



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**UNIÓN Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE DNA
MEDIANTE UN PÉPTIDO ACARREADOR
HIDROLIZABLE CON LUZ UV**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA**

PRESENTA

RAQUEL PAOLA OLGUÍN AZAMAR



CDMX

2021



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: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

VOCAL: CARMINA MONTIEL PACHECO

SECRETARIO: ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA

1er. SUPLENTE: SALVADOR GUADALUPE HERNÁNDEZ VARGAS

2º SUPLENTE: JOSÉ ÓSCAR HUMBERTO PÉREZ DÍAZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA

SUSTENTANTE:

RAQUEL PAOLA OLGUÍN AZAMAR

Índice General

Resumen.....	9
Introducción	10
Ácidos nucleicos.....	10
Sistemas acarreadores de ácidos nucleicos.....	12
Sistemas acarreadores basados en virus	14
Sistemas acarreadores no virales	15
Lípidos.....	16
Polímeros catiónicos	17
Péptidos penetrantes de membrana (CPPs)	18
Sistemas acarreadores con liberación controlada	19
Diseño de un péptido acarreador de AN	20
Diseño de un péptido acarreador de AN y responsivo a la luz.....	26
Objetivos.....	28
Metodología experimental.....	28
Hidrólisis del péptido P4-HL con luz UV	29
Interacción del péptido P4-HL con ADN 25pb.....	29
Efecto en la unión a ADN 25pb del péptido P4-HL pre-irradiado con luz UV.	29
Liberación de ADN del complejo P4-HL-ADN al irradiar con luz UV. ...	30
Resultados y discusión	30
Composición de P4-HL.....	30
Hidrólisis del péptido P4-HL con luz UV	32
Interacción del péptido con ADN	43
Efecto en la unión con ADN del péptido P4-HL previamente irradiado con luz UV.....	45

Liberación de ADN del complejo P4-HL-ADN al irradiar con lámpara 1 UV.	57
Conclusiones.....	63
Bibliografía	70

Índice de figuras

Figura 1: Estructura del ADN, donde TAGC representan las bases nitrogenadas (figura tomada de la página www.dciencia.es)	10
Figura 2: Dogma central de la biología molecular. Flujo de información genética del genoma a la síntesis de proteínas. (Figura tomada de la página www.dciencia.es y modificada por Raquel P. Olguín).....	11
Figura 3: Estructura del segundo dominio de unión a ARN de doble cadena (Xlrbpa-2) complejado con dsARN. La proteína interactúa con dos surcos menores sucesivos y a través del surco principal que interviene en una cara de la hélice dsARN. La proteína se muestra en morado. Los residuos de la cadena lateral que interactúan con el surco menor de ARN en las regiones 1 y 2 son de color verde, y las cadenas laterales que interactúan con el surco mayor de ARN en la región 3 son de color gris. También se muestran en gris las cadenas laterales de Y131 y F145 que sirven para colocar K167 y K163, respectivamente. Los átomos de oxígeno se muestran en rojo, nitrógeno en azul, y fósforo en amarillo. Tomado de (Ryter y Schultz, 1998).	21
Figura 4: Vista ampliada de la Región 1 en la que la hélice α N-terminal interactúa con el surco menor de ARN, y Región 2 en donde el bucle entre las cadenas β 1 y β 2 interactúa con el surco menor de ARN (Ryter y Schultz,1998).	22
Figura 5: Vista ampliada de la Región 3, en donde los residuos dentro y justo antes del extremo N-terminal de la hélice α C-terminal interactúan a través de la ranura principal (Ryter y Schultz,1998).....	22
Figura 6: Para formar P4 se utilizó un segmento denominado P2 que contiene la secuencia de la región 3 presente en la proteína dsRBD completa que une a dsARN (P1 se descartó ya que se encuentra dentro de una secuencia muy hidrofóbica) (Ryter y Schultz,1998). Se fusionó P2 con un segmento peptídico P3 para obtener la secuencia del péptido P4.	24

Figura 7: Electroforesis, las bandas representan al siARN libre (Hernández-García, et al., 2017).	24
Figura 8: Unión de los diferentes péptidos con siARN (Hernández-García, et al., 2017).	25
Figura 9: Aminoácido Nitrobencil, aminoácido responsivo a luz UV.	26
Figura 10: Péptido P4-HL, formado por P3, el aminoácido Nitrobencil, y P2.	26
Figura 11: Hidrólisis de P4-HL cuando es irradiado con luz UV. Como resultado hay dos fragmentos uno con P3 y otro con P2.	27
Figura 12: Síntesis de P4-HL, en donde se observa como el aminoácido NB sirve como un puente de unión entre P3 y P2.	31
Figura 13: Electroforesis SDS-PAGE al 20% de P4-HL 125 μ M irradiado a diferentes tiempos. En donde se observa que la banda oscura se va haciendo más pequeña al aumentar el tiempo de irradiación. La franja oscura corresponde a P4-HL.	32
Figura 14: Relación del Tiempo de irradiación UV vs %P4-HL intensidad banda.	33
Figura 15: Electroforesis SDS-PAGE, poliacrilamida 20%. La banda blanca que corresponde a P4-HL, va disminuyendo de intensidad de izquierda a derecha al aumentar el tiempo de irradiación UV.	33
Figura 16: Relación de P4-HL irradiado con UV a diferentes tiempos. Se puede observar un decaimiento en la concentración de P4-HL. Llegando a los 50.59% de la concentración original con 677 minutos de irradiación UV con la lámpara 1.	34
Figura 17: Análisis por MALDI-TOF de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con lámpara 1. A 0 minutos de irradiación, solo se encuentra el pico correspondiente a P4-HL b) 20 minutos de irradiación, c) 234 minutos de irradiación, aparecen los picos correspondientes a P3 y P2 y d) 676 minutos de irradiación, los picos P3 y P2 aumentaron, sin embargo al incrementar el tiempo de irradiación UV el pico correspondiente a P4-HL sigue siendo el mayor.	35
Figura 18: Análisis por MALDI-TOF de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con lámpara 1 UV. A los 0 minutos de irradiación solo se	

encuentra P4-HL. Se observa que aparece P3 a los 120 minutos de irradiación.	37
Figura 19: Resultados por MALDI-TOF de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con lámpara 1 UV. A los 0 minutos de irradiación, se encuentra el pico correspondiente a P4-HL. Aparecen los picos correspondientes a P3 y P2, a los 450 minutos de irradiación.	38
Figura 20: Electroforesis SDS-PAGE de P4-HL irradiado a diferentes tiempos.....	39
Figura 21: Electroforesis SDS-PAGE de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con lámpara 2 (100 W) con longitud de onda de 365 nm. Las bandas oscuras representan a P4-HL. Esta va disminuyendo de derecha a izquierda, a los 180 minutos de irradiación casi ha desaparecido. La banda oscura en el tiempo 0 de irradiación, representa a P4-HL 160 μ M. En el extremo izquierdo se encuentra el marcador de peso molecular donde la banda inferior tiene un peso de 3496 Da y la banda superior de 6500 Da.....	39
Figura 22: Gráfica que muestra la relación del Tiempo de irradiación UV vs %P4-HL. La concentración de P4-HL es inversamente proporcional al tiempo de irradiación UV con la lámpara 2. Se puede notar una relación lineal del % P4-HL con el tiempo de irradiación UV.	40
Figura 23: Resultados de MALDI-TOF de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con una lámpara de 100W de potencia. Al minuto 0, solo se encuentra presente el pico correspondiente a P4-HL, a los 10 minutos de irradiación, solo aparecen los picos P3 y P2. A los 103 minutos P3 es el pico de mayor tamaño reduciéndose considerablemente el pico de P4-HL. Finalizando a los 240 minutos de irradiación, P3 es el pico de mayor tamaño, y el pico de P4-HL casi ha desaparecido.....	42
Figura 24: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6 % de P4-HL a diferentes concentraciones mezclado con una concentración fija de ADN para formar el complejo P4-HL-ADN. La franja blanca representa el ADN que se encuentra libre.....	43
Figura 25: Gráfica con diferentes concentraciones de P4-HL (μ M) vs ADN libre (%). Cuando P4-HL alcanza una concentración de 30 μ M, hay un decaimiento significativo en el ADN libre.	45

Figura 26: Electroforesis en gel poliacrilamida 6% de P4-HL irradiado (P4-HLi) por 30 minutos antes de formar el complejo P4-HL-DNA. P4-HLi se mezcló a diferentes concentraciones con una concentración fija de ADN..... 46

Figura 27: Gráfica de P4-HL a diferentes concentraciones irradiado por 30 minutos vs DNA libre. Cuando P4-HLi tiene una concentración de 30 μ M ha encapsulado el ADN por completo. 47

Figura 28: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6 % de P4-HLi por 60 minutos y mezclado con ADN para formar el complejo P4-HLi -ADN. Cuando P4-HLi tiene una concentración de 50 mM ha encapsulado el ADN por completo. 47

Figura 29: Relación de la Concentración de P4-HLi vs ADN libre..... 48

Figura 30: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6%. P4-HLi irradiado por 90 minutos para formar el complejo P4-HLi-ADN. Con este tiempo de irradiación la franja blanca ya no desaparece. 49

Figura 31: Relación de las Diferentes concentraciones de P4-HL vs ADN libre..... 49

Figura 32: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6 % de P4-HL irradiado por 127 min y mezclado con ADN para formar el complejo P4-HLi-ADN. La franja blanca se mantiene casi igual en todos los tiempos con la misma intensidad y tamaño. 50

Figura 33: Relación de la Concentración de P4-HLi vs ADN libre..... 50

Figura 34: Gráfica de la concentración de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con la lámpara 1 y posteriormente mezclado a diferentes concentraciones con una concentración fija de ADN para formar el complejo P4-HLi-ADN..... 51

Figura 35: Concentración de P4-HL vs tiempo de irradiación UV necesario para encapsular el 50% de ADN..... 52

Figura 36: Electroforesis de P4-HLi (80 μ M) en gel de poliacrilamida 6%. P4-HL se irradió a diferentes tiempos con la lámpara 1 UV. Las franjas blancas representan el ADN libre que no pudo ser encapsulado. 53

Figura 37: Relación de tiempo de irradiación UV vs Intensidad de la banda. 53

Figura 38: Electroforesis de P4-HLi-ADN en un gel de poliacrilamida 6%, 100V por 30 min. M: marcador de peso y C: control que representa el 100% de ADN libre. Las bandas blancas representan al ADN libre..... 54

Figura 39: Relación del Tiempo irradiación UV vs % ADN libre..... 54

Figura 40: Resultados de MALDI-TOF de P4-HL irradiado con lámpara 2 a diferentes tiempos. Al minuto 0 solo se encuentra P4-HL, a los 10 minutos se encuentran presentes los picos P2 y P4-HL, al minuto 45 aparece el pico correspondiente a P3. A los 180 minutos P3 es el pico más alto, y a los 220 minutos de irradiación el pico correspondiente a P4-HL es el más pequeño. 56

Figura 41: Electroforesis en gel poliacrilamida 6%. La intensidad de las bandas blancas corresponde al ADN libre. Electroforesis del complejo P4-HL-ADN al ser sometido a diferentes tiempos de irradiación. P4-HL tiene una concentración final de 80 μ M y el ADN de 0.2 μ M..... 57

Figura 42: Relación del tiempo de irradiación UV (min) vs Intensidad de la banda. La intensidad de la banda representa al ADN liberado. 58

Figura 43: Quitando los puntos mencionados se obtiene la siguiente ecuación: $y = 5.0131x + 321.58$ y con $R^2 = 0.9798$ 58

Figura 44: Electroforesis del complejo P4-HL-ADN irradiado a diferentes tiempos. Las franjas oscuras representan el ADN que se encuentra libre después de ser encapsulado. La electroforesis se hizo en gel de poliacrilamida 6% a 80V 45min y 100V 10min. C representa el 100% de ADN libre, si no estuviera encapsulado por P4-HL. 59

Figura 45: Relación del Tiempo de irradiación UV en minutos vs ADN libre (%). 60

Figura 46: Relación lineal entre %ADN libre y el tiempo de irradiación.60

Figura 47: Resultados de MALDI-TOF del complejo P4-HL-ADN irradiado a diferentes tiempos con la lámpara 2. Al minuto 0 solo se encuentra presente el pico correspondiente a P4-HL, a los 5 minutos aparece el pico correspondiente P2, en el minuto 55 aparece el pico correspondiente a P3 y a los 90 minutos de irradiación, el pico correspondiente a P4-HL es el más chiquito. 62

Resumen

El ARN pequeño de interferencia (ARNsi) se puede utilizar terapéuticamente para bloquear la síntesis de proteínas causantes de enfermedades. Para liberar el ARNsi se requieren de materiales que lo encapsulen y liberen controladamente. Investigaremos un péptido, el cual tiene la propiedad de unirse a los ácidos nucleicos (AN) además de ser responsivo a luz, como modelo de encapsulamiento y liberación controlada.

Diseño del Péptido. Se utilizó un segmento de 27 aminoácidos (P2) presente en un dominio de proteínas de unión a ARN de doble cadena (dsRBD). Se fusionó P2 con un segmento peptídico P3 para obtener P4. P4 se modificó con un enlace nitrobenzil formando P4-HL.

Resultados. P4-HL es irradiado con UV para observar el efecto de hidrólisis. Se irradió a diferentes tiempos con dos lámparas de luz UV de diferente potencia (100W y <<100W). Se pudo observar que P4-HL se hidroliza más rápido cuando la potencia es mayor. El tiempo de irradiación con luz UV es directamente proporcional a la hidrólisis de P4-HL, por medio de estudios de MALDI-TOF se comprobó que después de 5 minutos de irradiación empiezan aparecer los picos P2 y P3. Después de los 90 minutos de irradiación el pico P4-HL disminuye drásticamente.

Para comprobar su efectividad como material encapsulador P4-HL se mezcló con ADN de doble cadena (ADNs), variando la concentración de P4-HL y manteniendo una concentración fija de ADN de 0.2 μ M. Mediante gel de electroforesis se verificó la concentración de P4-HL a la cual se encapsula todo el ácido nucleico. Finalmente para verificar la liberación de AN de P4-HL-ADN, se irradió a diferentes tiempos, manteniendo constante la concentración de P4-HL-ADN. Al ser irradiado el complejo, dependiendo del tiempo de irradiación, el ADN es liberado.

Introducción

Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos (AN) son un polímero formado con cuatro clases de monómeros, son moléculas de ribosa o desoxirribosa fosforiladas, con bases púricas o pirimidínicas unidas a sus carbonos 1' (Figura 1). Son hidrófilos, a pH fisiológico los grupos fosfato presentan dos cargas negativas por lo que son de naturaleza ácida y debido a su longitud dan soluciones viscosas. Los AN empiezan cada vez más a tener un papel como fármaco o para uso terapéutico, especialmente para su uso en terapia genética (Wittrup y Lieberman, 2015).

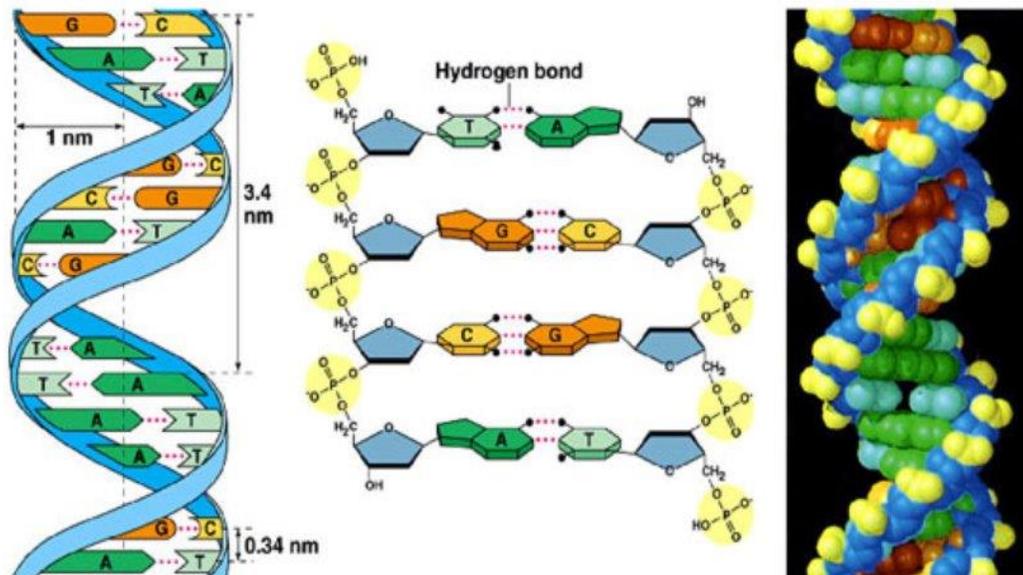


Figura 1 : Estructura del ADN, donde TAGC representan las bases nitrogenadas, Timina, Adenina, Guanina y Citosina (figura tomada de la página www.dciencia.es)

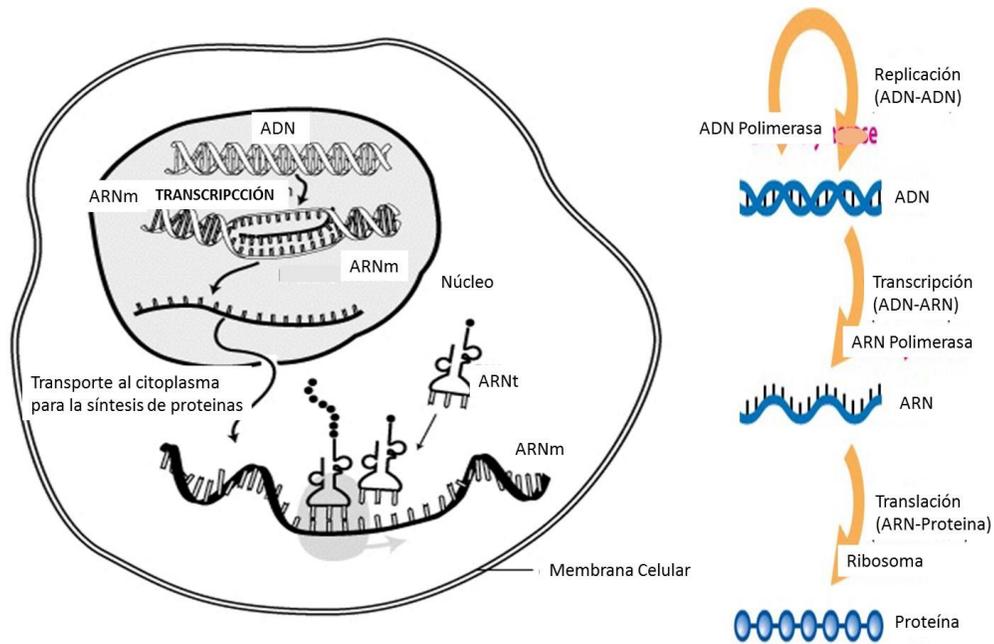


Figura 2 : Dogma central de la biología molecular. Flujo de información genética del genoma a la síntesis de proteínas (Figura tomada de la página www.dciencia.es y modificada por Raquel P. Olguín)

Su importancia para modular el comportamiento fisiológico de una célula se entiende cuando se analiza el dogma central de la biología molecular, en donde se establece que el flujo de información genética va del ADN al ARN y de éste a las proteínas (Figura 2).

