-S_n-B^{K12}$ .



**Figura 1.1** Proteínas  $C_4-S_{10}-B^{K12}$  y su eficiencia de transfección. Se muestra la proteína  $C_4-S_{10}-B^{K12}$ . (a) y que la eficiencia de transfección de un mRNA utilizando esta proteína es menor que la de la Lipofectamina MessengerMax, un agente de transfección comercial (b). Tomado de [14] [17].

## 2. Materiales y métodos

Se utilizó la secuencia de un ASO reportado anteriormente por *Hashimoto, et al.*: 5'-GTC CTC CCT TTC CGT GCT GT-3' <sup>[18]</sup>. Éste y una versión marcada con el fluoróforo ATTO488 (ASOF) en el extremo 3' fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT). Para ATTO488, la longitud de onda máxima de absorbancia es de 501 nm y la de emisión de 523 nm <sup>[19]</sup>. Ambos fueron disueltos en agua desionizada a una concentración de 100 µM. El plásmido pAc-GFP1 N1 (Living Colors), que contiene el gen que codifica para la Proteína Verde Fluorescente (GFP), fue purificado de acuerdo con el kit ZymoPURE II Plasmid Midiprep (Zymo Research) de un cultivo con una cepa de *E. coli* DH5α transformada.

Se preparó amortiguador HEPES 250 mM y pH 7.4 (Gold Biotechnology) en agua desionizada. Además, se preparó una disolución de poli-D-Lisina de 1-5 kDa (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/mL en agua desionizada. También se preparó una disolución 427 µM del péptido TAT de HIV-1 (Sigma-Aldrich).

El medio de cultivo DMEM (Gibco) fue preparado de acuerdo con las indicaciones del proveedor, se le agregó Penicilina-Estreptomicina (Gibco) para una concentración de 100 U/mL y 100 µg/mL, respectivamente, y se suplementó de ser necesario con Suero Fetal Bovino al 10% (SFB, Gibco). El tampón fosfato salino (PBS 1x) pH 7.4 fue preparado a partir de NaCl (IBI), KCl (Sigma-Aldrich), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich). Los medios fueron esterilizados por filtración en unidades con un tamaño de poro de 0.22 µm (Santa Cruz). El medio de cultivo LIT fue proporcionado por la Dra. Bertha Espinoza del Instituto de Investigaciones Biomédicas y fue preparado a partir de Triptosa de Infusión de Hígado o LIT (Difco) y suplementado con SFB al 10%.

Se preparó bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT (Sigma-Aldrich) a una concentración 5 mg/mL en PBS 1x. A su vez, éste se diluyó 10 veces en DMEM el mismo día de uso. También se preparó una disolución de rojo neutro 40 mg/mL en PBS 1x, y a partir de éste, se preparó medio de rojo neutro 40 µg/mL en DMEM un día antes de su uso. También se preparó disolución de destañido de rojo neutro, el cual contiene 50% de etanol al 96% (Sigma-Aldrich), 49% de agua desionizada y 1% de ácido acético glacial (High Purity).

Las líneas celulares tumorales de glioblastoma Ln229 y U251, adenocarcinoma de pulmón SKLU, fueron proporcionadas por la Dra. Daniela Araiza Olivera Toro del Instituto de

Química; mientras que la línea de carcinoma de cérvix HeLa, fue proporcionada por el Dr. Luis Vaca Domínguez del Instituto de Fisiología Celular.

## **2.1 Biosíntesis de los polímeros C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup>**

La biosíntesis de los polímeros C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> se realizó de acuerdo con Hernández, *et al*<sup>141</sup>. Se realizó la producción en matraces de 1 L de cada proteína con cepas transformadas de *Pichia pastoris*, inducidas con metanol al 1% (Sigma-Aldrich) cada 12 h durante 96 h. La proteína excretada al medio extracelular fue purificada por medio de dos precipitaciones consecutivas con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) al 50% y 55%, seguido de dos precipitaciones con acetona al 40% y al 80%. Se evaporó el disolvente y se resuspendió la proteína en agua desionizada para ser dializada durante 72 h. Finalmente se liofilizó la disolución de proteína para obtenerla pura.

## **2.2 Preparación de acarreadores con ASO**

### **2.2.1 Mezclas de polímeros con ASO**

Se prepararon mezclas entre el ASO con o sin fluoróforo y los polímeros catiónicos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup>, el péptido TAT, una mezcla C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> /TAT, poli-D-Lisina, disueltos en agua desionizada. Se agregó HEPES para una concentración final de 25 mM y un pH de 7.4. Las mezclas se incubaron 16 h a temperatura ambiente antes de su uso, a excepción de las mezclas con poli-D-Lisina, que se prepararon con 30 min de antelación.

Adicionalmente, se prepararon complejos entre el ASO (con o sin fluoróforo) y los polímeros C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> como se describió anteriormente. Al término de la incubación, a los complejos formados se les añadió poli-D-Lisina 1.6 µg/mL 30 min antes de su uso.

### **2.2.2 Liposomas con ASO**

Se diluyeron tanto el ASO con o sin fluoróforo (50-600 ng) como la Lipofectamina 2000 (0.12- 1.2 µg, Invitrogen) en DMEM. Ambas diluciones se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos antes de su uso. De manera análoga, se prepararon mezclas C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO y se diluyeron en DMEM, se mezclaron con Lipofectamina diluida en DMEM y se incubó esta mezcla 15 minutos antes de su uso.



## 2.3 Formación de complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO

### 2.3.1 Ensayos del Cambio en la Movilidad Electroforética

Para seleccionar que proteínas son las más afines por el ASO se realizaron Ensayos del Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA en inglés), cuyo fundamento es la disminución de la movilidad durante una electroforesis del DNA respecto a cuando éste forma complejos con proteína [20]. Se prepararon mezclas entre una cantidad fija de ASO marcado fluorescente o ASOF 0.5 μM y concentraciones variables (0-100 μM) de los polímeros de acuerdo con la sección 2.2.1. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% durante 1 h a 100 V (Mini-Protean Tetracell, Bio Rad) en TBE 0.5x (Invitrogen). El gel fue documentado sin teñirse (C300 Azure Biosystems, Estados Unidos) y el análisis de las bandas fue realizado con Image J 1.52a (National Institutes of Health, NIH). La relación N/P se define como la cantidad por mol de lisinas en la proteína entre la cantidad de fosfatos por mol de ASO (ecuación 2.1). C<sub>p</sub> es la concentración de proteína, C<sub>ASO</sub> es la concentración de ASOF y V es el volumen de la mezcla

$$\text{Ecuación 2.1 } N/P = \frac{12 * (C_p * V)}{20 * (C_{ASO} * V)}$$

### 2.3.2 Polarización de la Fluorescencia

Se utilizó la Polarización de la Fluorescencia (FP) para determinar la constante de afinidad entre las proteínas y el ASO por ser un método sencillo, relativamente rápido y más sensible que un EMSA [21]. La técnica se basa en el aumento de la polarización fluorescencia al unirse una proteína a su ligando marcado fluorescentemente [21]. Para ello se prepararon mezclas entre ASO marcado 20 nM y las proteínas disponibles (0-300 nM) como se describe en la sección 2.2.1. Posteriormente, se colocaron las mezclas en microplacas de 96 pozos con base oscura (Thermo Scientific) y se midió tanto la fluorescencia paralela (I<sub>||</sub>) y la fluorescencia perpendicular (I<sub>⊥</sub>) a la fuente de emisión en el lector de microplacas Cytation 5™ (Biotek, Estados Unidos), que emite un láser de Xe. Se usó un set de filtros que tiene una longitud de onda de excitación de 485/20 nm, mientras que la de emisión es de 528/20 nm. La FP fue calculada de acuerdo con la ecuación 2.2 [21] para calcular la cantidad de ASO unido. Se determinó la constante de afinidad de acuerdo con la ecuación de Hill (ecuación 2.3) [22] con el programa Origin Pro 8.5 (OriginLab), donde AB es la cantidad de ASO unido, C<sub>p</sub> es la concentración de proteína y n es el coeficiente de Hill.

$$\text{Ecuación 2.2 } FP (mP) = 1000 * \frac{(I_{II} - I_{II,blanco}) - (I_{\perp} - I_{\perp,blanco})}{(I_{II} - I_{II,blanco}) + (I_{\perp} - I_{\perp,blanco})}$$

$$\text{Ecuación 2.3 } AB (\%) = 100 * \frac{C_p^n}{K_d + C_p^n} ; n = 1$$

## 2.4 Caracterización fisicoquímica de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO

### 2.4.1 Dispersión Dinámica de la luz

Para determinar el tamaño de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO se utilizó Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), en la cual se calcula el coeficiente de difusión de una partícula en disolución y se determina por medio de la ecuación de Stokes-Einstein el radio hidrodinámico de dicha partícula [23]. Se prepararon los complejos en una relación N/P de 24. Las mediciones se llevaron a cabo en Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments, Reino Unido). Éste contiene un láser de He-Ne de 4 mW que emite a una longitud de onda de 633 nm. Se realizaron 5 corridas de 30s a 25°C y se detectó la luz dispersada a 173°. El análisis se llevó a cabo con Zetasizer Software 7.13 (Malvern).

### 2.4.2 Microscopía de Fuerza Atómica

Para caracterizar la morfología de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO se realizó Microscopía de Fuerza Atómica (AFM en inglés), en la cual se producen imágenes topográficas de una muestra adherida a una mica [24]. Se prepararon los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO a una relación N/P de 24 (2 μM ASO) con base en la sección 2.2.1. Posteriormente, se depositó una alícuota de 5 μL fue en un substrato de mica fresca, se incubó durante tres minutos, se enjuagó con 1 mL de agua desionizada para remover la muestra no fijada y fue secada con aire. Las imágenes fueron obtenidas con Multimode 8HR (Bruker, Estados Unidos) por medio del modo ScanAsyst™, donde se utilizó un cantilever de nitruro de silicio (constante de resorte 0.32 N m<sup>-1</sup>). El procesamiento de las imágenes se realizó con el software NanoScope Analysis 1.80 (Bruker) para medir el diámetro de la partícula (ejes x y), así como su altura (eje z).

## 2.5 Estabilidad de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO

### 2.5.1 Estabilidad en medios de cultivo

Para comprender el comportamiento de los complejos entre C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> y ASO en condiciones *in vitro*, es necesario realizar estudios sobre su estabilidad en medios de cultivo,

tales como DMEM y LIT, que son medios para el cultivo de líneas celulares tumorales <sup>[25]</sup> y el protozoario *Trypanosoma cruzi* <sup>[26]</sup>. Se prepararon los complejos en una relación N/P de 24 (2  $\mu$ M ASOF). Posteriormente se realizó una dilución 1:1 de los complejos formados en los medios de cultivo DMEM y LIT con y sin SFB al 10%, así como SFB. Se retiró una alícuota cada cierto tiempo de la mezcla durante 24 h y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior uso. A las 24 h de mezclar los complejos con el medio de cultivo, se incubó una alícuota en heparina 260 ng/ $\mu$ L (Inhepar, PISA) durante 20 min para liberar el ASOF de los complejos como control de liberación. Finalmente se realizó una electroforesis de las alícuotas y un análisis de las bandas de ASOF libre de acuerdo con lo mencionado en la sección 2.2.1.

## **2.5.2 Ensayos de competencia con Heparina**

La heparina es un polímero aniónico de 30 kDa presente en suero (1-5  $\mu$ g/mL en humano) <sup>[27]</sup>. La heparina puede competir con el ASO para unirse a los polímeros catiónicos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup>, lo que provocaría la disociación de los complejos entre el ASO y el polímero C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup>. Para evaluar este efecto. Se prepararon complejos en una relación N/P de 24 (2  $\mu$ M ASOF). Posteriormente, se incubaron los complejos en concentraciones de heparina 0-107  $\mu$ g/mL (Inhepar, PISA) durante 30 min y a temperatura ambiente. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida y el análisis de liberación del ASO con base en lo descrito en la sección 2.2.1.

## **2.6 Evaluación de la citotoxicidad y transfección de los complejos entre C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> y ASO**

### **2.6.1 Ensayo de MTT**

El ensayo de MTT es un método que se utiliza ampliamente para evaluar la viabilidad celular. El MTT es una sal de tetrazolio que es metabolizado por la mitocondria de células viables, lo cual produce una sal de formazán que es espectrofotométricamente cuantificada <sup>[28]</sup>. Para ello, se sembró un día antes de realizar el ensayo 10 000 células por pozo en DMEM con SFB al 10%, todo esto en microplacas de 96 pozos (NEST). A su vez, se prepararon complejos para unir 50-600 ng de ASO con distintos acarreadores: C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con una N/P de 24, poli-D-Lisina y Lipofectamina 2000 a una relación 1:4 (Invitrogen). A las 24 h, a las células se les retiró el medio, se lavaron con PBS 1x y se incubaron con los acarreadores con y sin ASO diluidos en DMEM durante 24 h. Posteriormente, a las células se les retiró el medio, se lavaron con PBS 1x y se incubaron en MTT 0.5 mg/ mL diluido en DMEM durante

4 h. Se retiró el MTT, se disolvieron los cristales formados en 50  $\mu\text{L}$  de DMSO (Meyer) durante 5 min y se tomó la lectura de absorbancia a 570 nm en el lector de microplacas Cytation™ 5 (Biotek, Estados Unidos). El cálculo de la viabilidad celular se realizó de acuerdo con la ecuación 2.4, donde  $A_i$  es la absorbancia del tratamiento,  $A_b$  es la absorbancia del blanco (DMSO) y  $A_c$  es la absorbancia del grupo sin tratamiento.

$$\text{Ecuación 2.4} \quad \text{Viabilidad (\%)} = 100 * \frac{A_i - A_b}{A_c - A_b}$$

### **2.6.2 Ensayo de la Absorción del Rojo Neutro**

Para complementar al ensayo de MTT, se escogió el ensayo de la absorción del rojo neutro por su facilidad de operación y rapidez. El rojo neutro es catiónico a pH neutro, entra a la célula por endocitosis en células vivas y se concentra en los lisosomas. Este colorante se extrae y se cuantifica espectrofotométricamente [29]. Para realizar este ensayo, se prepararon células y complejos con los acarreadores como se describe en la sección 2.5.1 y se incubaron todos los tratamientos por 24 h en DMEM. El ensayo del rojo neutro se realizó de acuerdo con Repetto [30]. Se incubó cada tratamiento en 100  $\mu\text{L}$  de medio de rojo neutro durante 2 h. Al término de este tiempo, se retiró el medio, se lavó con 150  $\mu\text{L}$  de PBS 1x, se añadió 150  $\mu\text{L}$  de disolución para desteñir y se tomó la lectura de absorbancia a 540 nm en el lector de microplacas de Cytation™ 5 (Biotek, Estados Unidos) para su posterior análisis. El cálculo de la viabilidad se realizó con la ecuación 2.4.

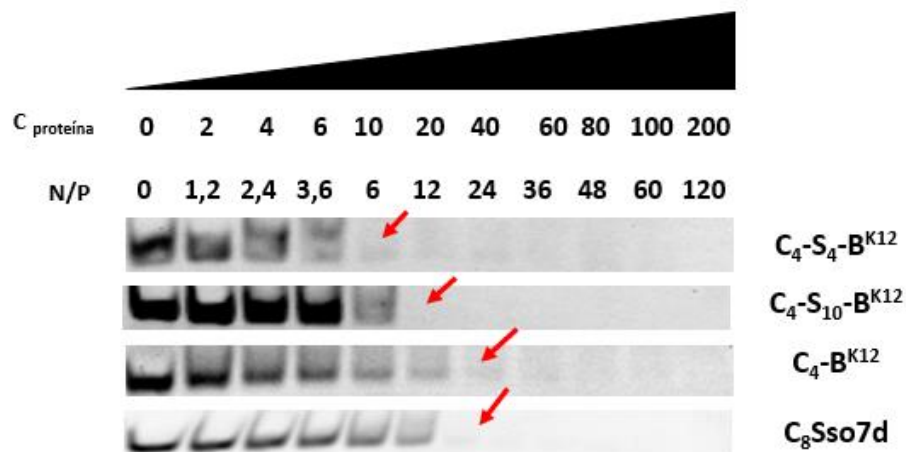
### **2.6.3 Transfección en distintas líneas celulares tumorales**

Para evaluar la transfección de los complejos entre los polímeros  $C_4\text{-S}_n\text{-B}^{K12}$  y el ASO marcado fluorescentemente, se prepararon las células y los complejos de acuerdo con las secciones 2.5.1, y 2.2. Adicionalmente, se prepararon complejos  $C_4\text{-S}_n\text{-B}^{K12}$  con el plásmido pAcGFP1-N1 a una relación N/P de 3 con base en lo establecido en la sección 2.2.1. El tiempo de incubación fue de 24 h en DMEM, a excepción de los complejos con Lipofectamina cuyo tiempo fue de 4 h. Posteriormente se retiró el medio, se lavó con PBS 1x para remover el ASO no internalizado, se colocó DMEM y se capturaron imágenes con el módulo de microscopía Cytation™ 5 (Biotek, Estados Unidos). Para ello, se usaron los objetivos que magnifican cuatro veces (4X) y 20 veces (20X) la imagen, tanto en el campo claro como en el campo con el cubo de filtro verde (GFP), cuya longitud de emisión es de 525/39 nm y la de excitación de 469/35 nm. El procesamiento de las imágenes se realizó con el software Image J 1.52a (NIH).