Una vez que los AN son administrados en el organismo, requisito necesario para ser usados como fármacos, se enfrentan a muchas barreras fisiológicas para alcanzar su sitio de acción. Los AN son inestables en el torrente sanguíneo, pueden ser inmunogénicos, y no atraviesan fácilmente las membranas para entrar en las células debido a su alto peso molecular (>5 kDa), y alta carga negativa a consecuencia de los grupos fosfatos que están cargados negativamente a pH fisiológico (pH = 7.4) (Kanasty, et al., 2013).

Existen varios tipos de AN que están siendo investigados para su uso como fármaco.

Los oligonucleótidos antisentido (ASO) dependientes de RNasa H son oligonucleótidos modificados químicamente, de cadena sencilla que se unen a secuencias complementarias de ARNm y reducen la expresión génica. Los ASO de omisión de exón son ASO modificados químicamente de cadena sencilla que se dirigen a uniones intrón-exón. La unión inhibe el empalme en este sitio y obliga a elegir un sitio de empalme alternativo (Wittrup y Lieberman, 2015).

Los ARN pequeños de interferencia (siARN) son ARN de doble cadena de 21 a 23 nucleótidos, generalmente modificados químicamente, con una cadena activa antisentido que es exactamente complementaria a una secuencia en cualquier parte del ARNm objetivo. Los siARN son captados por el complejo silenciador inducido por ARN citosólico (RISC) (Wittrup y Lieberman, 2015).

Los oligonucleótidos pueden usarse para antagonizar (en cuyo caso se conocen como anti-miR) o imitar la función de los microARN endógenos (miARN). El RISC capta los miARN nativos, que suprimen la expresión génica de los ARN que contienen secuencias parcialmente complementarias al bloquear su traducción o acelerar su degradación. Suprimen la expresión de cientos de transcritores pero de manera menos eficiente que los siARN. Los ASO monocatenarios, modificados químicamente pueden unirse a miARN para bloquear su actividad (Wittrup y Lieberman, 2015).

Sistemas acarreadores de ácidos nucleicos

Una estrategia para ayudar a los AN a alcanzar su sitio de acción es el uso de moléculas acarreadoras (vectores) que los encapsulen para que los protejan y los transporten al interior de las células. Se denomina vector al sistema que transporta a los AN al interior de las células en el sitio de acción específico.

Los vectores son sistemas de entrega o moléculas acarreadoras, para su uso en organismos deben de ser diseñados para tener la capacidad de proporcionar las siguientes propiedades (Li, et al., 2014):

- 1) estabilidad contra las nucleasas séricas
- 2) evasión del sistema inmune
- 3) evitar interacciones no específicas con proteínas séricas y células que no son el objetivo
- 4) prevención de aclaramiento renal
- 5) salida de los vasos sanguíneos para llegar a los tejidos seleccionados
- 6) entrada a las células
- 7) incorporación en la maquinaria celular adecuada

Los vectores con altas cargas positivas en la superficie pueden presentar una agregación desfavorable con eritrocitos. Las terapias más exitosas basadas en AN tienen como clave el desarrollo de vectores de distribución seguros y eficientes.

Históricamente los vectores se han desarrollado para modificar la vía de administración en beneficio del paciente, mejorar la biodisponibilidad, o cambiar el perfil de liberación. Los sistemas de liberación se deben desarrollar para identificar el sitio que es el objetivo, el cual puede ser un órgano, una célula, un compartimento celular o incluso un organelo, dirigirse a él y entregar selectivamente su carga terapéutica. Una propiedad que también es importante, es que la entrega del fármaco deberá ser de manera controlada en respuesta a un estímulo interno (pH, enzimas, o un cambio del potencial redox) o externo (luz, temperatura, campo magnético) (Universidad de Navarra, 2013).

Existen dos tipos fundamentales de vectores: los basados en virus (vectores virales) y los vectores sintéticos (vectores no virales) que

intentan emular la capacidad natural que tienen los virus de introducir ácidos nucleicos en las células.

Sistemas acarreadores basados en virus

Fueron los primeros en ser utilizados ya que naturalmente funcionan como vehículos de AN. Los virus están compuestos por ADN o ARN rodeado de una cápside proteica y algunas veces lipoproteica. El ciclo biológico de los virus ocurre por la introducción del genoma viral en determinados tipos de células, esto pasa por la presencia de receptores en la membrana de la célula. Para poder utilizar un virus como vector, es necesario insertar el AN terapéutico en el genoma viral, y conseguir al mismo tiempo que el virus no se replique y por lo tanto que no sea patogénico. Estos virus que son utilizados como vectores se denominan virus recombinantes y defectivos (carecen de alguna función necesaria para su propio ciclo replicativo).

Los más comunes son (Universidad de Navarra, 2013):

- *Vectores retrovirales*: Los retrovirus son virus de ARN cubiertos por fosfolípidos, con glicoproteínas que determinan el tropismo del virus al ser reconocidos por receptores específicos, dentro hay una cápside proteica de estructura icosaédrica que contiene 2 copias del genoma viral.
- *Vectores adenovirales*: Son virus ADN sin capa envolvente, consta de una cápside icosaédrica que está compuesta por 720 proteínas *hexona* y 60 proteínas *pentona*.
- *Vectores virales adenoasociados*: Son Parvovirus que infectan al hombre pero no son patógenos.

Los vectores virales presentan varias limitaciones. El principal problema de los vectores virales es el riesgo de que provoquen **inmunogenicidad y un choque anafiláctico**. Se deben administrar concomitantemente con varios inmunosupresores, lo cual eleva el riesgo

de que se produzcan otras enfermedades (infecciones o tumores, entre otras). Otra gran desventaja es que no se pueden volver a administrar ya que se desarrollan anticuerpos contra la cápside viral y ya no son efectivos (son neutralizados por el sistema inmune). Los vectores víricos poseen asimismo una capacidad limitada de almacenaje de material genético. Los vectores no virales tienen muchas menos restricciones de tamaño, por lo que podrían suponer una alternativa eficaz a la hora de transfectar material genético de mayor tamaño (Adán, 2018).

Sistemas acarreadores no virales

Los *vectores no virales* representan un intento de imitar las funciones de los virus como vehículos de transferencia génica mediante sistemas sintéticos. En principio son vectores mucho más seguros desde el punto de vista de su peligrosidad biológica y su patogenicidad. Se han desarrollado vectores no virales que a su vez se subdividen en dos tipos: físicos y químicos. Los físicos debilitan la membrana celular para hacerla más permeable a los AN; entre estos se incluyen la inyección hidrodinámica y la electroporación (Aliabadi, et al., 2012). Sin embargo, los que presentan un mayor potencial para su uso en clínica (ya que son menos invasivos) son los vectores químicos, donde los AN son encapsulados en transportadores de diferente composición y tamaño micro o nanométrico. Entre ellos destacan diversas formulaciones de lípidos catiónicos, polímeros o péptidos penetrantes de membrana (CPPs) (Adán, 2018).

Los vectores no víricos pueden ser preparados en grandes cantidades a bajos costos, transfectar moléculas más grandes, ser almacenados durante más tiempo debido a su estabilidad, y provocan menos inmunogenicidad.

Hasta el momento los vectores no víricos más prometedores se han dividido en tres tipos: **lípidos, polímeros y péptidos**. Basados en moléculas catiónicas. Un gran desafío para el silenciamiento genético es resolver el problema inherente en el diseño de vectores ideales de distribución, por un lado los vectores deben hacer un complejo estrecho y estable con el AN durante la circulación y por otro lado deben ser capaces de facilitar su liberación en el citoplasma (Aliabadi, et al., 2012).

Lípidos

Los liposomas han sido particularmente exitosos para el suministro de fármacos solubles en agua atrapados en el núcleo. Se han explorado ampliamente para el suministro de AN debido a su biocompatibilidad de tamaño adecuado (alrededor de 100 nm). De sus componentes, y especialmente la facilidad de preparación. Por ejemplo el 1,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC) puede encapsular alrededor del 65% de AN simplemente mezclando las soluciones de los dos componentes. Dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC), y fosfatidilcolina (PC) son otros lípidos neutros utilizados en la preparación de liposomas. Los complejos de lípidos catiónicos con ácido nucleico forman complejos conocidos como lipoplejos. La principal ventaja es la interacción espontánea con el AN y las membranas celulares, lo que conduce a una mayor internalización celular, pero tiene una mayor toxicidad en comparación con los neutros.

Los lipoplejos han sido utilizados exitosamente para el suministro de AN contra el factor de necrosis tumoral en ratones, se ha utilizado el 1,2-dioleoil-3-trimetilaminoniun propano (DOTAP) por vía intravenosa y contra el factor de crecimiento epitelial vascular por inyección subretinal (Aliabadi, et al., 2012).

Los reactivos de Lipofectamina son ampliamente aceptados como el estándar para el suministro seguro de AN exógeno a las células. Es

capaz de evitar eficientemente el transporte intracelular activo a lo largo de los microtúbulos. Este resultado se logra mediante un movimiento browniano aleatorio de vesículas que contienen lipofectamina dentro del citoplasma, la difusión browniana es una ruta eficiente para que los complejos de lipofectamina-AN eviten la degradación metabólica, lo que conduce a una transfección óptima (Cardarelli. et al., 2016).

Polímeros Catiónicos

Los complejos supramoleculares de AN formados con polímeros catiónicos (poliplejos) se han convertido en una estrategia dominante para mejorar la eficacia. Micropartículas de polímeros de ácido D, L-lactido-co-glicólido (PLGA) se han utilizado para el suministro de AN. Se unen fácilmente a segmentos portadores de AN, no producen respuesta citotóxica. La polietilenimina (PEI) es una macromolécula con un alto potencial de cargas positivas, y puede aceptar protones a cualquier pH. Esta propiedad le permite actuar como buffer dentro de los endosomas protegiendo al AN de la degradación lisosomal (Aliabadi, et al., 2012).

El quitosano, β (1-4)-2-amino-2-dioxi-D-glucosa o glucosamina es un polisacárido con excelentes propiedades. La carga positiva que se produce en medio ácido como resultado de la protonación del grupo amino presente en cada unidad de glucosamina le confiere solubilidad en medio acuoso. Es utilizado para distribuir o transportar fármacos permitiendo programar un perfil de descarga del componente microencapsulado, además de llevar a salvo el agente terapéutico para alcanzar una concentración efectiva en el sitio de acción específico. Pueden cargar varios componentes activos beneficiando la distribución, retención en el organismo o incrementando la eficacia del tratamiento mientras suprimen los mecanismos celulares que pueden limitar la respuesta terapéutica (Olivera, et al., 2012).

Péptidos Penetrantes de Membrana (CPPs)

Los péptidos penetrantes de membrana (*Cell Penetrating Peptides*) han demostrado tener un gran potencial como vehículo de AN pero hasta ahora están en desarrollo inicial. Los CPPs son cortos (normalmente no exceden los 30 aminoácidos) y poseen la capacidad de cruzar membranas celulares mientras transportan una carga, con poca toxicidad. Se sabe que pueden penetrar de forma activa o de forma pasiva. En general los diferentes CPPs no poseen secuencias homólogas entre ellos, y cada uno presenta diferentes mecanismos de internalización celular. Existen dos maneras de combinar los CPP con la carga: de forma covalente y de forma no covalente.

Según sus características fisicoquímicas los CPPs se pueden clasificar en: Péptidos altamente catiónicos, quienes fueron los primeros en ser descubiertos. Péptidos anfipáticos, pueden estar cargados positiva o negativamente a pH fisiológico, aunque la mayoría tienen carga positiva. Péptidos hidrofóbicos, son aquellos que contienen una secuencia o un grupo químico hidrofóbico, esta secuencia aumenta la eficiencia de transfección y también se cree que puede incrementar el tiempo medio de circulación, los más destacados son los péptidos "grapados" (un hidrocarburo unido a dos residuos del péptido), péptidos prenilados (a los que se les añadió un isoprenoide) y las pepducinas (con un ácido graso acoplado al aminoácido N-terminal); y péptidos anfipáticos con aldehídos acoplados a través de un enlace hidrazona.

Un tipo específico de CPPs que puede resultar muy útil para transportar AN al interior del núcleo de la célula son los que tienen Secuencias de Localización Nuclear (NLS), que permite que el CPPs acceda al núcleo a través de los poros nucleares.

Uno de los mayores problemas de los CPPs es restringir su acción al tejido que es el objetivo ya que penetran indistintamente cualquier tipo de célula. Se puede resolver de dos maneras, introducir promotores

específicos en el transgén, o bien se puede diseñar un sistema de liberación selectiva (Adán 2018).

Sistemas acarreadores con liberación controlada

Un aspecto importante en el uso de AN en terapias es la liberación controlada. Para ello han sido desarrollados vectores versátiles e inteligentes y sensibles a diferentes estímulos. Se ha demostrado que los vectores de suministro con respuesta a pH, luz o reacciones redox son capaces de facilitar la liberación de AN en el citoplasma de la célula objetivo y por lo tanto potenciar la eficiencia de su efecto genético. (Hernández-García, et al., 2019) (Li, et al., 2014)

Los vectores responsivos a la luz son muy prometedores porque pueden ser aplicados remotamente con alta precisión espacial y temporal, y la luz puede ser utilizada como un estímulo externo para controlar la liberación de la carga de los sistemas de distribución. Por ejemplo, se ha reportado un vector anfifilo que tiene un grupo **2-nitrobencil (NB)** que une a una cola larga hidrofóbica y una cabeza catiónica mediante un enlace éster, este enlace nitrobencil se hidroliza con luz UV (fotolabil) (Li, et al., 2014). En soluciones acuosas, el anfifilo se autoensambla en nanopartículas que son sensibles a luz UV (USNPs), con un núcleo hidrofóbico y un caparazón catiónico. El núcleo hidrofóbico mantiene la estabilidad de las nanopartículas, mientras el caparazón catiónico posee sitios complejos para la condensación de AN. Cuando se irradia con luz UV, se desencadena la hidrólisis del enlace NB, provocando el desplazamiento del caparazón hidrofílico y posteriormente facilita la liberación de **AN** del complejo y así ejercer su efecto biológico. Tras la irradiación con luz UV, el enlace éster NB se escinde. Una clave en el diseño de las USNPs, es la degradación inducida por UV del portador para facilitar la liberación del siARN. Los complejos USNPs-AN son más estables cuando se les deja reaccionar de 3-5 horas. Las USNPs son eficientes en la entrega de AN en células cancerosas.

Cuando es expuesta a luz UV se desencadena el desprendimiento del enlazador, causado por la rápida degradación de la nanopartícula, facilitando la liberación intracelular de AN, y logrando aumentar la eficiencia del silenciamiento de genes (Li, et al., 2014).

Los hidrogeles que contienen enlazadores fotodegradables tienen un gran potencial en aplicaciones de liberación controlada e ingeniería de tejidos. Por ejemplo se podrían atrapar fármacos o inmovilizar células y se puede liberar su carga en el momento deseado debido a un estímulo externo como la luz provocando la segmentación de los enlazadores fotolábiles (Seok, et al., 2013).

La mayoría de las unidades fotolábiles contienen un radical orto-nitrobencilo (o-NB), que es altamente susceptible a la exposición a la luz UV. Los espectros de absorbancia de los macrómeros que contienen grupos o-NB generalmente alcanzan un máximo alrededor de 280-400 nm y se reducen en el rango de luz visible inferior 430 nm (Seok, et al., 2013). Al exponerse a la longitud adecuada de manera selectiva, los grupos de o-NB se fotolisan de manera efectiva, dando como resultado la liberación de moléculas.

Diseño de un péptido acarreador de AN

Los péptidos han sido de interés como sistema de suministro de siARN ya que son estructuralmente bien definidos, biodegradables, a menudo no tóxicos, y pueden ser preparados mediante métodos de síntesis rentables. Con los péptidos existe la posibilidad de incorporar secuencias bioinspiradas que específicamente reconozcan AN o proteínas para propósitos de focalización. Una de las estrategias más comunes ha sido el uso de péptidos penetradores de células como portadores de AN, sin embargo, estas moléculas tienen interacciones electrostáticas no específicas con siARN y tienden a ser tóxicos como resultado de su alta carga positiva (Hernández-García, et al., 2019).

Recientemente se reportó una partícula supramolecular que transfecta eficientemente las células neuronales. Se diseñó utilizando un péptido de unión a ARN de doble cadena (dsARN) tomado de anfibios, combinado con un péptido propenso a auto-ensamblarse en estructuras supramoleculares. Se utilizó (Figura 3) un segmento de 27 aminoácidos (denominado **P2**) presente en un dominio de proteínas de unión a dsARN (dsRBD) (región 3) de *Xenopus laevis* (Hernández-García, et al., 2019).

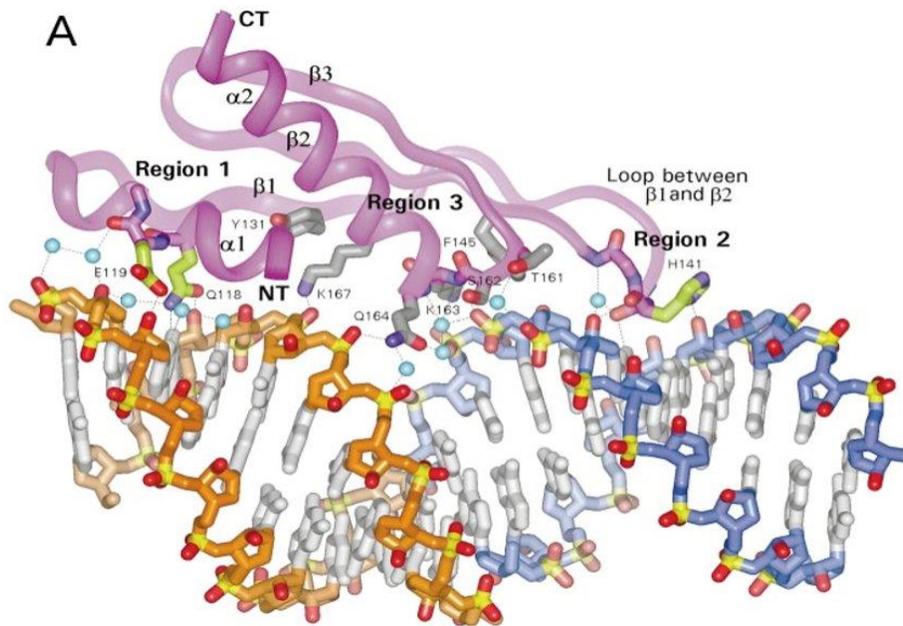


Figura 3: Estructura del segundo dominio de unión a ARN de doble cadena (Xlrba-2) complejo con dsARN. La proteína interactúa con dos surcos menores sucesivos y a través del surco principal que interviene en una cara de la hélice dsARN. La proteína se muestra en morado. Los residuos de la cadena lateral que interactúan con el surco menor de ARN en las regiones 1 y 2 son de color verde, y las cadenas laterales que interactúan con el surco mayor de ARN en la región 3 son de color gris. También se muestran en gris las cadenas laterales de Y131 y F145 que sirven para colocar K167 y K163, respectivamente. Los átomos de oxígeno se muestran en rojo, nitrógeno en azul, y fósforo en amarillo. Tomado de (Ryter y Schultz, 1998).

Las interacciones se pueden dividir en 3 regiones: Región 1, interacción de la hélice α N-terminal con el surco menor de ARN (Figura 4); Región 2, interacción del bucle entre las cadenas β 1 y β 2 con el surco menor de ARN; Región 3, interacción de la hélice α C-terminal a través del surco principal de ARN (Ryter y Schultz, 1998).

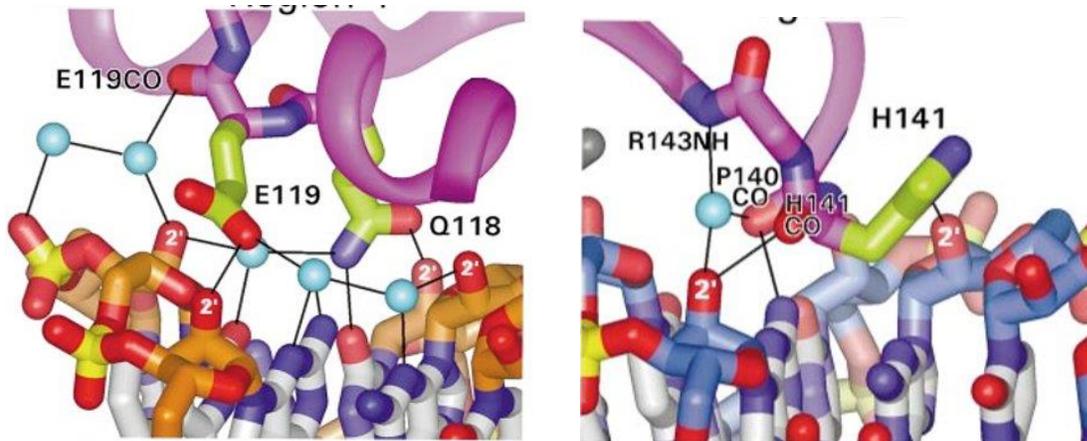


Figura 4: Vista ampliada de la Región 1 en la que la hélice α N-terminal interactúa con el surco menor de ARN, y Región 2 en donde el bucle entre las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$ interactúa con el surco menor de ARN. (Ryter y Schultz, 1998).

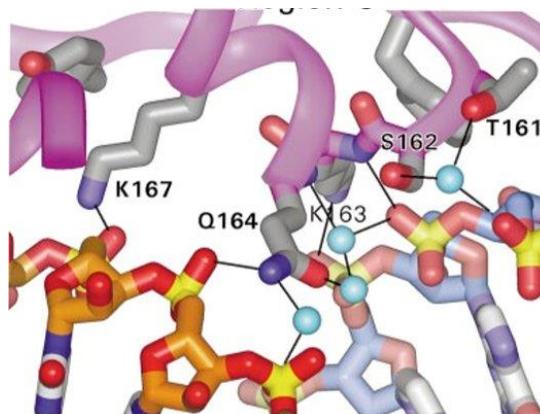


Figura 5: Vista ampliada de la Región 3, en donde los residuos dentro y justo antes del extremo N-terminal de la hélice α C-terminal interactúan a través de la ranura principal. (Ryter y Schultz, 1998).

En la Región 1, la hélice α de tres vueltas N-terminal interactúa con el surco menor del ARN. Dos cadenas laterales Q118 y E119 y un grupo principal de péptido CO de E119 están involucrados en interacciones directas y mediadas por agua con 4 grupos 2'-OH y cinco grupos funcionales de base en el surco menor del ARN. En la Región 2, el bucle entre las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$ interactúa con el surco menor

adyacente del ARN. En la Región 3 (Figura 5), la proteína interactúa a través del surco principal del ARN. Un segmento muy corto que incluye la porción N-terminal de la hélice α C-terminal (161-167 residuos) proporciona todas las interacciones principales del surco. En el lado de la ranura principal proximal a la región 2, los grupos NH amida de los residuos 163 y 164 que están en el extremo N-terminal de la hélice α de cinco vueltas interactúan con un oxígeno de no enlace de la columna vertebral del fosfodiéster. La cadena lateral de K163 hace puentes de hidrógeno directamente a un grupo adyacente fosfodiéster en este mismo lado del surco principal, y las cadenas laterales de aminoácidos más adelante en la hélice α Q164 y K167 interactúan en el otro lado del surco principal (proximal a la Región 1) de modo que la hélice α puentea el surco principal. Los análisis mutacionales demuestran que F145 y la hélice α de C-terminal son realmente críticas para la unión al ARN (Ryter y Schultz, 1998).

El péptido **P2** contiene la secuencia de la región 3 presente en la proteína dsRBD completa que une a dsARN. Esta región en particular con la secuencia **TSKQVAK**, se sabe que interactúa a través de la hebra principal de la dsARN. No se incluyeron las otras dos regiones que están contenidas dentro de una secuencia muy hidrofóbica (denominada P1) que tiene poca solubilidad en agua (Ryter y Schultz, 1998). Se fusionó **P2** con un segmento peptídico **P3** (18 aminoácidos + 2 glicinas como espaciador) para obtener la secuencia del péptido **P4** (Figura 6). **P3** experimenta un cambio estructural que va desde α -hélice a hoja β formando agregados al mismo tiempo. La razón por la cual se fusionó es que **P2** enlaza a siRNA dirigiendo un cambio estructural en **P3** y además promueve el complejo de péptidos y siARN.

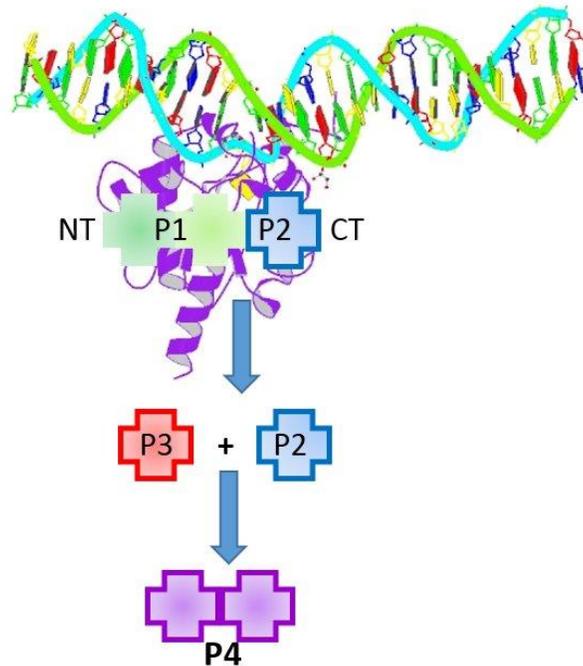


Figura 6: Para formar P4 se utilizó un segmento denominado P2 que contiene la secuencia de la región 3 presente en la proteína dsRBD completa que une a dsARN (P1 se descartó ya que se encuentra dentro de una secuencia muy hidrofóbica) (Ryter y Schultz,1998). Se toma el segmento P2, se fusionó P2 con un segmento peptídico P3 para obtener la secuencia del péptido P4.

Usando electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 7), se encontró que **P4** muestra 10 veces mayor fuerza de unión a siARN comparado con **P2**. **P3** falló en la unión a siARN. La aparente fuerza de unión de **P4** hacia siARN se encontró que es comparable a dsRBD. Estos hallazgos sugieren que la fusión del péptido **P2** a **P3** ayuda a encapsular el siARN generando una eficiente capacidad de unión comparable a la del dsRBD (Hernández-García, et al., 2019).

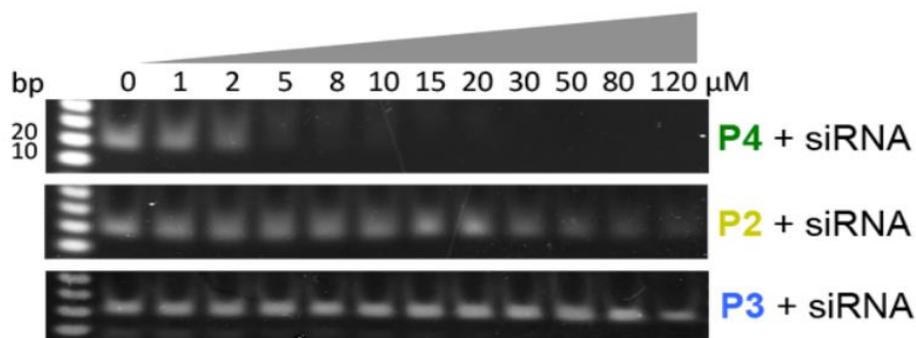


Figura 7: Electroforesis, las bandas representan al siRNA libre. (Hernández-García, et al., 2019).

P4 enlaza fuertemente hacia cualquier AN bicatenario pero muy pobre hacia cadenas sencillas de AN. Por lo que **P4** puede ser usado para el encapsulamiento de dsARN o dsADN. Una caracterización más a fondo con dicroísmo circular reveló que **P4** cambia de una estructura aleatoria α a una estructura secundaria de la hoja β tras la interacción con siARN, una transición no observada en el caso de **P2**. Esta observación apoya la hipótesis de que **P3** podría actuar posiblemente como un interruptor estructural, promoviendo el complejo **péptido-siARN**.

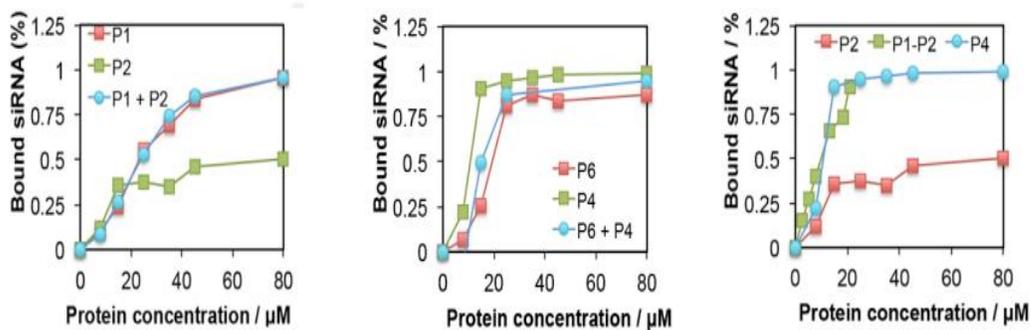


Figura 8: Unión de los diferentes péptidos con siARN. (Hernández-García, et al., 2019).

La formación de partícula supramoleculares se atribuye al cambio estructural que se produce al contacto con el AN cambiando de una bobina α a una hoja β . Tras la adición de siRNA se observó la desaparición gradualmente de la bobina α aleatoria. **P4** tiene baja densidad de carga, alta relación molar péptido-siRNA esto quiere decir que el péptido se puede unir a grandes cantidades de AN (Figura 8). Esto es una ventaja ya que no se necesita una concentración grande de P4 y es importante porque grandes potenciales de partículas para el suministro de siARN han sido asociados con citotoxicidad.

Los complejos **P4-siARN** son altamente resistentes a la degradación enzimática por RNAsa. No se observa la liberación de siARN de las partículas en soluciones de alta concentración salina. La estabilidad de las partículas de P4-siARN sugiere que las interacciones

electrostáticas no son la única fuerza motriz para el encapsulamiento de siRNA. En cuanto a la transfección neuronal, después de 24 h de incubación, el péptido P4 transfecta 74 % de células gliales y 78.5 % de neuronales extraídas de tejido primario de corteza cerebral.

Diseño de un péptido acarreador de AN y responsivo a la luz

Para el diseño de P4 responsivo a luz UV (P4-HL), se utilizó el segmento de 27 aminoácidos denominado **P2** que contiene la secuencia **TSKQVAK**. Se fusionó **P2** con **P3** para obtener el péptido **P4**.

P4 se modificó con el aminoácido nitrobencil para formar **P4-HL**

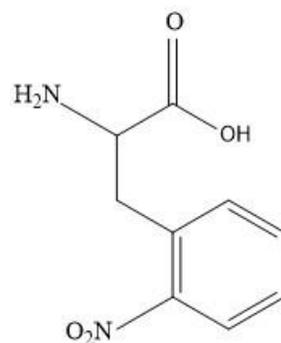


Figura 9: Aminoácido Nitrobencil, aminoácido responsivo a luz UV.

Este aminoácido es responsivo a luz UV ya que se hidroliza al ser sometido a irradiación con UV (Figura 9).

Para el diseño de P4-HL se utilizó este aminoácido NB responsivo a luz UV como si fuera un puente ya que en los extremos de NB se colocaron a P2 y P3. Quedando de la siguiente manera (Figura 10).

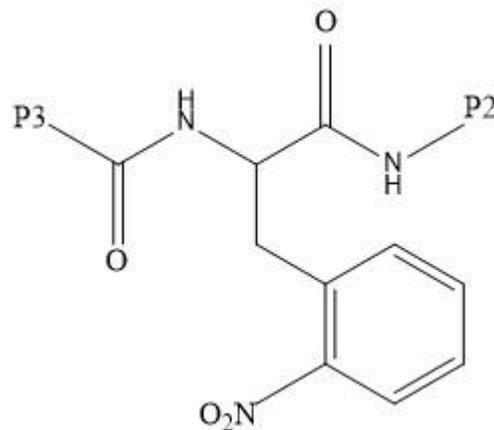


Figura 10: Péptido P4-HL, formado por P3, el aminoácido Nitrobencil, y P2.