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Formación de complejos $C_4$ - $SQ_n$ - $K_{12}$ con ASO

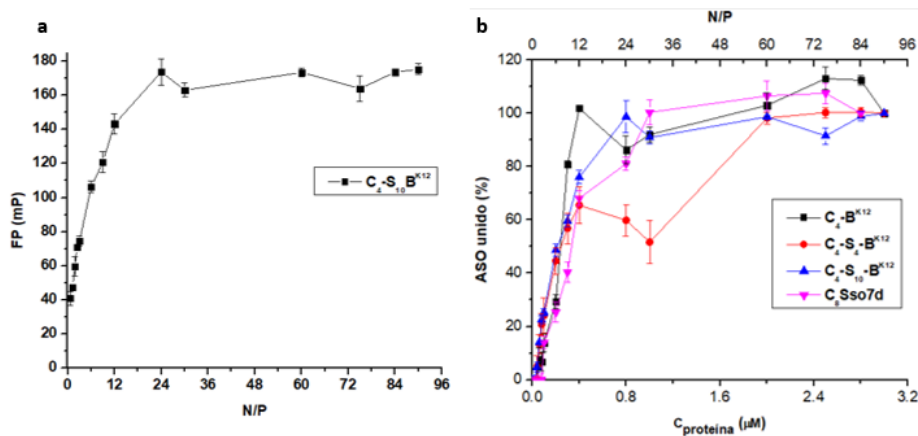
En la Figura 3.1.1 se muestran los EMSA que muestran la afinidad de las proteínas por el ASO. Se observa que el orden de afinidad relativo en orden decreciente es  $C_4$ - $S_4$ - $B^{K12}$ ,  $C_4$ - $S_{10}$ - $B^{K12}$ ,  $C_4$ - $B^{K12}$  y  $C_8$ Sso7d. El hecho de que las proteínas trimodulares, es decir, con el módulo  $S_n$ , sean más afines que las bimodulares sugieren que éste aumenta la afinidad de los polímeros por el ASO.



**Figura 3.1.1** EMSA de formación de los complejos entre los polímeros catiónicos y un ASO. Se ha marcado con una flecha la concentración de proteína a la cual el 100% del ASO está unido.

También se exponen las curvas de unión obtenidas por FP en la Figura 3.1.2. Se muestra la curva de unión  $C_4$ - $S_{10}$ - $B^{K12}$  por el ASO (3.1.2a), donde la FP aumenta en función de la concentración de proteína. En la Figura 3.1.2b, se observa que el orden de afinidad no es el mismo que el de la Figura 3.1.1. Lo anterior fue comprobado por medio del ajuste de las curvas de unión con la ecuación 2.2.2 (Figura 3.1.3). El orden de afinidad establecido es  $C_4$ - $S_{10}$ - $B^{K12}$  >  $C_4$ - $B^{K12}$  >  $C_4$ - $S_4$ - $B^{K12}$  >  $C_8$ Sso7d.

Con base en la literatura, para unir un mRNA de 996 nucleótidos se necesita una relación N/P de 7 con la proteína  $C_4$ - $S_{10}$ - $B^{K12}$ <sup>[17]</sup>, mientras que en las Figuras 3.1.1 y 3.1.2, la cantidad de proteína para unir al ASO está entre las relaciones de N/P 12 y 24. Esto indica que los complejos entre los polímeros  $C_4$ - $S_4$ - $B^{K12}$  y el ASO son menos estables y, por lo tanto, se espera una eficiencia de transfección menor.



**Figura 3.1.2** Curvas de unión de las proteínas  $C_4-S_n-B^{K12}$  con un ASO. Se muestra la polarización de la fluorescencia (en mP) en función de la relación N/P (a). Además, se muestran las curvas de unión de las proteínas  $C_4-S_n-B^{K12}$  por el ASO (b). El número de réplicas fue tres.

Al momento de seleccionar, se eligieron las proteínas  $C_4-B^{K12}$  y  $C_4-S_4-B^{K12}$  para continuar porque presentan la mayor afinidad, además se abrió la posibilidad de evaluar el efecto del módulo de autoensamblaje. Se descartó  $C_8Sso7d$  porque es el que presenta la menor afinidad También se estableció que la preparación de los complejos se realizaría con una N/P de 24 para asegurar la formación de éstos.

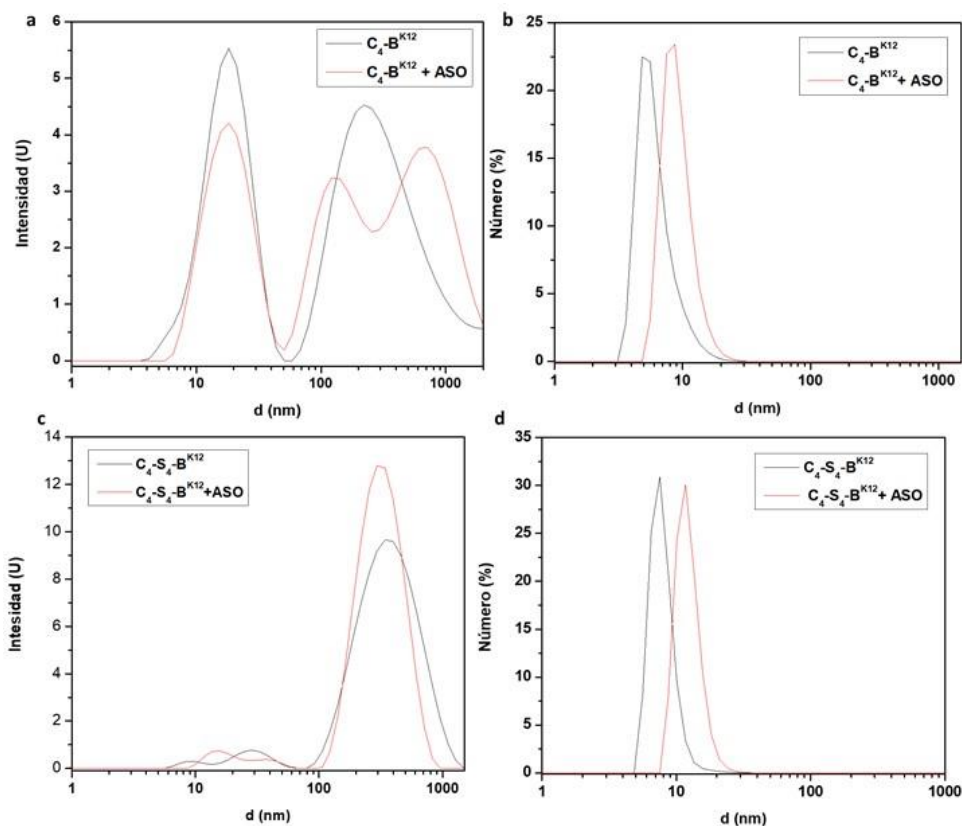
**Figura 3.1.3** Constantes de afinidad de las proteínas por un ASO. Coeficiente de Hill: 1. Número de réplicas: 3.

Proteína	$K_d$ (nM) [ $\sigma$ ]	$r^2$
$C_4-S_{10}-B^{K12}$	200.41 (0.03)	0.9551
$C_4-B^{K12}$	202.98 (0.06)	0.8558
$C_4-S_4-B^{K12}$	299.66 (0.05)	0.9271
$C_8Sso7d$	320.16 (0.08)	0.8857

### 3.2 Caracterización de los complejos $C_4-S_n-B^{K12}$ con ASO

En la Figura 3.2.1 se muestra la distribución de tamaños en función de la intensidad (a y c) y en función del número (b y d) de la formación de complejos entre  $C_4-S_n-B^{K12}$  y un ASO. Se observa en las Figuras a y c varios picos, mientras que en las figuras b y d uno, tanto para la proteína como para el complejo. Esto se debe a que la intensidad depende del diámetro a la sexta potencia <sup>[23]</sup>, por lo tanto, partículas de mayor tamaño tendrán una mayor

intensidad, aunque en número no sean comparables con las de menor tamaño. En el caso de la formación de complejos con la proteína  $C_4-B^{K12}$  se observan picos de hasta  $1 \mu\text{m}$  (3.2.1 a), lo que puede deberse a contaminantes como el polvo.



**Figura 3.2.1** Distribución de tamaños de partícula por intensidad (a y c) y número (b y d) obtenidos en DLS para la formación de complejos  $C_4-S_n-B^{K12}$  con ASO.

Cuando se observa las distribuciones por tamaño de ambos polímeros se observa un ligero aumento del tamaño de partícula cuando la proteína se une a DNA. La distribución de los picos sugiere que bajo las condiciones de preparación de las mezclas proteína con ASO hay una coexistencia tanto de proteína como de los complejos.

Además, cuando se forman complejos con la proteína  $C_4-S_4-B^{K12}$  se hallan especies con un tamaño de 60-70 nm y a 300 nm (3.2.1 c). Esto se debe a que la proteína en disolución forma agregados por medio del módulo  $S_n$  [31].

En la Figura 3.2.2 se muestran los radios hidrodinámicos ( $R_H$ ) de las proteínas y sus complejos con ASO, así como sus índices de polidispersidad (PDI). Se observa que el tamaño de los complejos es de alrededor de los 20 nm y son polidispersos.

**Figura 3.2.2** Radios hidrodinámicos determinados por DLS. Número de réplicas: 5.

<b>Tratamiento</b>	<b>R<sub>H</sub> (nm) [σ]</b>	<b>PDI</b>
<b>C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup></b>	19.5 (9.0)	0.59
<b>C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup>+ASO</b>	22.5 (11.8)	0.64
<b>C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup></b>	14.4 (3.3)	0.41
<b>C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> + ASO</b>	17.5 (5.0)	0.34

La caracterización de los complejos C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO por AFM se muestra en la Figura 3.2.3. De acuerdo con los histogramas de distribución por diámetro, no se observa un aumento en el tamaño de la partícula a pesar de que las distribuciones se sobreponen. Cuando se comparan los histogramas de distribución por altura se puede observar que la distribución tanto de la proteína como la de la proteína con ASO se sobreponen, además de que hay un ligero aumento en la altura en el caso de los complejos proteína con ASO.