Se escogió este tipo de aminoácido ya que es una gran ventaja que sea responsivo a luz UV porque puede “descargar” de manera muy precisa al AN en el momento y lugar que sea necesario hacerlo. El aminoácido NB al ser sometido bajo irradiación UV se hidroliza (Figura 11), dando como resultado la liberación del ácido nucleico.

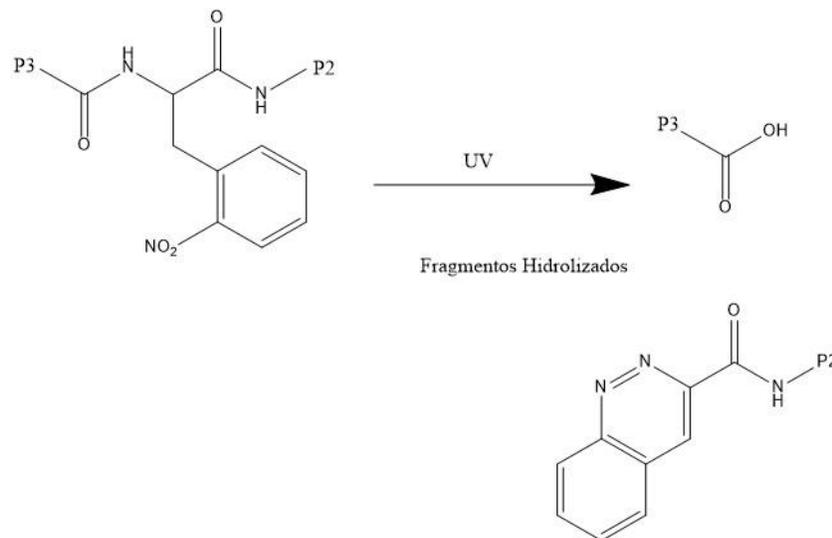


Figura 11: Hidrólisis de P4-HL cuando es irradiado con luz UV. Como resultado hay dos fragmentos uno con P3 y otro con P2.

Secuencia de P4-HL (47 aminoácidos y 5240 kDa), en negritas se muestra el aminoácido enlazador y responsivo a luz UV.

NT-SIRKLEYEIEELRLRIG**GG**TFVETGSGTSKQVAKRVAAEKLLTKFKT-CT

Secuencia P3 (19 aminoácidos y 2,231 kDa)

NT-SIRKLEYEIEELRLRIG**GG**-CT

Secuencia P2 (28 aminoácidos y 3,383 kDa)

NT-TFVETGSGTSKQVAKRVAAEKLLTKFKT-CT

Hipótesis

Debido a que el péptido P4-HL fue diseñado con: un dominio de unión a ácidos nucleicos, un péptido que ayuda al autoensamble de las partículas, y un aminoácido nitrobenzil (el cual se ha reportado que es fotosensible), P4-HL debería de unirse a los ácidos nucleicos, formar un complejo y liberarlo a través del estímulo externo que es la irradiación con luz UV.

Objetivos

- ✚ Probar que el péptido P4-HL es capaz de encapsular ADN de doble cadena y liberarlo por medio de un estímulo externo (luz UV).
- ✚ Diseñar y elaborar los experimentos necesarios para probar que P4-HL. Es responsivo a luz UV 365 nm, encapsula ADN y su liberación.
- ✚ Determinar la concentración a la cual el péptido P4-HL neutraliza totalmente la carga del ácido nucleico.
- ✚ Evaluar el efecto en la unión del ácido nucleico por parte del péptido P4-HL previamente irradiado con luz UV.
- ✚ Evaluar la liberación de ácido nucleico por parte de los complejos P4-HL-ácido nucleico al irradiar con luz UV

Metodología Experimental

Para cumplir los objetivos de la tesis, se diseñó el trabajo para realizarse en cuatro etapas:

- 1) Hidrólisis de P4-HL con luz UV
- 2) Interacción de P4-HL con ADN (25pb)
- 3) Efecto en la unión a ADN (25pb) de P4-HL pre-irradiado
- 4) Efecto en la liberación de ADN (25pb) cuando se irradian los complejos P4-HL-ADN con luz UV.

En cada etapa se estudiaron diferentes características y propiedades del péptido P4-HL. En todos los experimentos se utilizaron dos tipos de lámpara UV con longitud de onda de 365nm, la "Lámpara UV 1" que tiene una potencia **<<100W** y la "Lámpara UV 2" que tiene una potencia de **100W**. Las muestras se mantuvieron en baño de hielo para evitar evaporación por el calor generado por la lámpara y se irradió con UV en una celda de cuarzo. La electroforesis también se realizó en baño de hielo.

HIDRÓLISIS DEL PÉPTIDO P4-HL CON LUZ UV

Para identificar el comportamiento de P4-HL expuesto a luz UV, se irradió el péptido a diferentes tiempos. Se hicieron cuatro experimentos diferentes. Las tres primeras etapas se hicieron irradiando con la lámpara 1, en donde se varió la concentración de P4-HL de 125 μM a 180 μM y se modificó la longitud de onda de 365 nm a 254 nm. Se tomaron muestras en los diferentes tiempos, para la electroforesis en gel y para el MALDI-TOF.

La electroforesis se hizo en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 20 % (SDS-PAGE) por 75 minutos a 200 V.

La cuarta etapa se hizo irradiando con la lámpara 2 a P4-HL 160 μM . Las proteínas de las muestras tomadas a diferentes tiempos de irradiación se analizaron con SDS-PAGE al 20 %, por 15 min a 100 V, 30 min a 150 V y 15 min a 200 V, y se tiñó con Simply blue. (Véase apéndice I para más detalles)

INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO P4-HL CON ADN 25pb

Se observó la interacción de P4-HL con ADN de doble hebra de 25pb, mezclando el péptido a diferentes concentraciones 0, 3, 8, 10, 15, 30, y 80 (μM) y se mantuvo una concentración fija de ADN (2 μM) en 8 microtubos, dejando en reposo por una noche (15 horas aprox.) a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se hizo la electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 6% por 30 min a 100 V.

EFFECTO EN LA UNIÓN A ADN 25pb DEL PÉPTIDO P4-HL PRE-IRRADIADO CON LUZ UV

Esto se hizo para evaluar el efecto en la unión con ADN cuando se somete a irradiación a P4-HL antes de formar el complejo P4-HL-DNA. Se irradió a P4-HL a diferentes concentraciones y a una concentración fija, a diferentes tiempos, con la Lámpara 1 UV. Posteriormente se mezcló con ADN 2 μM para formar el complejo P4-HLi-ADN, dejando

reposar por una noche. Pasado este tiempo se hizo la electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 6 % por 30 min a 100 V. Otro experimento fue donde P4-HL se irradió con la Lámpara 2 UV a diferentes tiempos, posteriormente se mezcló con ADN para formar el complejo P4-HLi-ADN y se dejó reposar por una noche. A continuación se hizo la electroforesis nativa en gel de poliacrilamida 6 % y el estudio de MALDI-TOF. (Véase apéndice I para más detalles).

LIBERACIÓN DE ADN DEL COMPLEJO P4-HL-ADN AL IRRADIAR CON LUZ UV

Para probar la liberación de ADN después de que fue encapsulado (P4-HL-ADN) debido al efecto de fotólisis por la radiación UV se hizo lo siguiente. Se mezcló ADN con P4-HL para formar el complejo P4-HL-ADN. P4-HL tiene una concentración final de 80 μM y el ADN de 0.2 μM . Se dejaron reposar por una noche. Posteriormente la mezcla se irradió a diferentes tiempos con lámpara 1 UV a 365 nm y se tomaron las muestras en cada tiempo. Enseguida se separó la proteína mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida 6 % por 30 min a 100 V. El otro experimento se hizo dejando reposar una noche el complejo P4-HL-ADN y posteriormente se irradió a diferentes tiempos con la Lámpara 2 UV, se tomaron muestras en cada tiempo, para la electroforesis y el MALDI-TOF. Al finalizar la irradiación se hizo la electroforesis nativa en gel de poliacrilamida 6% a 80V 45min y 100V 10min.

Resultados y Discusión

Composición de P4-HL

El péptido P4-HL fue sintetizado previamente (Hernández-García, et al., 2019), se utilizó un segmento de 27 aminoácidos denominado P2, este segmento se tomó de un dominio de unión de proteínas a dsARN presente en la especie *Xenopus laevis*. P2 se fusionó con el C-terminal del aminoácido nitrobenzil (NB), mientras que P3 se fusionó al N-

terminal del aminoácido NB, P3 es el péptido que ayuda al autoensamble además de que provoca un cambio estructural de α -hélice a hoja β . (Figura 12).

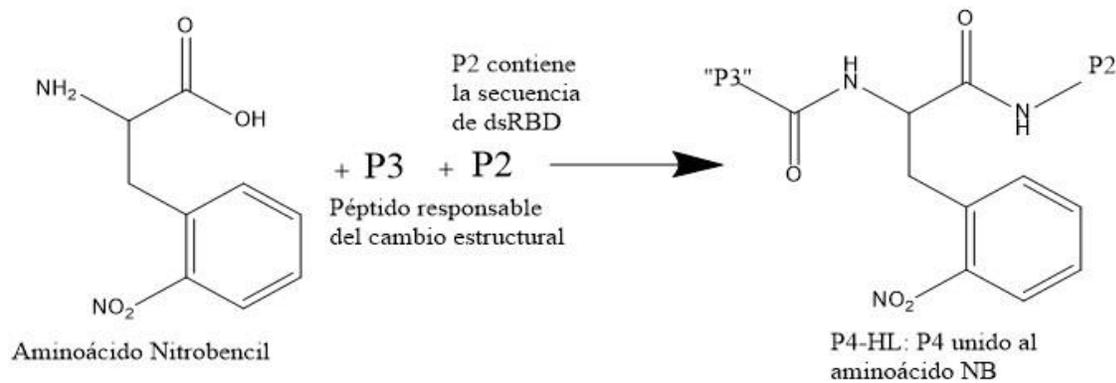


Figura 12: Síntesis de P4-HL, en donde se observa como el aminoácido NB sirve como un puente de unión entre P3 y P2.

A continuación se describen datos importantes de los diferentes péptidos de este estudio:

Peso teórico de P4-HL: $P4 + NB - 2H_2O = 5240.09 + 210.189 - 36.03 = 5414.28$ Da

Secuencia de P4 (47 aminoácidos, peso: 5240.09 Da):
SYRKLEYEIEELRLRIGGGTFVETGSGTSKQVAKRVAAEKLLTKFKT

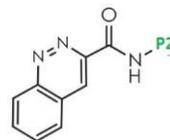


Peso de NB: $9C + 4O + 2N + 10H = 210.189$ Da

Peso teórico P2: 3026.53, 28 aminoácidos.

Secuencia de P2:

TFVETGSGTSKQVAKRVAAEKLLTKFKT.



El peso esperado para el pico de P2: $3026.53 + 157.152 = 3183.682$ Da

Peso teórico de P3: 2231.58 Da, 19 aminoácidos.

Secuencia de P3: SYRKLEYEIEELRLRIGGG

Los pesos esperados para los picos que corresponden a P4-HL, P2 y P3 son: **5414.28** Da, **3183.682** Da, y **2231.58** Da respectivamente.

HIDRÓLISIS DEL PÉPTIDO P4-HL CON LUZ UV

Se evaluó la hidrólisis de P4-HL con luz UV ya que esto no se había hecho anteriormente. El péptido se irradió a diferentes tiempos. A continuación se hace la separación de la proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (Figura 13) para evaluar el comportamiento de P4-HL mientras va aumentando el tiempo de irradiación UV.

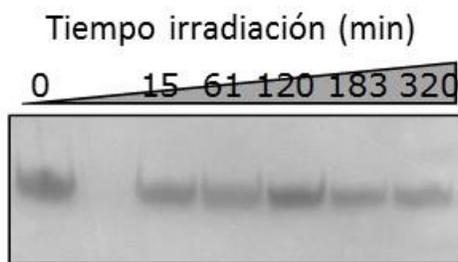


Figura 13: Electroforesis SDS-PAGE al 20% de P4-HL 125 μ M irradiado a diferentes tiempos. En donde se observa que la banda oscura se va haciendo más pequeña al aumentar el tiempo de irradiación. La franja oscura corresponde a P4-HL.

Al irradiar con luz UV a P4-HL lo que se busca es evaluar si P4-HL se hidroliza (a causa de la fotólisis) y que tanto se hidroliza el péptido al aumentar el tiempo de irradiación con luz UV. El tiempo 0 corresponde al péptido sin hidrolizar a una concentración de 125 μ M. Se puede observar como a medida que va aumentando el tiempo de irradiación va disminuyendo poco a poco la banda correspondiente al péptido P4-HL.

Tomando la imagen de la electroforesis, se hizo un análisis de la intensidad de las bandas en el gel con el programa *ImageJ*. Se consideró que la muestra a tiempo 0 es la que corresponde al 100% de P4-HL sin irradiar e hidrolizar, de esta forma se puede hacer una relación entre la intensidad de las demás bandas de una forma semicuantitativa (Figura 14).

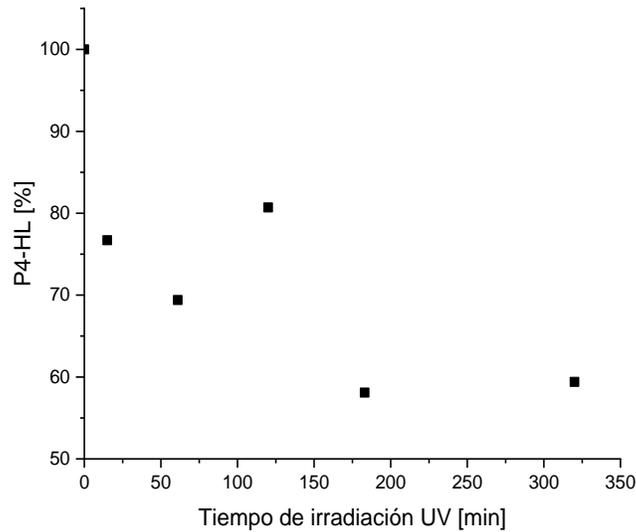


Figura 14: Relación del Tiempo de irradiación UV vs %P4-HL intensidad banda.

Se puede observar como en los primeros tiempos de irradiación la hidrólisis es menor que en los tiempos posteriores (Figura 14), a partir del minuto 183 de irradiación, P4-HL sin hidrolizar es alrededor de 58.06 % y se mantiene casi constante hasta los 320 min.

Tiempo de irradiación UV en minutos

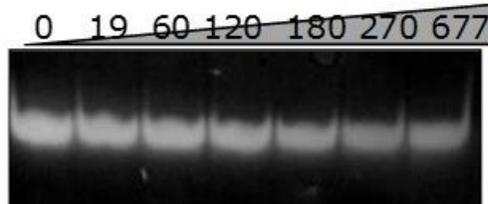


Figura 15: Electroforesis SDS-PAGE, poliacrilamida 20%. La banda blanca que corresponde a P4-HL, va disminuyendo de intensidad de izquierda a derecha al aumentar el tiempo de irradiación UV.

Aumentando la concentración de P4-HL de 125 a 180 μ M y con un tiempo máximo de 677 minutos (Figura 15) se puede observar como la banda se va haciendo poco a poco más tenue mientras va aumentando el tiempo de irradiación UV. Las bandas corresponden al péptido P4-HL no hidrolizado.

Análisis del gel con el programa ImageJ (Figura 16).

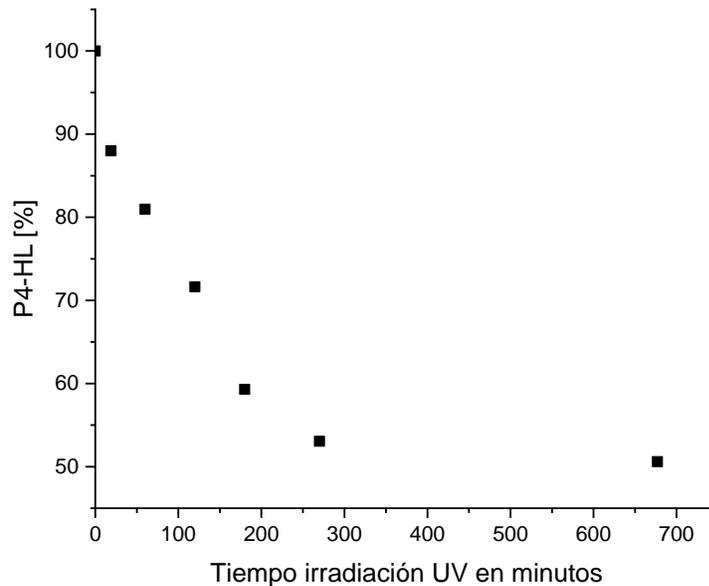


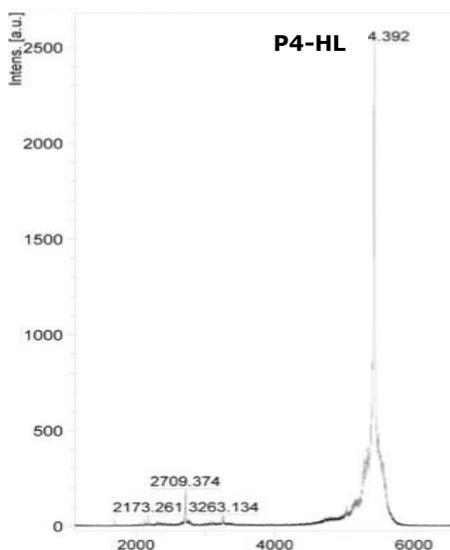
Figura 16: Relación de P4-HL irradiado con UV a diferentes tiempos. Se puede observar un decaimiento en la concentración de P4-HL. Llegando a los 50.59% de la concentración original con 677 minutos de irradiación UV con la lámpara 1.

Podemos comprobar que al aumentar la concentración de P4-HL, en el tiempo de 180 min llega a 59.30 % de P4-HL sin hidrolizar (Figura 16), manteniéndose casi constante hasta los 677 minutos llegando a 50.59 % de P4-HL sin hidrolizar.

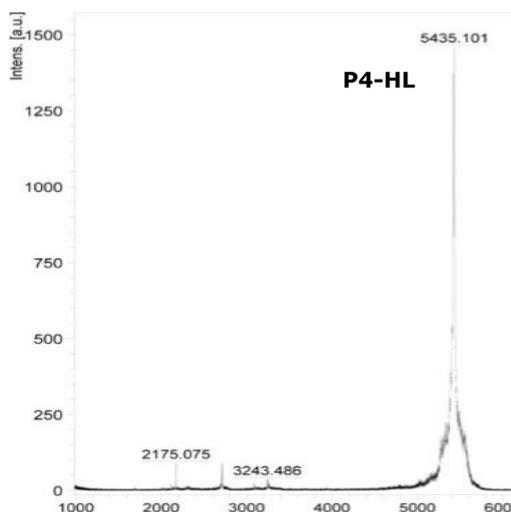
En ambos casos, a una concentración de 125 μM y 180 μM , a los 180 min de irradiación llega a un valor de 58 % de P4-HL sin hidrolizar.

Otro experimento fue donde se trabajó con una longitud de onda de 254 nm, esto se hizo con el fin de ver en cual longitud hay una mayor hidrólisis de P4-HL, las muestras se analizaron por MALDI-TOF (Figura 17).

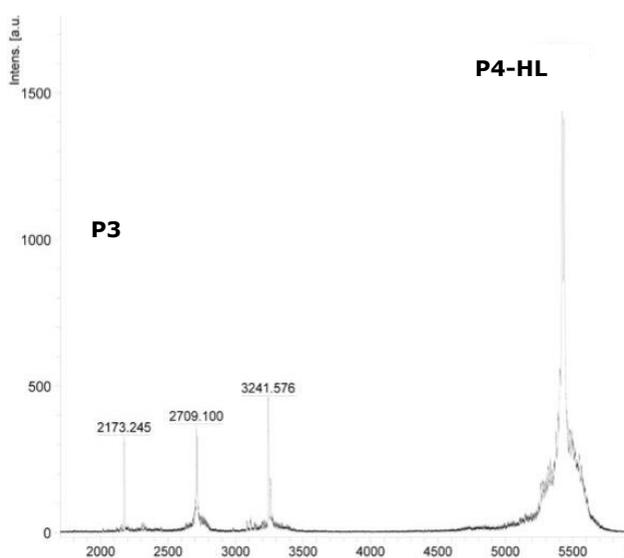
0 min irradiación



20 min irradiación



234 min irradiación



676 min

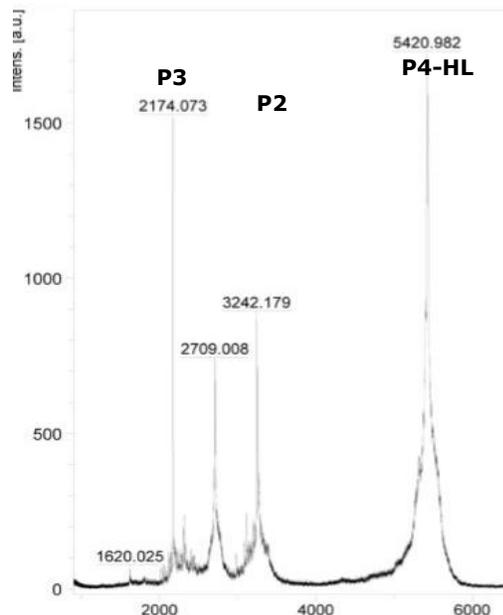
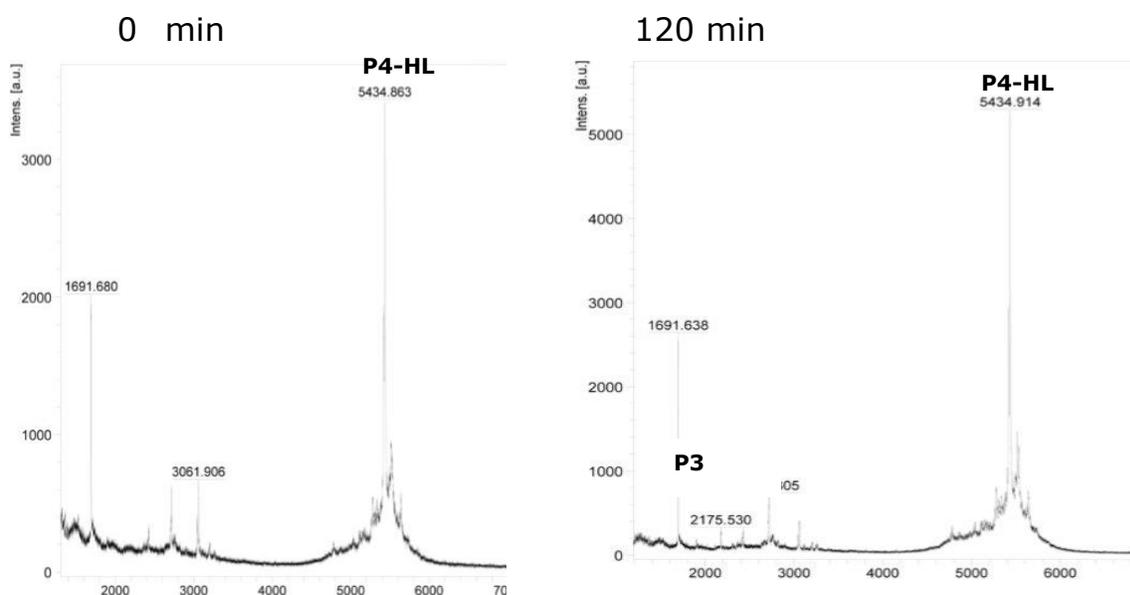


Figura 17: Análisis por MALDI-TOF de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con lámpara 1. A 0 minutos de irradiación, solo se encuentra el pico correspondiente a P4-HL b) 20 minutos de irradiación, c) 234 minutos de irradiación, aparecen los picos correspondientes a P3 y P2 y d) 676 minutos de irradiación, los picos P3 y P2 aumentaron, sin embargo al incrementar el tiempo de irradiación UV el pico correspondiente a P4-HL sigue siendo el mayor.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el análisis MALDI-TOF a los 20 minutos de irradiación aún no se alcanzan a notar de manera clara los picos correspondientes a P3 y P2, prácticamente solo se encuentra el pico de P4-HL. En el tiempo de 234 minutos de irradiación empiezan aparecer los picos correspondientes a P2 y P3. A los 676 minutos de irradiación, los picos correspondientes a P3 y P2 aumentan considerablemente. Sin embargo el pico correspondiente a P4-HL sigue siendo el pico de mayor tamaño. Todo esto indica que al irradiarse P4-HL con luz UV a 264 nm se divide en sus dos componentes P3 y P2 hasta en un 50%.

Análisis por MALDI-TOF de los productos de P4-HL al ser irradiado con luz UV a 365 nm por diferentes tiempos. La concentración de P4-HL usada fue de 125 μM (Figura 18).



480 min

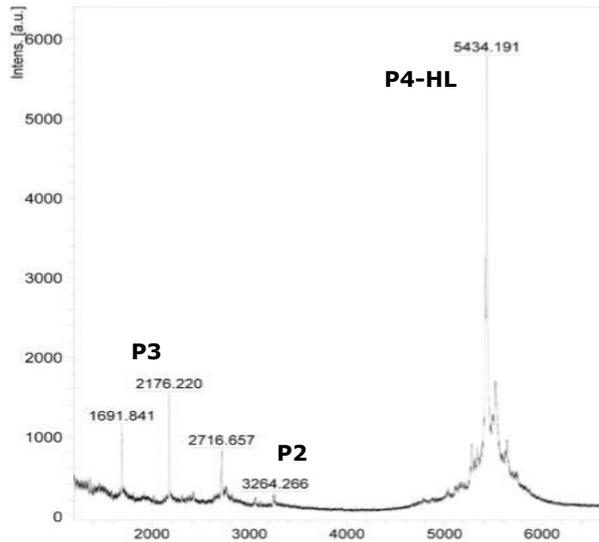
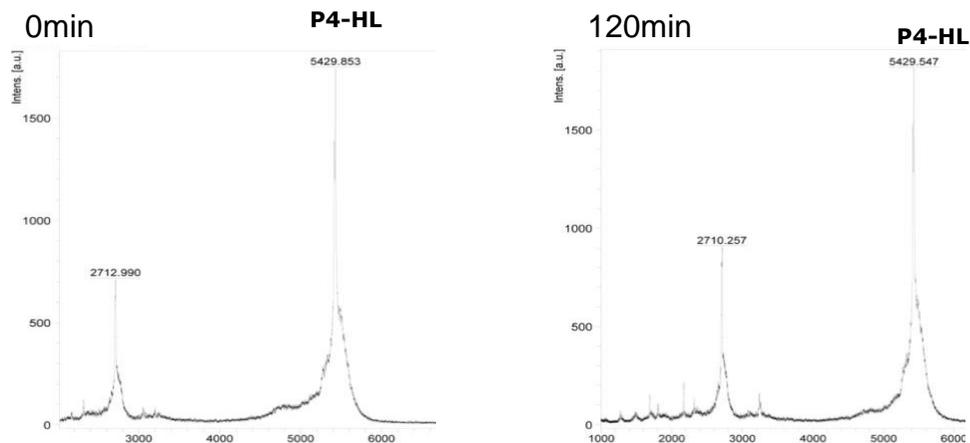


Figura 18: Análisis por MALDI-TOF de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con lámpara 1 UV. A los 0 minutos de irradiación solo se encuentra P4-HL. Se observa que aparece P3 a los 120 minutos de irradiación.

Del análisis del efecto de la irradiación de P4-HL irradiado por diferentes tiempos mediante MALDI-TOF, se observó como a los 120 minutos de irradiación empieza aparecer el primer pico P3 de los componentes derivados de la hidrólisis de P4-HL. A los 480 minutos de irradiación se observa el pico correspondiente a P2. Sin embargo el pico correspondiente a P4-HL aún sigue muy presente siendo el de mayor tamaño, esto indica que la hidrólisis de P4-HL detectada por MALDI-TOF es baja.

Se repitió el MALDI-TOF de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con una longitud de 365 nm. La concentración de P4-HL es de 125 μM (Figura 19).



450min

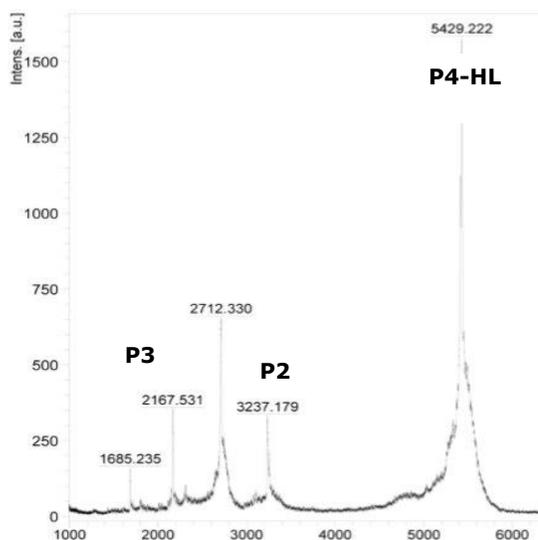


Figura 19: Resultados por MALDI-TOF de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con lámpara 1 UV. A los 0 minutos de irradiación, se encuentra el pico correspondiente a P4-HL. Aparecen los picos correspondientes a P3 y P2, a los 450 minutos de irradiación.

En este último experimento los picos correspondientes a P3 y P2 aparecieron después de los 120 minutos de irradiación. Sin embargo a los 450 minutos de irradiación el pico más grande sigue siendo el de P4-HL, mientras que los picos correspondientes a P3 y P2 son pequeños, esto es debido a que la hidrólisis de P4-HL es baja.

Debido a que los productos de hidrólisis parecen ser bajos usando una potencia menor a 100 W se repitieron los ensayos utilizando la lámpara 2 la cual tiene mayor potencia (**100W / 365 nm**).

Tiempo de irradiación UV en minutos

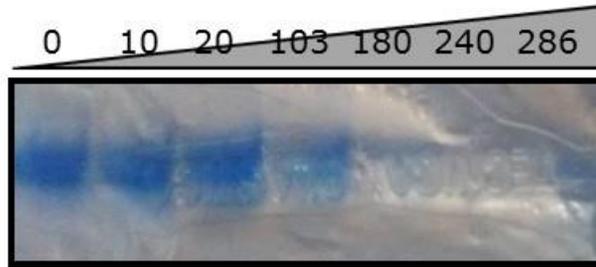


Figura 20: Electroforesis SDS-PAGE de P4-HL irradiado a diferentes tiempos.

Tiempo de irradiación UV en minutos

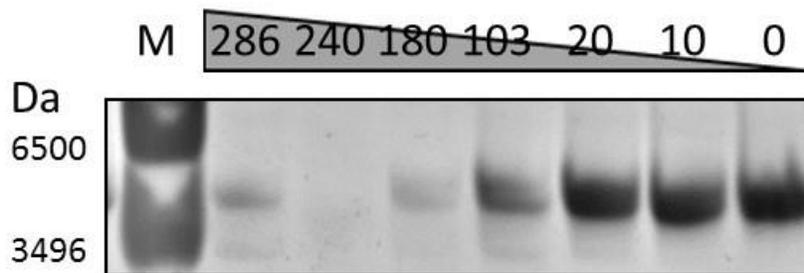


Figura 21: Electroforesis SDS-PAGE de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con lámpara 2 (100 W) con longitud de onda de 365 nm. Las bandas oscuras representan a P4-HL. Esta va disminuyendo de derecha a izquierda, a los 180 minutos de irradiación casi ha desaparecido. La banda oscura en el tiempo 0 de irradiación, representa a P4-HL 160 μ M. En el extremo izquierdo se encuentra el marcador de peso molecular donde la banda inferior tiene un peso de 3496 Da y la banda superior de 6500 Da.

En este experimento se puede observar como las bandas negras se van haciendo cada vez menos intensas mientras va aumentando el tiempo de irradiación con luz UV. Al llegar al minuto 180 de irradiación se puede ver como la banda oscura casi ha desaparecido (Figura 20 y 21). La potencia de la lámpara 2, que es de 100W y mucho mayor a la lámpara 1, afecta drásticamente a la hidrólisis de P4-HL 160 μ M, ya que a un tiempo de 180 minutos de irradiación la banda que corresponde a P4-HL casi desapareció, esto quiere decir que con este tiempo de irradiación P4-HL está casi completamente hidrolizado debido a la

fotólisis provocada por la lámpara 2. El tiempo 0 corresponde a P4-HL sin hidrolizar.

Se hizo el análisis de las bandas con ImageJ para tener valores más exactos y poder graficar el tiempo de irradiación vs el porcentaje de P4-HL sin hidrolizar (Figura 22).