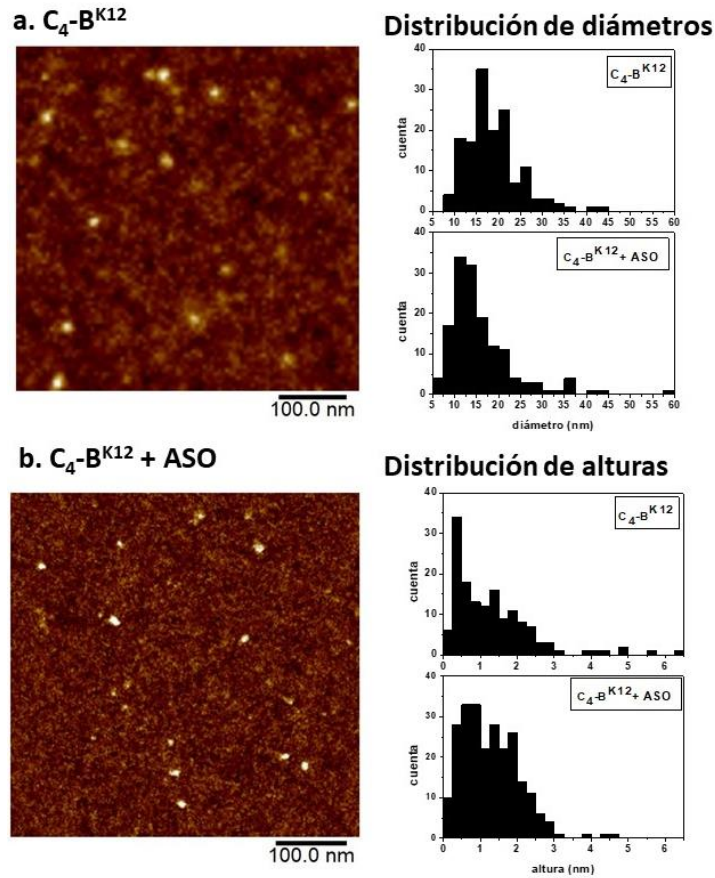
Respecto a la formación de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO (Figura 3.2.4), se muestra que ambos histogramas se observa el mismo comportamiento que en la figura 3.2.3, donde se observa la sobreposición de los histogramas y un ligero aumento en el tamaño del tamaño de partícula cuando se comparan los histogramas de distribución por altura.

De acuerdo con lo anterior, se sugiere la posible formación de los complejos entre las proteínas C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> y el ASO. Además, se observa que el cambio en el tamaño de partícula es más evidente en DLS que en AFM y posiblemente el exceso de proteína interfiera con ambas técnicas. Esto es razonable porque se está utilizando una relación N/P elevada para preparar los complejos de la proteína con el ASO, por lo que la proteína generará una señal más fuerte que la de los complejos.

Por lo tanto, se sugiere el uso de una técnica con mayor resolución para la caracterización de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO. Una de ellas puede ser la microscopía electrónica en condiciones criogénicas (cryo-TEM) para determinar el tamaño de partícula.

Además, el exceso de proteína observado no es deseable ya que al aumentar la cantidad de proteína para unir al ASO, también se observarán efectos no deseables como la citotoxicidad y, por lo tanto, se esperará una menor eficiencia en la transfección.

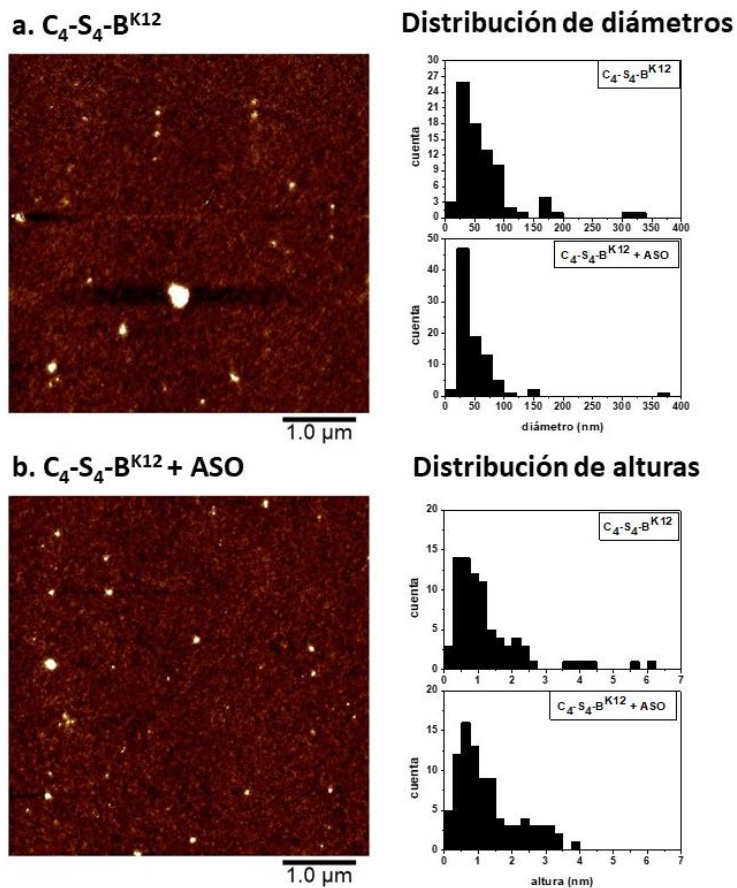




**Figura 3.2.3** Caracterización de los complejos C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> -ASO por AFM. Se observan las imágenes obtenidas de la proteína (a) y los complejos formados (b), así como los histogramas de distribución por tamaño (ejes x y) y la altura (ejes z).

### 3.3 Estabilidad de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup>-ASO en medios de cultivo

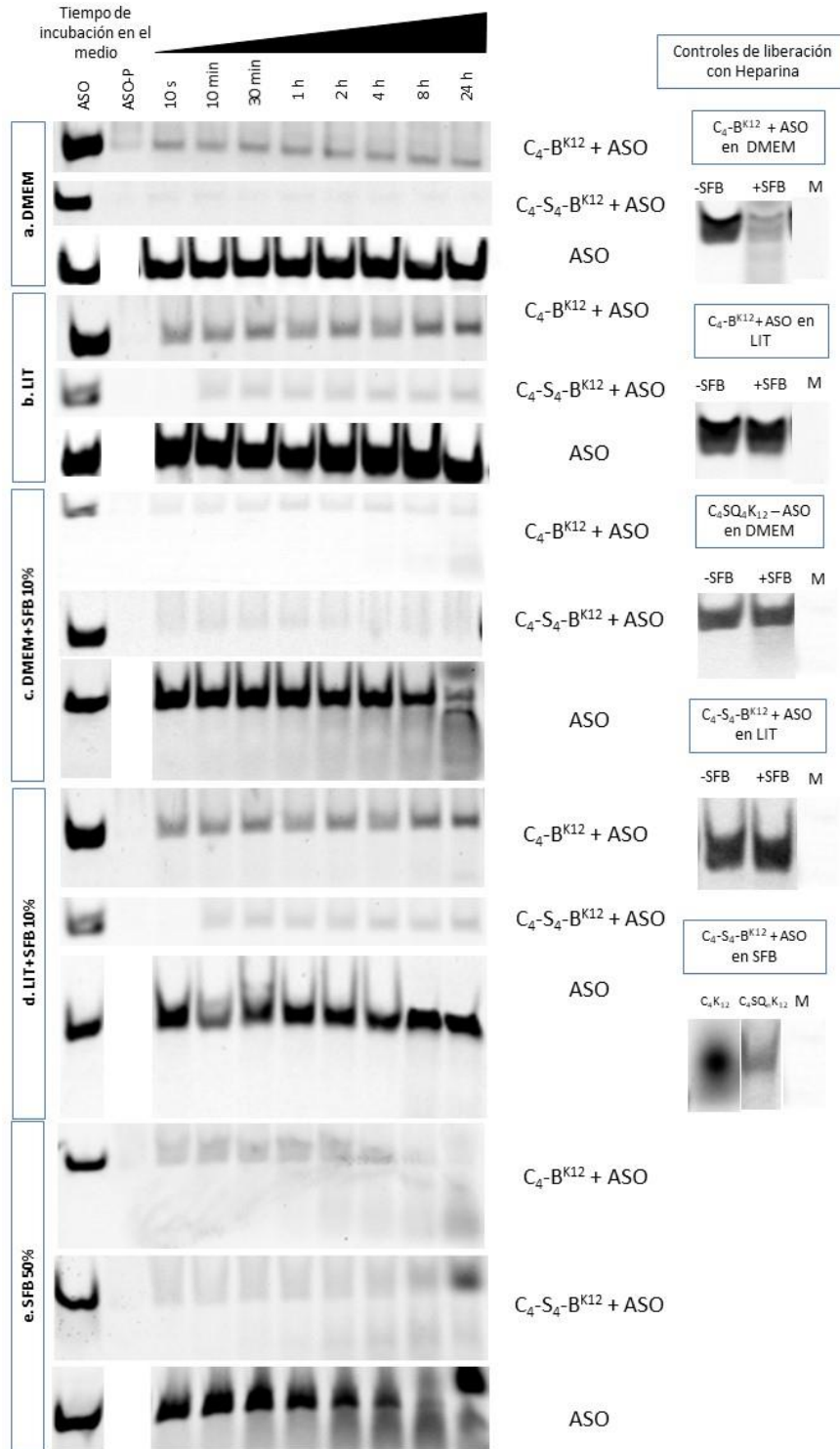
En la Figura 3.3.1 se compara la estabilidad de los complejos al diluirlos en DMEM (3.3.1a) y LIT (3.3.1b). Los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup>-ASO están formados por uniones electrostáticas, entonces al introducirse en un medio de cultivo se aumenta la fuerza iónica, lo que ocasiona un apantallamiento de cargas y provoca la liberación del ASO de los complejos [25]. Los complejos formados entre C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> y ASO son más estables ya que se libera una menor cantidad, con lo que demuestra que el módulo S<sub>n</sub> influye en la estabilidad relativa de los complejos. Al forzar la disociación de los complejos con heparina, el ASO se recuperó en su totalidad.