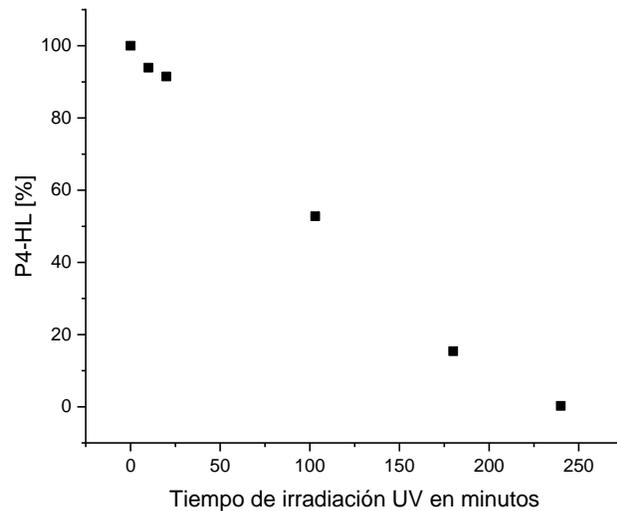


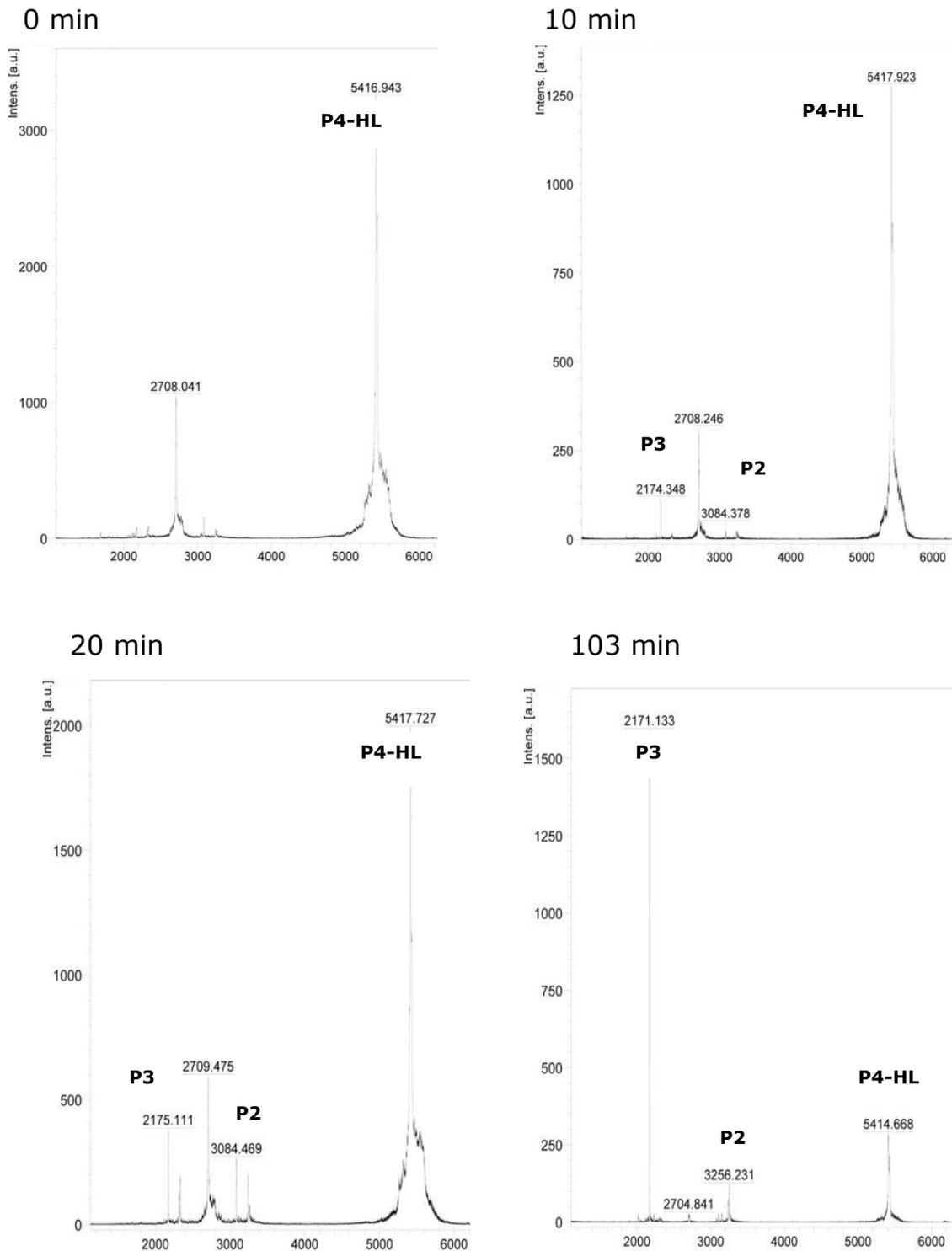
Figura 22: Gráfica que muestra la relación del Tiempo de irradiación UV vs %P4-HL. La concentración de P4-HL es inversamente proporcional al tiempo de irradiación UV con la lámpara 2. Se puede notar una relación lineal del % P4-HL con el tiempo de irradiación UV.

Haciendo una regresión lineal tenemos la siguiente ecuación:

$$Y = -0.4303x + 98.633 \quad R^2 = 0.9931.$$

La variable Y corresponde al porcentaje de P4-HL sin hidrolizar, mientras X a los minutos de irradiación UV. A los 240 minutos de irradiación con la lámpara 2 UV de 100 W a 365 nm, la hidrólisis de P4-HL es prácticamente completa. Este resultado contrasta drásticamente con el obtenido con la lámpara 1, de menor potencia, ya que a este tiempo de 240 minutos de irradiación el porcentaje de P4-HL sin hidrolizar es de 53% aproximadamente.

Análisis por MALDI-TOF de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con lámpara 2 UV (100W) (Figura 23).



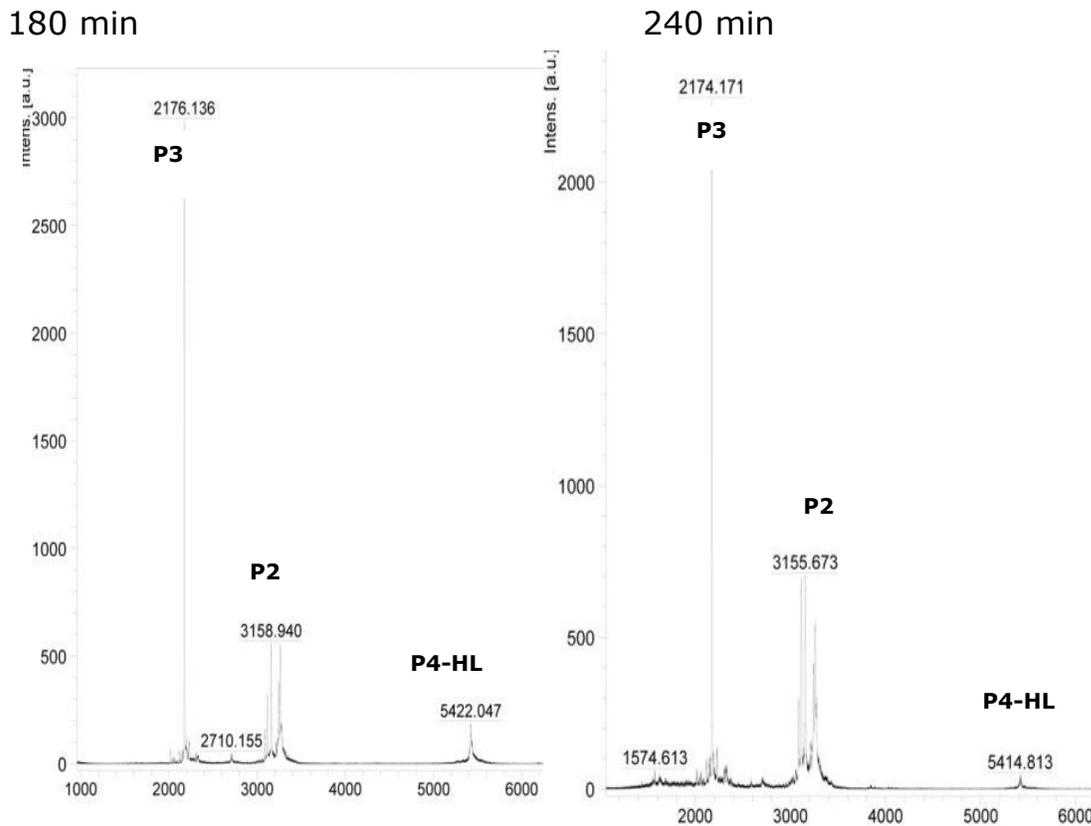


Figura 23: Resultados de MALDI-TOF de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con una lámpara de 100W de potencia. Al minuto 0, solo se encuentra presente el pico correspondiente a P4-HL, a los 10 minutos de irradiación, solo aparecen los picos P3 y P2. A los 103 minutos P3 es el pico de mayor tamaño reduciéndose considerablemente el pico de P4-HL. Finalizando a los 240 minutos de irradiación, P3 es el pico de mayor tamaño, y el pico de P4-HL casi ha desaparecido.

Con los resultados obtenidos en el MALDI-TOF podemos observar como a partir de los 10 minutos de irradiación empiezan aparecer los picos correspondientes a P3 y P2, esto quiere decir que desde los 10 minutos de irradiación con lámpara 2 P4-HL se empieza a hidrolizar. A los 103 minutos de irradiación el pico correspondiente a P3 es el mayor de los 3 picos, y P4 disminuye drásticamente, esto es debido a que a los 103 minutos de irradiación UV, más del 50% de P4-HL esta hidrolizado,

al hidrolizarse se divide en sus componentes P3 y P2. A los 180 minutos de irradiación el pico correspondiente a P4-HL es muy pequeño, esto quiere decir que P4-HL está casi hidrolizado por completo. P3 es el pico más alto, seguido de P2. A un tiempo de 240 minutos de irradiación P4-HL está prácticamente hidrolizado (0.27% de P4-HL sin hidrolizar). P3 es el pico más alto, P2 aumento de 180 minutos a 240 minutos (Figura 23).

En conclusión para esta sección: P4-HL se sometió bajo irradiación con luz UV para comprobar que el péptido fuera responsivo a este estímulo. Además de medir que tanto se hidroliza mientras va aumentando el tiempo de irradiación.

El péptido P4-HL si es responsivo a luz UV y dependiendo de la potencia de la lámpara, la hidrólisis de P4-HL puede ser mucho mayor. P4-HL a los 103 minutos de irradiación se hidroliza alrededor del 50%, y a un tiempo de 240 minutos P4-HL es hidrolizado por completo con una lámpara de 100W de potencia.

INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO CON ADN

Para observar el poder de encapsulamiento de P4-HL hacia AN, a diferentes concentraciones de P4-HL se mezcló con AN, dejando reposar por una noche. Después de este tiempo se hizo una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida.

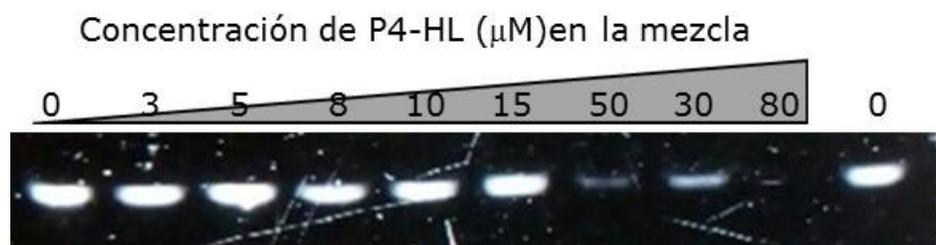


Figura 24: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6 % de P4-HL a diferentes concentraciones mezclado con una concentración fija de ADN para formar el complejo P4-HL-ADN. La franja blanca representa el ADN que se encuentra libre.

En la imagen del gel de electroforesis (Figura 24) podemos ver como la franja blanca va desapareciendo. A partir de la concentración de $8 \mu\text{M}$ se puede ver que reduce su tamaño por lo que se empieza a notar el encapsulamiento, en $30 \mu\text{M}$ la franja se redujo un 70%, en $50 \mu\text{M}$ casi ha desaparecido y a $80 \mu\text{M}$ ya no se puede ver la franja blanca. La franja blanca corresponde al ADN libre (no encapsulado). Las franjas de los extremos corresponden al ADN 100 % libre ya que pertenece a una solución de ADN sin P4-HL. Mientras va aumentando la concentración de P4-HL en la solución, va desapareciendo la franja que corresponde al ADN libre. El tamaño y la intensidad de las bandas representan cuanto ADN se encuentra libre. Cuando la concentración de P4-HL es 0, el ADN se encuentra 100 % libre con una concentración de $0.2 \mu\text{M}$. Alrededor de los $30 \mu\text{M}$ el ADN ha desaparecido por lo que se piensa que se encuentra encapsulado en su mayoría. Cuando P4-HL alcanza una concentración de $80 \mu\text{M}$ el ADN es encapsulado por completo, a esta concentración la banda que corresponde al ADN libre ya no se observa, comprobando que el ADN se encuentra encapsulado totalmente.

Analizando la intensidad de las bandas con ImageJ (Figura 25).

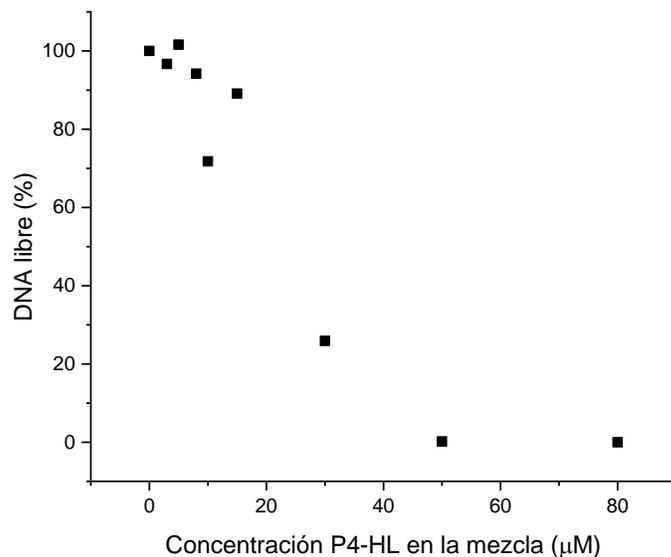


Figura 25: Gráfica con diferentes concentraciones de P4-HL (μM) vs ADN libre (%). Cuando P4-HL alcanza una concentración de $30 \mu\text{M}$, hay un decaimiento significativo en el ADN libre.

Con este experimento podemos comprobar que P4-HL encapsula ADN 25 pb y a una concentración de $30 \mu\text{M}$ es capaz de encapsular el 74.101 % de ADN $0.2 \mu\text{M}$. A una concentración de $50 \mu\text{M}$ de P4-HL, el ADN está encapsulado (99.81 %) (Figura 25). Cuando P4-HL alcanza una concentración de $80 \mu\text{M}$ este ha encapsulado por completo al ADN, esto es una relación molar de 1:0.0025. En resumen: P4-HL es capaz de encapsular ADN 25 pb.

EFFECTO EN LA UNIÓN CON ADN DEL PÉPTIDO P4-HL PREVIAMENTE IRRADIADO CON LUZ UV

P4-HL se irradió por un tiempo de **30 minutos** con la lámpara 1 UV. Posteriormente fue mezclado a diferentes concentraciones con una concentración fija de ADN para formar el complejo P4-HL-ADN.

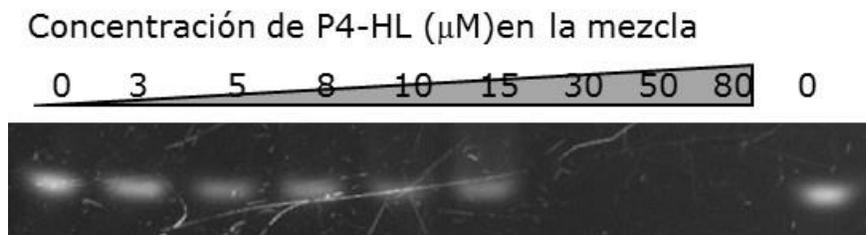


Figura 26: Electroforesis en gel poliacrilamida 6% de P4-HL irradiado (P4-HLi) por 30 minutos antes de formar el complejo P4-HL-ADN. P4-HLi se mezcló a diferentes concentraciones con una concentración fija de ADN.

En la imagen del gel (Figura 26) se puede observar como la banda blanca va disminuyendo conforme va aumentando la concentración de P4-HL previamente irradiado (P4-HLi). A partir de los 30 μM la banda ya no se observa. La banda blanca corresponde al ADN que se encuentra libre. En los extremos, la banda blanca corresponde al ADN 100% libre. Cuando P4-HLi tiene una concentración de 5 μM puede encapsular el 50% de ADN, a los 30 μM ya ha encapsulado todo el ADN que se encuentra en la mezcla, esto tiene una relación molar de 1:0.0067.

Al ser irradiado por **30 minutos** con luz UV a 365nm, P4-HL a una concentración de 30 μM , puede encapsular todo el ADN agregado. Cuando P4-HL tiene una concentración de 10 μM , este puede encapsular el 70% de ADN. Se pudo observar que la banda (ADN) disminuyó desde que P4-HL tiene una concentración de 3 μM . La intensidad de las bandas del gel fue analizada con el programa ImageJ (Figura 27).

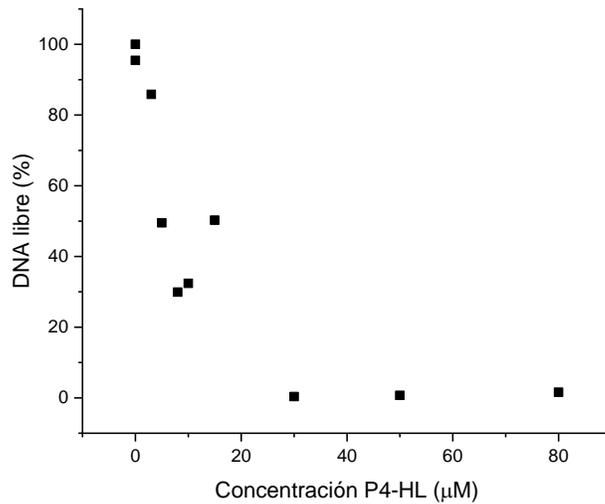


Figura 27: Gráfica de P4-HL a diferentes concentraciones irradiado por 30 minutos vs ADN libre. Cuando P4-HL_i tiene una concentración de 30 µM ha encapsulado el ADN por completo.