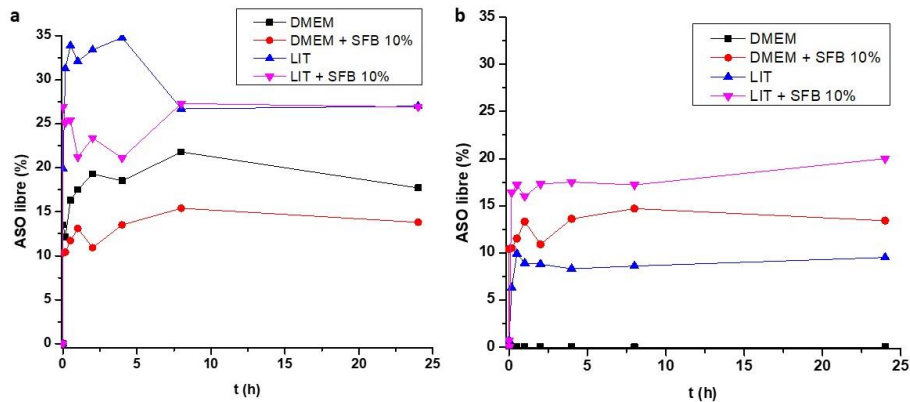
**Figura 3.2.4** Caracterización de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup>-ASO por AFM. Se observan las imágenes obtenidas de la proteína (a) y los complejos formados (b), así como los histogramas de distribución por tamaño (ejes x y) y la altura (ejes z).

Posteriormente, al comparar la estabilidad de los complejos en DMEM con SFB 10% (3.3.1 c), LIT con SFB 10% (3.3.1 d) y SFB 50% (3.3.1e), donde se agrega el efecto de la degradación. La degradación del ASO desnudo fue mayor y en un menor tiempo que cuando este se encuentra unido a los polímeros del tipo C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup>, aunque los controles de liberación con heparina también sugieren que el ASO sugieren que se degrada cuando está unido con los polímeros. Esto indica que los polímeros del tipo C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> protegen al ASO de la degradación.

Las curvas liberación de ASO de los complejos en DMEM y LIT se observan en la Figura 3.3.2. La cantidad de ASO libre cuantificado cuando se utiliza la proteína C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> (3.3.2 a) es mayor en los medios sin suplementar, mientras que cuando se utiliza la proteína C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> (3.3.2 b) esto se invierte.



**Figura 3.3.1** Estabilidad de los complejos  $C_4$ -S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO en medios de cultivo. Se muestra la banda de liberación de ASO de los complejos en DMEM (a y c) y LIT (b y d) con y sin SFB al 10%, y de SFB al 50% (e). Además, se muestran los controles de liberación del ASO de los complejos con heparina en los diferentes medios. Número de réplicas: 2.



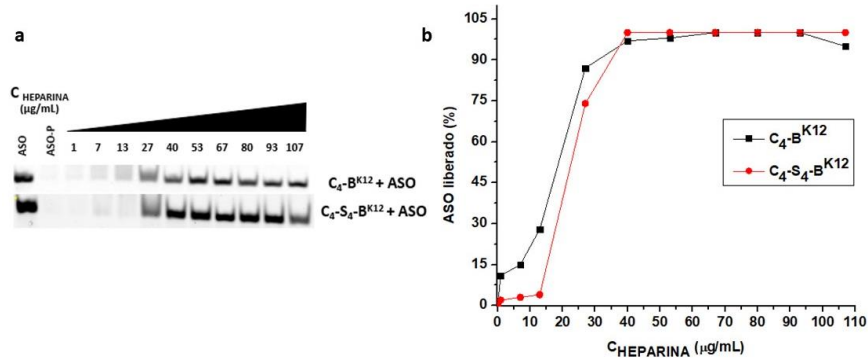
**Figura 3.3.2** Liberación de ASO de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup>-ASO en medios de cultivo. Se muestran las curvas de liberación de ASO de los complejos C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup>-ASO (a) y C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup>-ASO (b) en función del tiempo. Número de réplicas: 2.

La explicación radica en la estabilidad relativa de la formación de los complejos. Los complejos de C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO son menos estables que los complejos entre C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> y ASO, por lo tanto, los complejos formados con el polímero C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> liberarán una mayor cantidad de ASO y se degrada en una mayor proporción en comparación con los complejos que se forman con el polímero C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup>, en la que la degradación del ASO no pudo ser observada. Por lo tanto, las proteínas C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> son potenciales acarreadores ya que se demostró su estabilidad en dos sistemas *in vitro* diferentes, LIT y DMEM. C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> es la proteína más adecuada ya que sus complejos con ASO muestran una mayor estabilidad.

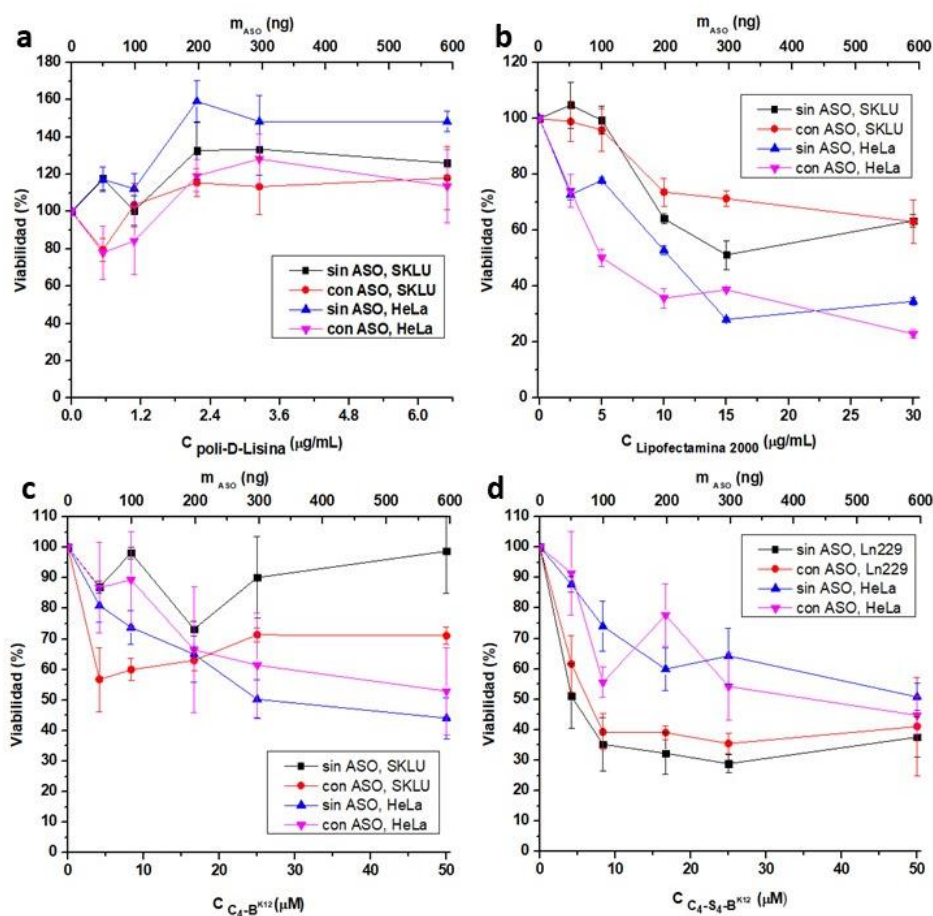
Posteriormente, se presenta en la Figura 3.3.3 la liberación ASO de los complejos en presencia de heparina. Como era de esperarse, los complejos formados con la proteína C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> son los más estables. También se nota que los complejos de ambas proteínas son lo suficientemente estables ya que soportan hasta tres veces más la concentración fisiológica: 1-5 µg/ mL en suero [27].

### 3.4 Citotoxicidad de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup>-ASO

En la Figura 3.4.1 se muestra la viabilidad celular en función de la concentración de cada acarreador utilizado. Se utilizaron tanto la poli-D-Lisina como la Lipofectamina 2000 (un agente de transfección comercial) para comparar la citotoxicidad con las proteínas del tipo C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup>. En el caso de la poli-D-Lisina (3.4.1a) la viabilidad no se ve afectada. Al usar Lipofectamina, la viabilidad es mayor cuando se usan los liposomas cargados con ASO, ya que la carga de los liposomas (positiva) que podría irrumpir con la membrana celular se neutraliza [31].



**Figura 3.3.3** Liberación de ASO de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup>-ASO en presencia de heparina. Se muestran las bandas de ASO liberado (a) de los complejos y las curvas de liberación en función de la concentración de heparina (b). Número de réplicas: 2.



**Figura 3.4.1** Citotoxicidad de los complejos C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> con ASO por ensayo de MTT. Se muestra la viabilidad de dos líneas celulares en función de la concentración de los acarreadores con y sin cargar ASO para poli-D-Lisina (a), Lipofectamina 2000 (b), C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> (c) y C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> (d). Réplicas: 3.

Respecto a las proteínas  $C_4-B^{K12}$  (3.4.1c) y  $C_4-S_4-B^{K12}$  (3.4.1d), se esperaba el mismo comportamiento que con la Lipofectamina 2000 ya que la carga de las lisinas se neutralizaría con la de los fosfatos de los ácidos nucleicos, pero se observa que al incubar solo las proteínas o las proteínas con el ASO no se observa una diferencia. Esto se debe a que en los complejos hay un exceso de proteína libre. Además, se observa que la citotoxicidad es dependiente de la línea celular. Esto se debe a que la citotoxicidad es dependiente del tipo celular [32].

Cuando se compara la citotoxicidad de las proteínas  $C_4-S_n-B^{K12}$  y la Lipofectamina 2000 en la línea HeLa, la Lipofectamina 2000 presenta una menor viabilidad en las concentraciones utilizadas. Esto tiene como ventaja el uso de las proteínas sobre el acarreador comercial ya que permitiría incrementar la cantidad de ASO sin ocasionar efectos citotóxicos [32]. Se muestra en la Figura 3.4.1 que los complejos  $C_4-S_4-B^{K12}$  con ASO son más citotóxicos que los formados con la proteína  $C_4-B^{K12}$ . Esto puede atribuirse a la proteína  $C_4-S_4-B^{K12}$ , ya que se observa la misma tendencia con la proteína sola. Esto puede deberse a la formación de agregados de la proteína en disolución.

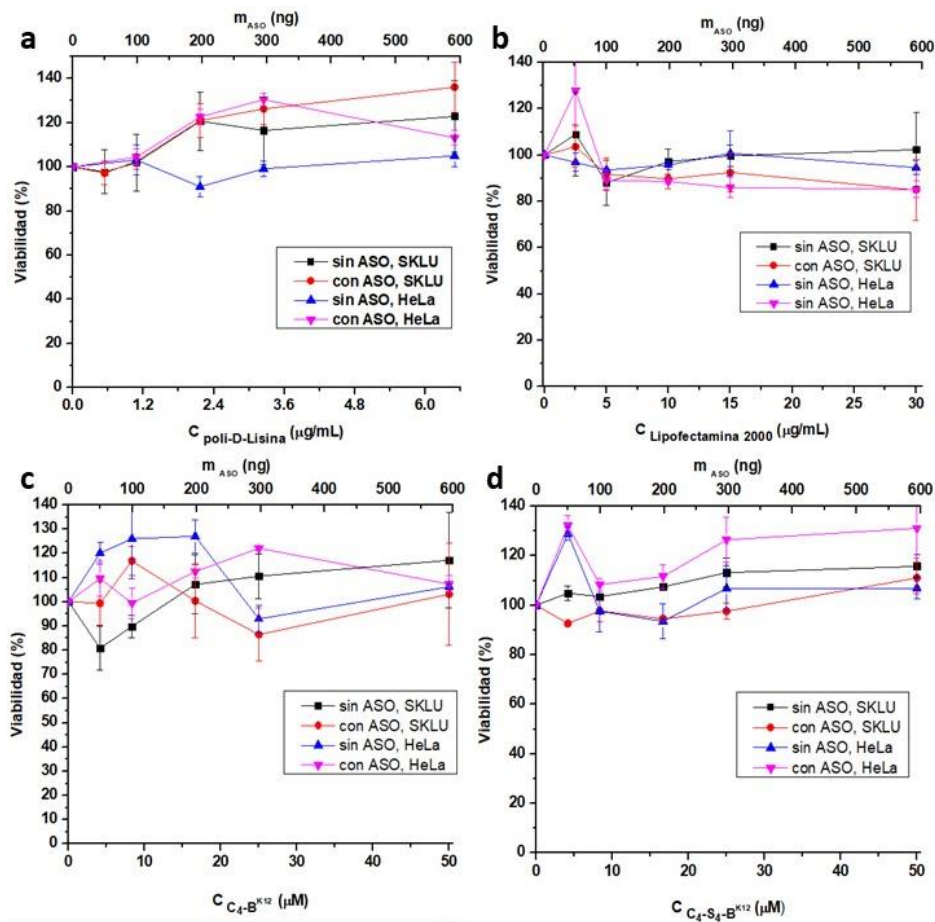
Como técnica complementaria, se usó el ensayo del rojo neutro para detectar citotoxicidad de cada acarreador. En la Figura 3.4.2, se muestra que la viabilidad cuantificada por este método para la poli-D-Lisina (3.4.2a), Lipofectamina 2000 (3.4.2b),  $C_4-B^{K12}$  (3.4.2c) y  $C_4-S_4-B^{K12}$  (3.4.2d) no se ve afectada.

Las diferencias observadas en las Figuras 3.4.1 y 3.4.2 se debe a que ambos métodos miden de manera distinta la viabilidad celular. En el caso del ensayo de MTT utiliza el metabolismo mitocondrial [29], mientras que el ensayo de rojo neutro la actividad lisosomal [30]. A pesar de ello, el cambio o no en la actividad lisosomal no indica en todos los casos la muerte celular [32] [33]. Por lo tanto, es probable que la técnica no sea sensible o presente interferencias. Todo esto sugiere el utilizar otra técnica para complementar al ensayo de MTT para evaluar la citotoxicidad, por ejemplo, el ensayo de liberación de LDH [32].

### **3.5 Transfección de los complejos $C_4-S_n-B^{K12}$ con ASO**

Se muestra en la Figura 3.5.1 b, g y h las imágenes obtenidas por microscopía óptica de las transfecciones de un ASO al utilizar Lipofectamina 2000 como acarreador en la línea celular HeLa. Se observa que hubo una internalización del ASO en la célula; sin embargo, la morfología de éstas indica daño celular debido al uso de la Lipofectamina. Esto está de acuerdo con la literatura, ya que *Wang, T. et al.* demostraron que los reactivos comerciales

de Lipofectamina muestran una eficiencia mayor de transfección que otros sistemas comerciales, pero también son de los que muestran una mayor citotoxicidad [34].



**Figura 3.4.2** Citotoxicidad de los complejos  $C_4-S_n-B^{K12}$  con ASO por ensayo del rojo neutro. Se muestra la viabilidad en dos líneas celulares en función de la concentración de los acarreadores con y sin cargar ASO: poli-D-Lisina (a), Lipofectamina 2000 (b),  $C_4-B^{K12}$  (c) y  $C_4-S_4-B^{K12}$  (d). Réplicas: 3.

Por otra parte, cuando las proteínas  $C_4-S_n-B^{K12}$  como acarreadores (Figura 3.5.1 c y d), no hubo transfección. Esto se había esperado debido a la afinidad relativa baja de los polímeros  $C_4-S_n-B^{K12}$  por el ASO. Por ello se decidió transfectar con el plásmido pACGFP-N1, un ácido nucleico de mayor tamaño y de cual se necesita una relación N/P de 3 para que los polímeros  $C_4-S_n-B^{K12}$  lo recubran (dato obtenido del Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología no mostrado). El resultado se muestra en la figura 3.5.1 (e y f), donde se muestra que tampoco hubo transfección del plásmido.

En la literatura se sugiere que las proteínas del tipo  $C_4-S_n-B^{K12}$  no son buenos agentes para la transfección debido a que los complejos formados con los ácidos nucleicos presentan un potencial  $\zeta$  ligeramente negativo (-5 mV), lo cual no permite la interacción entre los

complejos y la membrana celular, que está cargada negativamente <sup>[17]</sup>. Por lo tanto, se recurrieron a distintas estrategias para cambiar la manera en que interaccionarían los complejos entre C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> y ASO con la membrana celular. En la figura 3.5.2 se muestra un resumen de las transfecciones realizadas y sus resultados.

Dos estrategias se realizaron bajo la suposición de que el potencial  $\zeta$  de los complejos entre los polímeros C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> y ASO es ligeramente negativo. En la primer estrategia se neutralizó esta carga por medio de la adición de poli-D-Lisina, mientras que la segunda se formarían liposomas que encapsularían a los complejos entre los polímeros C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> y ASO. Como se muestra en la figura 3.5.2, no se observó la transfección, además de que se observaron células muertas.

Surgió una tercera estrategia, en la cual se realizaba una mezcla del polímero C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> y TAT para formar complejos con el ASO con el fin de la transfección. El péptido TAT es un péptido cuya secuencia contiene aminoácidos de naturaleza básica (YGRKKRRQRRRPQ) y se ha reportado que puede ser utilizado para la entrega de ácidos nucleicos ya que atraviesa la membrana celular de manera eficiente <sup>[35]</sup>.