A medida de que va aumentando la concentración del péptido P4-HL_i va disminuyendo la cantidad de ADN libre (Figura 27), alrededor de los **30 µM** de P4-HL_i el ADN es completamente encapsulado, formando el complejo con todo el ADN 0.2 µM. Y una relación molar de 1:0.0067. Esto también quiere decir que la hidrólisis de P4-HL con este tiempo de irradiación y tipo de lámpara es poca, tal como se observó anteriormente cuando se usó una lámpara con baja intensidad.

Electroforesis de P4-HL previamente irradiado por **60 minutos** con la lámpara 1 UV a 365 nm y mezclado con ADN para formar el complejo.

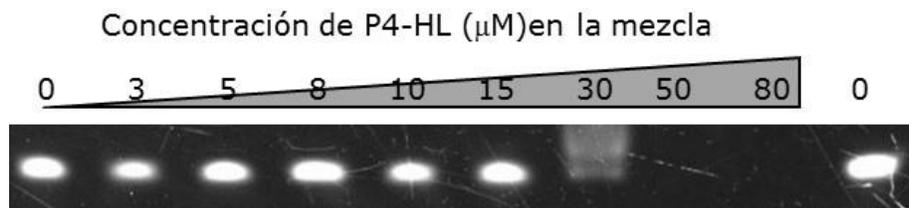


Figura 28: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6 % de P4-HL_i por 60 minutos y mezclado con ADN para formar el complejo P4-HL_i -ADN. Cuando P4-HL_i tiene una concentración de 50 µM ha encapsulado el ADN por completo.

Se puede observar en la imagen del gel de electroforesis (Figura 28) como la banda blanca disminuye un poco para mantenerse casi constante hasta la concentración de 30 μM en donde la banda disminuye un 80%, a partir de los 50 μM la banda blanca ya no se observa. Cuando el péptido P4-HL es previamente irradiado por **60 minutos**, a una concentración de **50 μM** es capaz de encapsular todo el ADN agregado, esto es una relación molar de 1:0.004. A una concentración de alrededor de 25 μM encapsula el 50%.

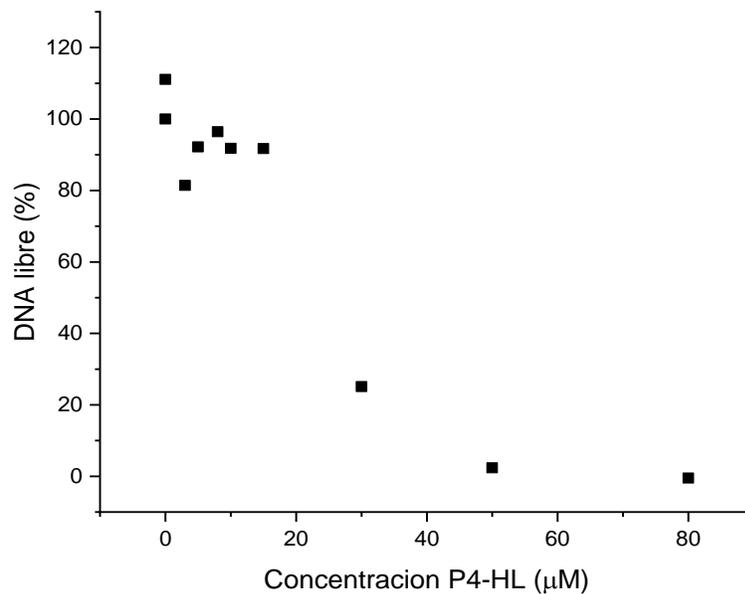


Figura 29: Relación de la Concentración de P4-HL_i vs ADN libre.

El péptido al ser previamente irradiado por **60 minutos**, necesita mayor concentración para encapsular al ADN. Para encapsular el 100 % de ADN se necesita una concentración de alrededor de **50 μM** esto es una relación molar de 1:0.004. Y para encapsular el 50 % de ADN alrededor de 25 μM (Figura 29). Cuando se irradia por 60 minutos a P4-HL, se provocó una hidrólisis de P4-HL, al estar hidrolizado no puede encapsular la misma cantidad de ADN en comparación con P4-HL sin irradiar y se necesitó mayor concentración para encapsular al 100 % de ADN.

P4-HL es previamente irradiado con lámpara 1 UV a 365 nm por **90 minutos** y mezclado con ADN, en este caso ya no fue capaz de encapsular el 100 % de ADN.

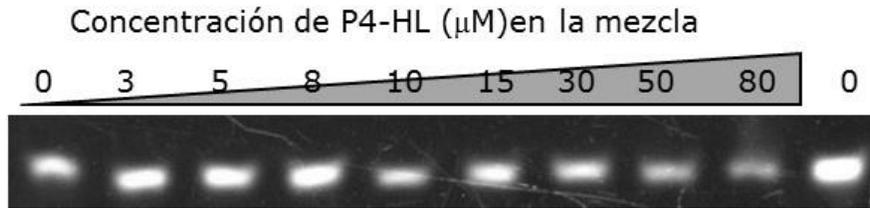


Figura 30: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6%. P4-HL_i irradiado por 90 minutos para formar el complejo P4-HL_i-ADN. Con este tiempo de irradiación la franja blanca ya no desaparece.

Se puede observar en la imagen del gel (Figura 30) como las bandas se mantienen constantes hasta la concentración de 10 μM en donde disminuye de tamaño y de intensidad hasta 50 μM donde vuelve a disminuir un poco más la banda. En este caso P4-HL ya no alcanza a encapsular todo el ADN agregado. Las bandas corresponden al ADN libre, este es el ADN que P4-HL no pudo encapsular después de ser irradiado por 90 minutos. La intensidad de las bandas del gel fue analizada con ImageJ (Figura 31).

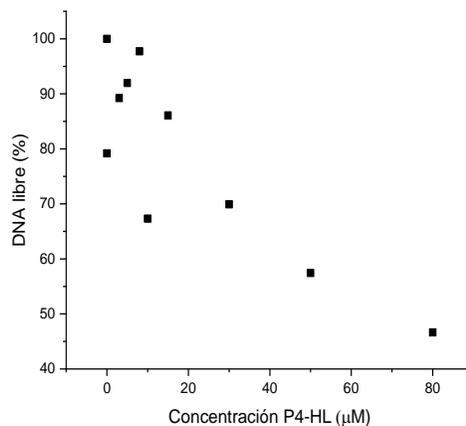


Figura 31: Relación de las diferentes concentraciones de P4-HL vs ADN libre.

Al irradiar a P4-HL por 90 minutos, la hidrólisis de P4-HL fue mayor y su rendimiento para encapsular AN disminuyó drásticamente. Ya que con una concentración de 80 μM , P4-HL_i ya no es capaz de

encapsular todo el ADN encapsulando el 53.36 % de ADN (Figura 31). Con este tiempo de irradiación P4-HL se encuentra 50 % hidrolizado. Por este motivo no puede encapsular el ADN en su totalidad.

Cuando P4-HL es irradiado por **127 minutos** con la lámpara 1 UV a 365 nm, P4-HL_i ya no es capaz de formar el complejo P4-HL-ADN.

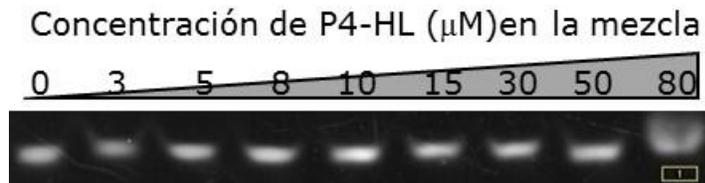


Figura 32: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6 % de P4-HL irradiado por 127 min y mezclado con DNA para formar el complejo P4-HL_i-ADN. La franja blanca se mantiene constante en todos los tiempos, con la misma intensidad y tamaño.

Al irradiar a P4-HL por **127 minutos**, se puede ver claramente en la imagen del gel (Figura 32) como la banda blanca se mantiene prácticamente constante hasta llegar a la concentración de 80 μM , a esta concentración P4-HL_i solo puede encapsular alrededor del 52.3 % de ADN. Esto es debido a la hidrólisis de P4-HL que fue generada por la exposición a luz UV por 127 minutos. La intensidad de las bandas fueron evaluadas con el programa ImageJ, los resultados son los siguientes (Figura 33).

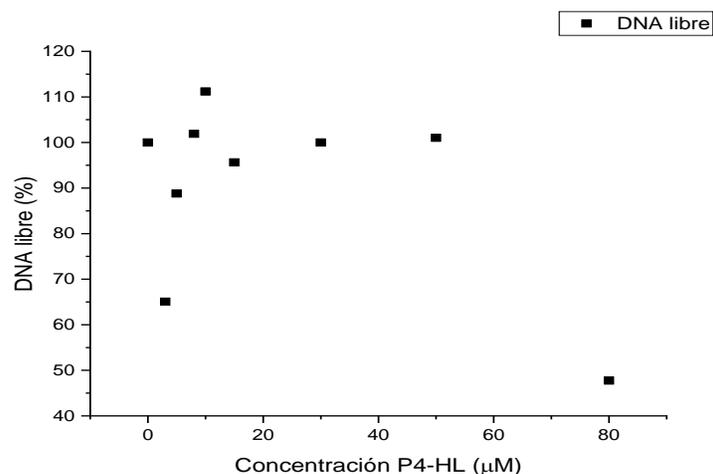


Figura 33: Relación de la Concentración de P4-HL_i vs ADN libre.

El péptido P4-HL al ser irradiado por 127 minutos ya no es capaz de encapsular ADN, dejando el 47.75 % de ADN libre con una concentración de P4-HL 80 μM (Figura 33). Irradiando a este tiempo, P4-HL se encuentra alrededor del 50% hidrolizado, por este motivo P4-HL ya no puede encapsular al ADN agregado.

En el siguiente grafico se muestra cómo es afectado el poder encapsulamiento al irradiar previamente a P4-HL con la lámpara 1.

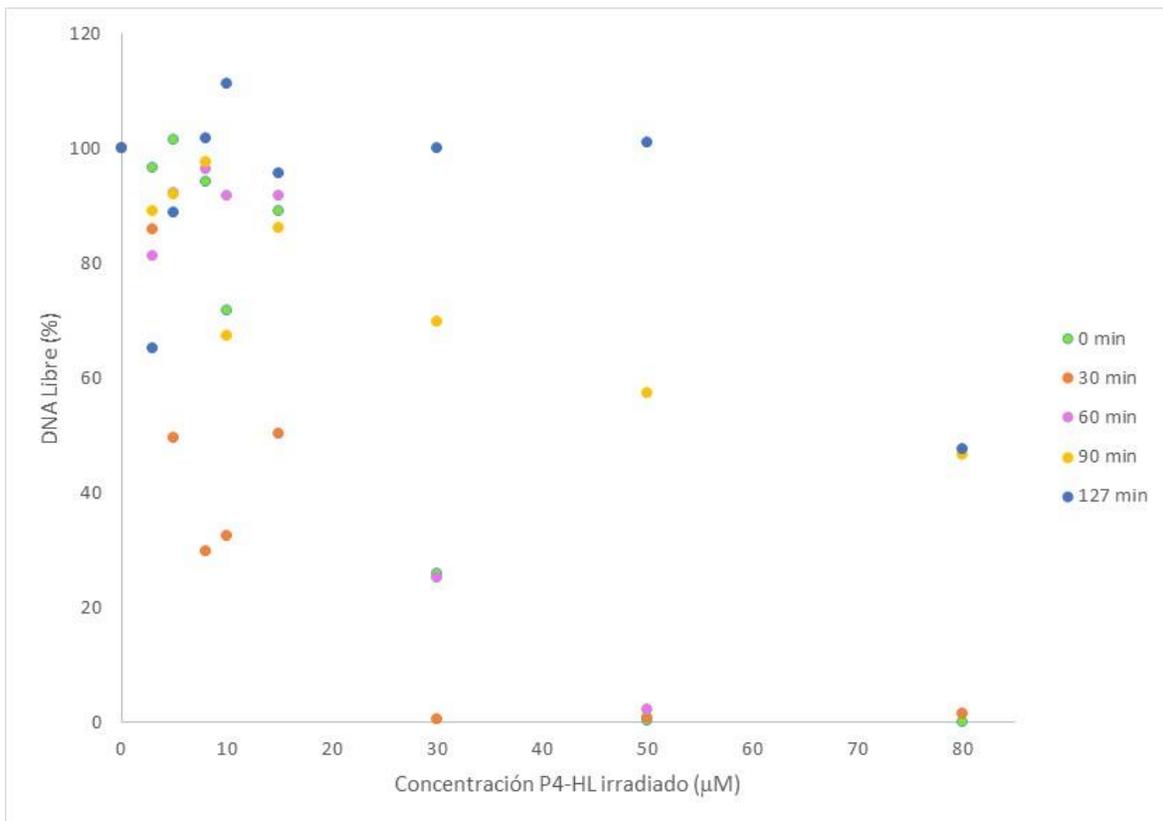


Figura 34: Gráfica de la concentración de P4-HL irradiado a diferentes tiempos con la lámpara 1 y posteriormente mezclado a diferentes concentraciones con una concentración fija de ADN para formar el complejo P4-HLi-ADN.

Cuando P4-HL es irradiado por 30 minutos o menos, encapsula todo el ADN a una concentración de **30 μM** , por 60 minutos a una de **50 μM** , a partir de los 90 minutos de irradiación ya no puede encapsular todo el ADN en las concentraciones evaluadas de péptido, ya que a los

80 μM de P4-HL deja el 46.64 % de ADN libre (Figura 34). Cuando P4-HL es irradiado por 120 minutos no puede encapsular al ADN, y solo se observa un ligero encapsulamiento hasta que se alcanzó una concentración de 80 μM de P4-HL dejando el 47.7 % de ADN. Esto quiere decir que a partir de los 90 minutos de irradiación, la hidrólisis de P4-HL va siendo considerable, esto se puede comprobar ya que va dejando mayor cantidad de ADN libre. A una concentración de 80 μM hay alrededor de 47 % de ADN libre por lo que la hidrólisis de P4-HL es del 50 % aproximadamente.

La gráfica de la figura 35 representa la cantidad necesaria que se tiene que utilizar de péptido P4-HL y el tiempo necesario de irradiación con lámpara 1 UV a 365 nm para encapsular el 50 % de ADN.

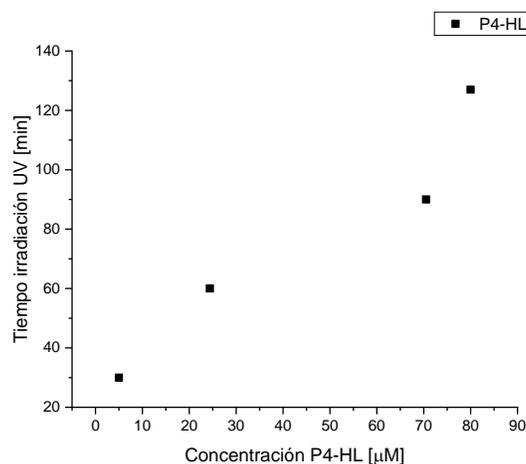


Figura 35: Concentración de P4-HL vs tiempo de irradiación UV necesario para encapsular el 50% de ADN.

En el siguiente experimento se dejó constante la concentración del péptido (80 μM concentración final de P4-HL) y se varió el tiempo de irradiación antes de mezclarse con el ADN. Podemos observar como en el gel de electroforesis (Figura 36) va apareciendo una banda blanca haciéndose cada vez más intensa, teniendo una intensidad mayor a los 90 minutos de irradiación. La banda blanca corresponde al ADN que se encuentra libre. Al aumentar el tiempo de irradiación, P4-HL ya no

puede encapsular por completo el ADN, esto se debe a que una parte de P4-HL se encuentra hidrolizado debido al efecto de fotólisis provocado por luz UV. A mayor tiempo de irradiación con luz UV la hidrólisis de P4-HL es mayor provocando menor encapsulamiento de ADN.

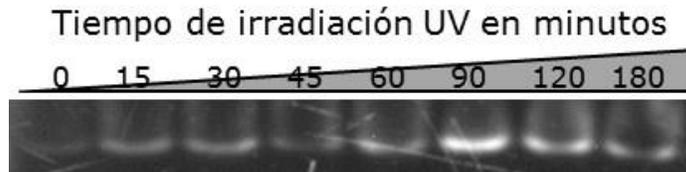


Figura 36: Electroforesis de P4-HL_i (80 μ M) en gel de poliacrilamida 6%. P4-HL se irradió a diferentes tiempos con la lámpara 1 UV. Las franjas blancas representan el ADN libre que no pudo ser encapsulado.

Se hizo el análisis de las bandas del gel con el programa ImageJ (Figura 37).

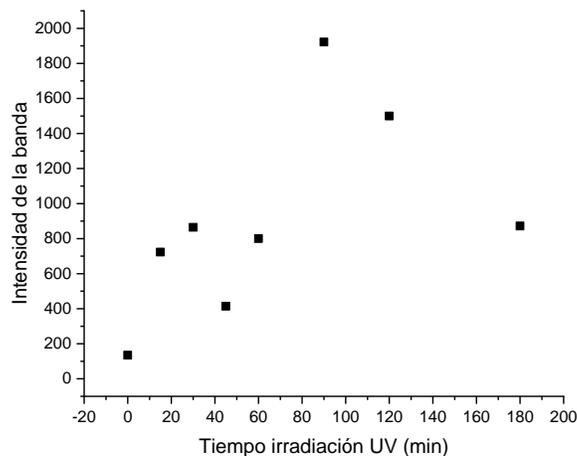


Figura 37: Relación de tiempo de irradiación UV vs Intensidad de la banda.