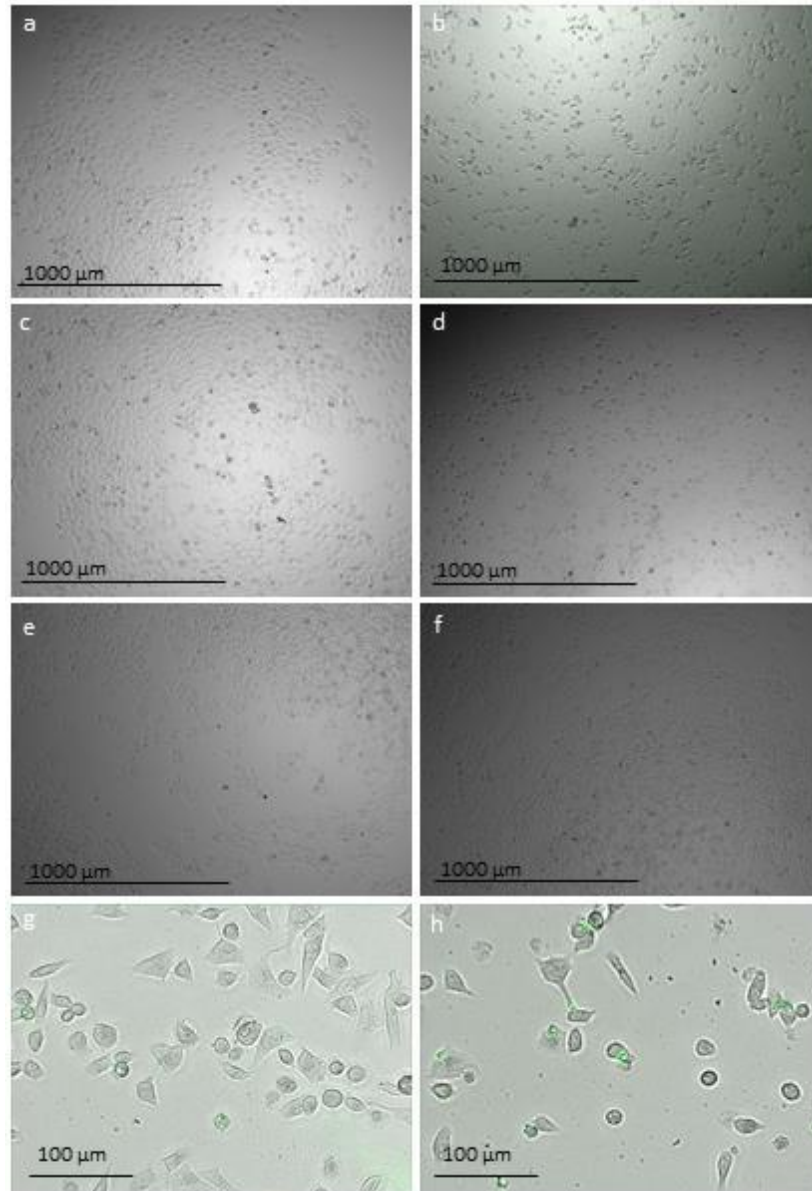
Con base en la figura 1 de la sección complementaria, se muestran los EMSA de unión al ASO de la mezcla entre el polímero C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> y TAT a diferentes proporciones. Se muestra que las mezclas tienen una menor afinidad por el ASO y, por lo tanto, los complejos son más inestables. Cuando se realizaron los ensayos de transfección, no se logró internalizar el ASO en las células.

Con base en los experimentos realizados, los polímeros del tipo C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> no son buenos acarreadores de los ASO por tres razones. La primera radica en la afinidad relativa de los polímeros por el ASO, ya que se necesita una relación mayor N/P mayor para unirse todo el ASO respecto tipo de ácidos nucleicos como el plásmido pACGFP-N1 (N/P 3) o un mRNA (N/P 7) <sup>[17]</sup>. La segunda razón está relacionada con la primera porque los complejos entre las proteínas C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> y el ASO son citotóxicos debido al exceso de proteína que está libre, y esto provocó que no hubiese transfección. Por lo tanto, un cambio del módulo de B<sup>K12</sup> por uno que muestre una mayor afinidad por el ASO sería alternativa.

La tercer razón es el potencial  $\zeta$  de los complejos, que se esperaría que sea negativo con base en la literatura, evita por repulsiones electrostáticas la interacción de éstos con la membrana celular. Por ello, el cambio del modo en que los complejos atraviesan la membrana celular sería otra alternativa. Esto podría lograrse con la adición de un módulo



de *targeting*, ya que los complejos serían reconocidos por cierto tipo de células y la entrada a la célula sería mediada por receptores. Esto dependerá de la aplicación. Por ejemplo, en cáncer se puede agregar una molécula de folato o la transferrina, ya que sus receptores están sobreexpresados en células tumorales [36]



**Figura 3.5.1** Transfección de los complejos  $C_4-S_n-B^{K12}$  con ASO. Se muestra la sobreposición de las imágenes del campo claro y el campo con el filtro de fluorescencia de un control sin tratamiento (a), un control con Lipofectamina 2000 y ASO en una relación 4:1 (b, g y h), complejos  $C_4-B^{K12}$  con ASO (c), complejos  $C_4-S_4-B^{K12}$  con ASO (d), ambos con una relación N/P 24. Además, se utilizaron complejos  $C_4-B^{K12}$  con el plásmido pAcGFP-N1 (e) y complejos  $C_4-S_4-B^{K12}$  con el plásmido pAcGFP-N1 (f) en una relación N/P de 3. La cantidad de ASO utilizado fue de 300 ng. Número de réplicas: 2.

**Figura 3.5.2** Resumen de transfecciones con las proteínas C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup>. Número de réplicas: 2.

<b>Lipofectamina 2000</b>				
<b>Líneas</b>	<b>m<sub>ASO</sub> (ng)</b>	<b>V<sub>L2000</sub> (μL)</b>	<b>Tiempo de incubación (h)</b>	<b>¿Transfección? Observaciones</b>
				Sí
<b>Ln229, U251, SKLU, HeLa</b>	100,0	0,15	4	
	200,0	0,3		
	300,0	0,6		
	<b>300,0 (plásmido, HeLa)</b>	<b>0,35 (HeLa)</b>		
<b>C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup>/C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> (N/P 24)</b>				
<b>Líneas</b>	<b>m<sub>ASO</sub> (ng)</b>	<b>C (μM)</b>		
<b>Ln229, SKLU, HeLa</b>	50,0 (HeLa)	4,2 (HeLa)	4, 8 y 24	No
	300,0	25,0		
	600,0	50,0		
	<b>300,0 (plásmido, HeLa)</b>	<b>3,0 (HeLa)</b>		
<b>C<sub>4</sub>-S<sub>n</sub>-B<sup>K12</sup> y recubrimiento con poli-D-Lisina 1,6 μg/mL</b>				
<b>Líneas</b>	<b>m<sub>ASO</sub> (ng)</b>	<b>C (μM)</b>		
<b>SKLU, HeLa</b>	300,0	25,0	24	No (Células muertas)
	600,0	50,0		
<b>C<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> 25 μM y Lipofectamina 2000</b>				
<b>Líneas</b>	<b>m<sub>ASO</sub> (ng)</b>	<b>V<sub>L2000</sub> (μL)</b>		
<b>SKLU, HeLa</b>	300,0	0,30	24	No (Células muertas)
	300,0	0,45		
<b>C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> y TAT (N/P 24)</b>				
<b>Líneas</b>	<b>m<sub>ASO</sub> (ng)</b>	<b>C<sub>C4K12</sub>/C<sub>TAT</sub></b>		
<b>HeLa</b>	300,0	1,0	8, 24 y 48	No
	300,0	3,0		
	300,0	5,7		

## 4. Conclusiones

Se han seleccionado dos polímeros del tipo  $C_4-S_n-B^{K12}$  que forman complejos con un ASO,  $C_4-B^{K12}$  y  $C_4-S_4-B^{K12}$ . Además, se determinó por medio de Polarización de la Fluorescencia que los polímeros  $C_4-B^{K12}$  y  $C_4-S_4-B^{K12}$  tienen una constante de afinidad por el ASO de 200 nM y 300 nM, respectivamente. Esto demostró que el módulo  $S_n$  aumenta la afinidad de estos polímeros por el ASO.

Ambos polímeros forman complejos con el ASO de 20 nm, pero debido a la coexistencia del polímero solo y el polímero complejado con ASO cuando se forman estos, no permiten realizar una medición precisa y exacta para la caracterización fisicoquímica de los complejos entre los polímeros  $C_4-S_n-B^{K12}$  y ASO. Se necesitan técnicas como cryo-TEM para determinar el tamaño de los complejos.

Los complejos entre los polímeros  $C_4-S_n-B^{K12}$  y el ASO fueron estables en dos sistemas *in vitro*, DMEM y LIT. Los complejos entre  $C_4-S_4-B^{K12}$  y el ASO son los más estables, demostrando que el módulo  $S_n$  también influye en la estabilidad de los complejos. Además, los polímeros  $C_4-S_n-B^{K12}$  protegieron al ASO de la degradación por parte de nucleasas en ambos sistemas.

Por otra parte, se observó que los polímeros  $C_4-S_n-B^{K12}$  presentan una menor citotoxicidad que la Lipofectamina 2000 y, a pesar de que el módulo  $S_n$  confiere estabilidad, también provoca que estos complejos sean más citotóxicos.

Finalmente, los polímeros del tipo  $C_4-S_n-B^{K12}$  no son agentes que puedan ser utilizados para la transfección de un ASO, debido principalmente a la afinidad de los polímeros por un ASO. Por lo tanto, es necesario el rediseño de polímeros para que funcionen como acarreadores de un ASO.

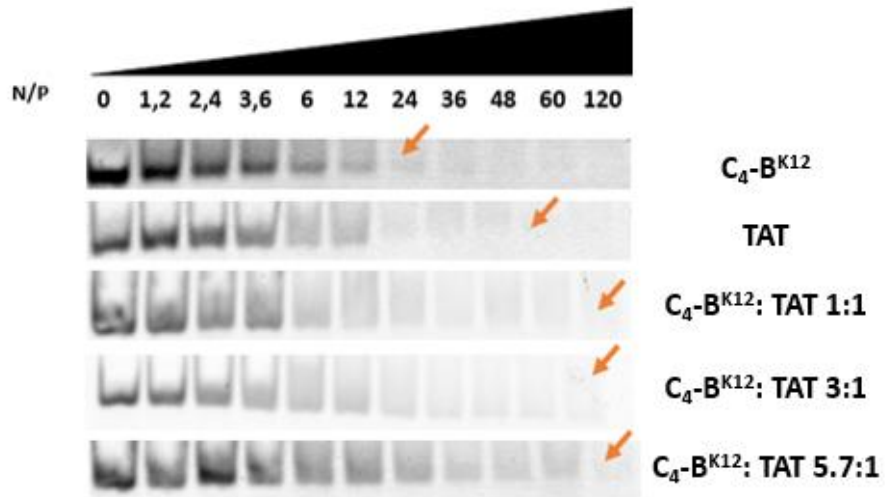
La primera modificación que se propone es el cambio del módulo de interacción con ácidos nucleicos, con lo cual se busca aumentar la afinidad de las proteínas por el ASO. La segunda modificación es la adición de un módulo de *targeting*, que mediará la entrada a la célula. Para ello se propone el conjugar a las proteínas una molécula de folato, cuyo receptor está sobreexpresado en líneas celulares tumorales [35].

## 5. Referencias

- [1] A. Philippidis, "Gene Therapy Briefs", *Human Gene Therapy Clinical Development*, vol. 25, no. 3, pp. 109-111, 2014.
- [2] S. Ginn, A. Amaya, I. Alexander, M. Edelstein and M. Abedi, "Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update", *The Journal of Gene Medicine*, vol. 20, no. 5, p. e3015, 2018.
- [3] X. Anguela and K. High, "Entering the Modern Era of Gene Therapy", *Annual Review of Medicine*, vol. 70, no. 1, pp. 273-288, 2019.
- [4] C. Rinaldi and M. Wood, "Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders", *Nature Reviews Neurology*, vol. 14, no. 1, pp. 9-21, 2017.
- [5] C. Bennett and E. Swayze, "RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 50, no. 1, pp. 259-293, 2010.
- [6] X. Shen and D. Corey, "Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs", *Nucleic Acids Research*, vol. 46, no. 4, pp. 1584-1600, 2017.
- [7] K. Frazier, "Antisense Oligonucleotide Therapies", *Toxicologic Pathology*, vol. 43, no. 1, pp. 78-89, 2014.
- [8] R. Juliano, "The delivery of therapeutic oligonucleotides", *Nucleic Acids Research*, vol. 44, no. 14, pp. 6518-6548, 2016.
- [9] C. Stein and D. Castanotto, "FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017", *Molecular Therapy*, vol. 25, no. 5, pp. 1069-1075, 2017.
- [10] M. Ramamoorthi, "Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview", *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, 2015.
- [11] B. Dalal, T. Quinn, L. Foster, M. Lin, M. Matthews and B. Yuhan, "Ligand-directed tumor targeting with hybrid viral phage nanoparticles", *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*, pp. 483-516, 2018.
- [12] R. Rai, S. Alwani and I. Badea, "Polymeric Nanoparticles in Gene Therapy: New Avenues of Design and Optimization for Delivery Applications", *Polymers*, vol. 11, no. 4, p. 745, 2019.
- [13] P. Saccardo, A. Villaverde and N. González-Montalbán, "Peptide-mediated DNA condensation for non-viral gene therapy", *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 4, pp. 432-438, 2009.
- [14] A. Hernandez-Garcia et al., "Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses", *Nature Nanotechnology*, vol. 9, no. 9, pp. 698-702, 2014.
- [15] A. Hernandez-Garcia, M. Werten, M. Stuart, F. de Wolf and R. de Vries, "Coating of Single DNA Molecules by Genetically Engineered Protein Diblock Copolymers", *Small*, vol. 8, no. 22, pp. 3491-3501, 2012.
- [16] N. Estrich, A. Hernandez-Garcia, R. de Vries and T. LaBean, "Engineered Diblock Polypeptides Improve DNA and Gold Solubility during Molecular Assembly", *ACS Nano*, vol. 11, no. 1, pp. 831-842, 2017.
- [17] S. Jekhmane et al., "Virus-Like Particles of mRNA with Artificial Minimal Coat Proteins: Particle Formation, Stability, and Transfection Efficiency", *Nucleic Acid Therapeutics*, vol. 27, no. 3, pp. 159-167, 2017.
- [18] M. Hashimoto, T. Nara, H. Hirawake, J. Morales, M. Enomoto and K. Mikoshiba, "Antisense Oligonucleotides Targeting Parasite Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Inhibits Mammalian Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*", *Scientific Reports*, vol. 4, no. 1, 2014.
- [19] "ATTO dyes", *Atdbio.com*, 2020. [en línea]. Disponible: <https://www.atdbio.com/content/36/ATTO-dyes>. [Acceso: 09- Mar- 2020].

- [20] L. Hellman and M. Fried, "Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions", *Nature Protocols*, vol. 2, no. 8, pp. 1849-1861, 2007. Available: 10.1038/nprot.2007.249
- [21] N. Moerke, "Fluorescence Polarization (FP) Assays for Monitoring Peptide-Protein or Nucleic Acid-Protein Binding", *Current Protocols in Chemical Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 1-15, 2009.
- [22] S. Goutelle et al., "The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling", *Fundamental & Clinical Pharmacology*, vol. 22, no. 6, pp. 633-648, 2008.
- [23] J. Stetefeld, S. McKenna and T. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences", *Biophysical Reviews*, vol. 8, no. 4, pp. 409-427, 2016.
- [24] A. Trache and G. Meininger, "Atomic Force Microscopy (AFM)", *Current Protocols in Microbiology*, vol. 8, no. 1, 2008.
- [25] T. Moore et al., "Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions", *Chemical Society Reviews*, vol. 44, no. 17, pp. 6287-6305, 2015.
- [26] J. Fernandes and O. Castellani, "Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*", *Experimental Parasitology*, vol. 18, no. 2, pp. 195-202, 1966.
- [27] H. ENGELBERG and A. Dudley, "Plasma Heparin Levels in Normal Man", *Circulation*, vol. 23, no. 4, pp. 578-581, 1961.
- [28] J. van Meerloo, G. Kaspers and J. Cloos, "Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay", *Methods in Molecular Biology*, pp. 237-245, 2011.
- [29] G. Ates, T. Vanhaecke, V. Rogiers and R. Rodrigues, "Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay", *Methods in Molecular Biology*, pp. 19-26, 2017.
- [30] G. Repetto, A. del Peso and J. Zurita, "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity", *Nature Protocols*, vol. 3, no. 7, pp. 1125-1131, 2008.
- [31] E. Cazares-"Estudio del autoensamblaje con ADN de una proteína Virométrica ", Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2020.
- [32] D. Savage, J. Hilt and T. Dziubla, "In Vitro Methods for Assessing Nanoparticle Toxicity", *Methods in Molecular Biology*, pp. 1-29, 2018.
- [33] B. Kong, J. Seog, L. Graham and S. Lee, "Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles", *Nanomedicine*, vol. 6, no. 5, pp. 929-941, 2011.
- [34] T. Wang, L. Larcher, L. Ma and R. Veedu, "Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides", *Molecules*, vol. 23, no. 10, p. 2564, 2018.
- [35] Y. Maegawa, S. Mochizuki, N. Miyamoto and K. Sakurai, "Gene silencing using a conjugate comprising Tat peptide and antisense oligonucleotide with phosphorothioate backbones", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 26, no. 4, pp. 1276-1278, 2016.
- [36] S. Kularatne and P. Low, "Targeting of Nanoparticles: Folate Receptor", *Methods in Molecular Biology*, pp. 249-265, 2010.

## Figuras complementarias



**Figura 1.** Formación de los complejos C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> /TAT con ASO. Se muestran los EMSA de unión por las diferentes mezclas entre C<sub>4</sub>-B<sup>K12</sup> y TAT por un ASO, donde se marca con una flecha la relación de N/P en la cual se ha unido el 100% del ASO.