IRRADIANDO CON LÁMPARA 2 UV

Irradiando previamente a P4-HL con la lámpara 2, se puede notar que a partir del minuto 25 de irradiación empieza aparecer una línea muy tenue (Figura 38), en el minuto 45 se alcanza a notar mucho más la banda blanca, a los 90 minutos de irradiación, la banda blanca es casi del mismo tamaño que el control (ADN 100% libre). Las bandas blancas

representan el ADN libre que no pudo ser encapsulado debido a la hidrólisis de P4-HL provocada por la radiación UV. Las bandas del gel fueron analizadas con ImageJ.

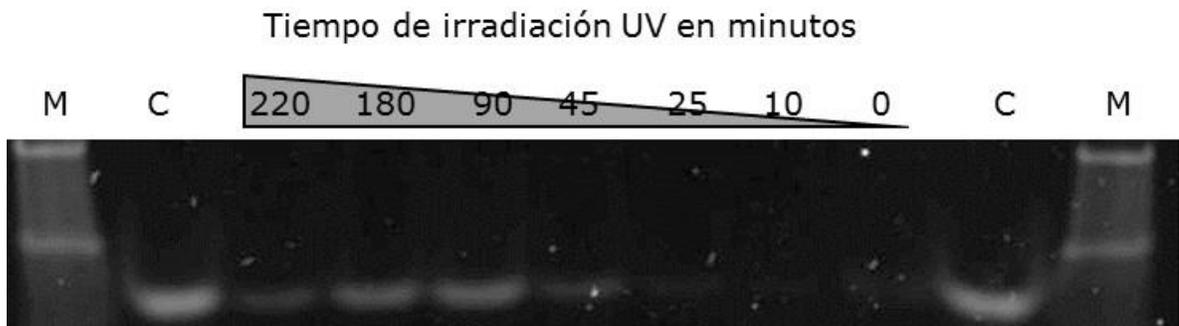


Figura 38: Electroforesis de P4-HLi-DNA en un gel de poliacrilamida 6%, 100V por 30 minutos M: marcador de peso y C: control que representa el 100% de ADN libre. Las bandas blancas representan al ADN libre.

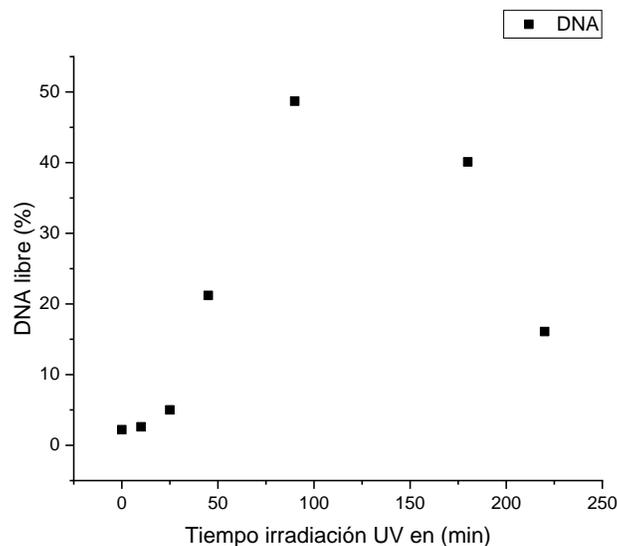
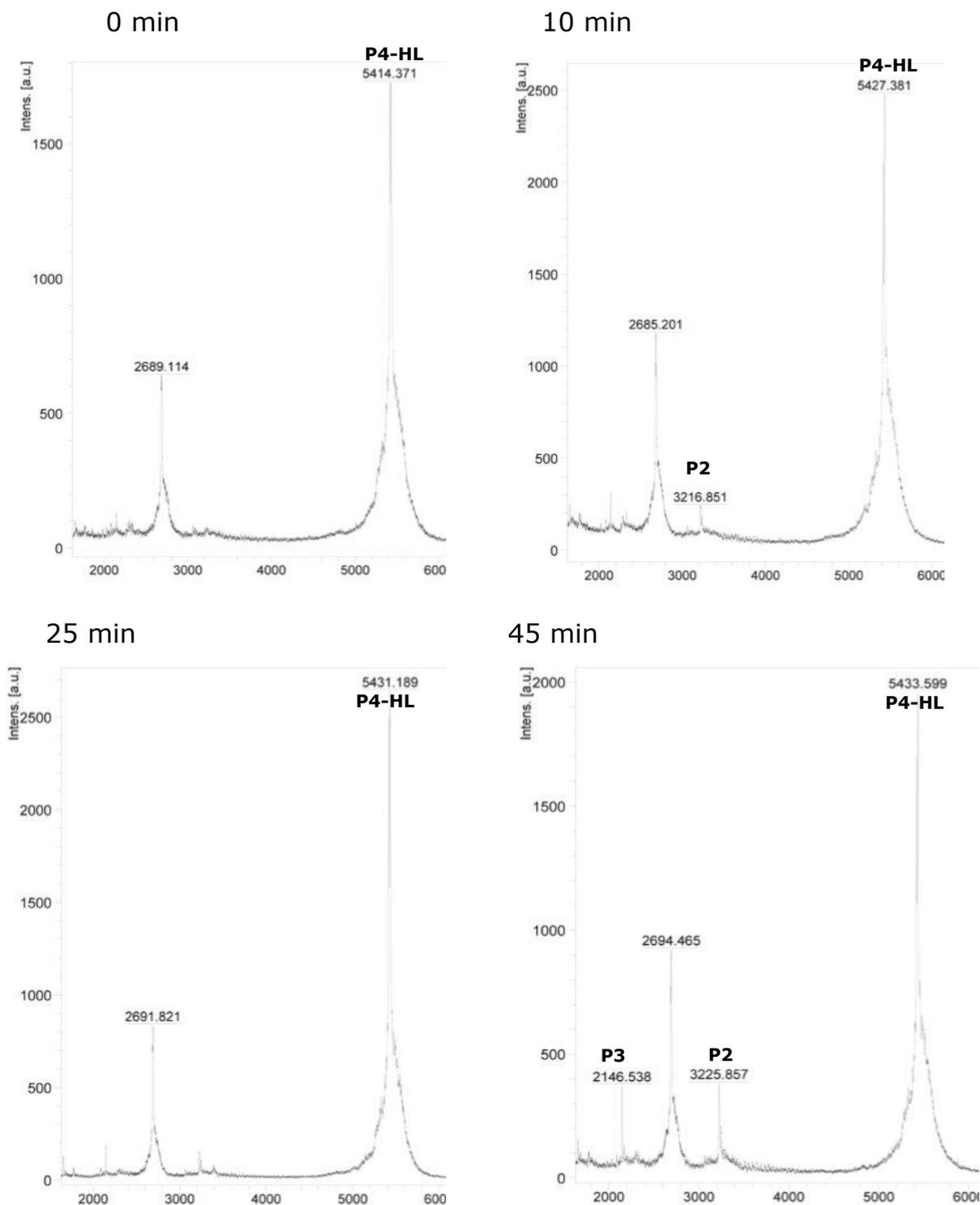


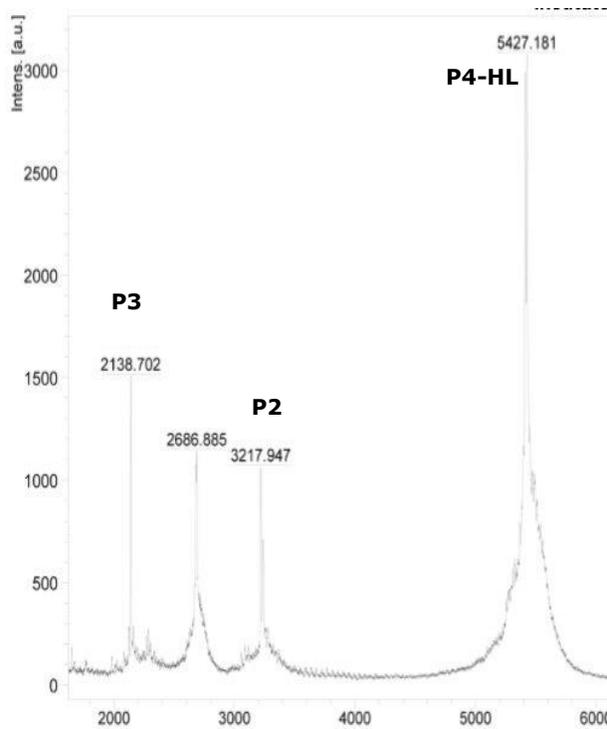
Figura 39: Relación del Tiempo irradiación UV vs % ADN libre.

Aumentando la potencia de la lámpara la hidrólisis de P4-HL es mucho mayor, ya que a un tiempo de 90 minutos de irradiación P4-HL es capaz de encapsular el 51.3 % de AN (Figura 39). En comparación con la otra lámpara ($\ll 100W$) en donde a los 90 minutos apenas se empezaba a hidrolizar P4-HL.

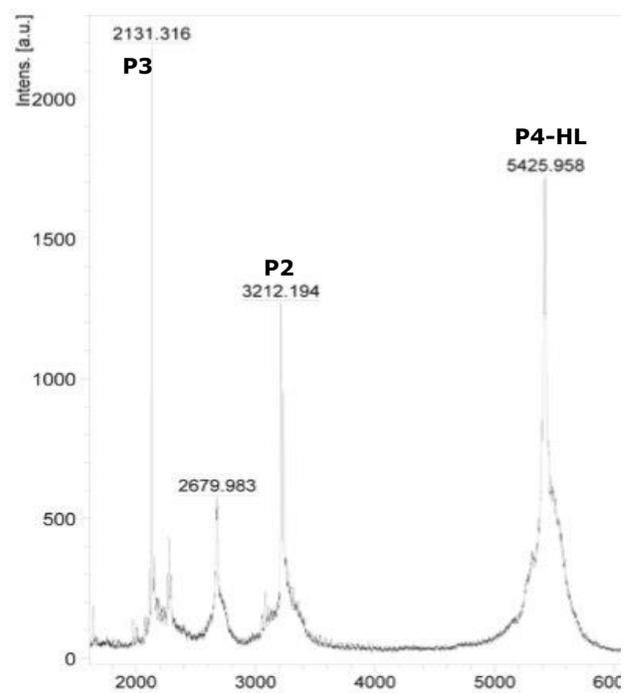
Los resultados obtenidos con MALDI-TOF se muestran a continuación (Figura 40):



90 min



180 min



220 min

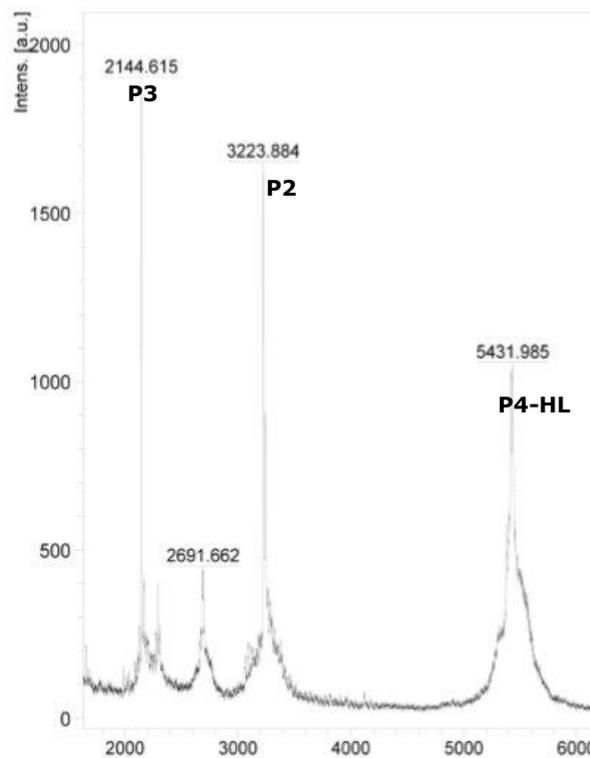


Figura 40: Resultados de MALDI-TOF de P4-HL irradiado con lámpara 2 a diferentes tiempos. Al minuto 0 solo se encuentra P4-HL, a los 10 minutos se encuentran presentes los picos P2 y P4-HL, al minuto 45 aparece el pico correspondiente a P3. A los 180 minutos P3 es el pico más alto, y a los 220 minutos de irradiación el pico correspondiente a P4-HL es el más pequeño.

Con los resultados obtenidos del estudio por MALDI-TOF, podemos comprobar que a los **10 minutos** de que fue irradiado con la lámpara 2 apareció el pico correspondiente a P2 (Figura 40), esto quiere decir que P4-HL se hidrolizó y dividió en sus componentes. A los 45 minutos de irradiación aparecen los dos picos correspondientes a P3 y P2. Al pasar el tiempo de irradiación los picos correspondientes a P3 y P2 van aumentando de tamaño (esto quiere decir que hay un aumento en la concentración de ambos) y disminuyendo el pico que corresponde a P4-HL, esto es debido a que P4-HL se va separando en P3 y P2 por la hidrólisis provocada por la irradiación UV.

Liberación de ADN del complejo P4-HL-ADN al irradiar con lámpara 1 UV.



Figura 41: Electroforesis en gel poliacrilamida 6%. La intensidad de las bandas blancas corresponde al ADN libre. Electroforesis del complejo P4-HL-ADN al ser sometido a diferentes tiempos de irradiación. P4-HL tiene una concentración final de 80 μM y el ADN de 0.2 μM .

En la electroforesis del complejo P4-HL-ADN al ser irradiado con Luz UV, se pudo ver como aparece una banda que va aumentando de intensidad mientras va aumentando el tiempo de irradiación UV (Figura 41). La banda corresponde al ADN que es liberado debido a la fotólisis provocada con luz UV.

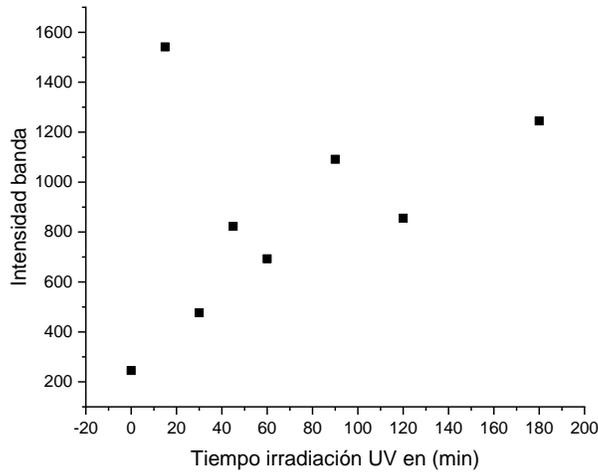


Figura 42: Relación del tiempo de irradiación UV (min) vs Intensidad de la banda. La intensidad de la banda representa al ADN liberado.

Graficando los resultados obtenidos con ImageJ podemos observar una tendencia de un comportamiento lineal, entre la liberación del ADN que estaba encapsulado y el tiempo de irradiación UV (Figura 42). Quitando los puntos 2, 4 y 6. Se puede obtener la siguiente ecuación: $Y = 5.0131X + 321.58$, con $R^2 = 0.9798$ (Figura 43) donde X es el tiempo de irradiación y Y es la intensidad de las franjas la cual corresponde al ADN liberado.

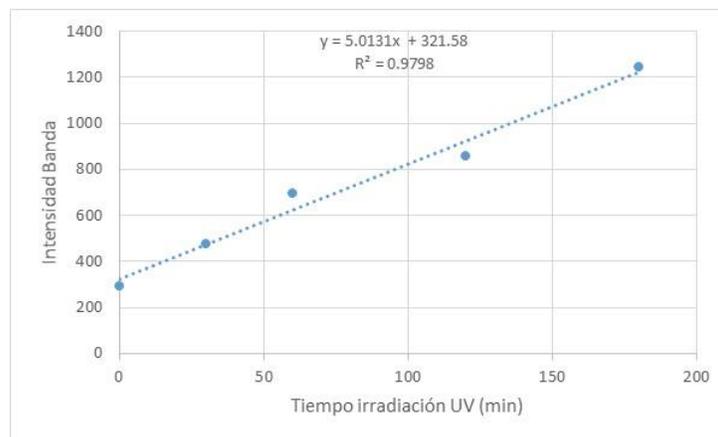


Figura 43: Regresión lineal de la relación de intensidad de la banda con el tiempo de irradiación, la ecuación es la siguiente $Y = 5.0131X + 321.58$ y con $R^2 = 0.9798$.

Podemos comprobar con los resultados de la electroforesis dos aspectos importantes: 1) P4-HL encapsula al ADN formando un complejo P4-HL-ADN responsivo a luz UV. 2) Después de que el ADN fue encapsulado, este puede ser liberado debido al efecto de hidrólisis provocado por someter al complejo P4-HL-ADN bajo irradiación UV.

IRRADIANDO CON LÁMPARA 2 UV 365 nm (100 W)

En la electroforesis del complejo P4-HL-ADN (Figura 44) podemos ver una banda negra en el extremo izquierdo que representa el 100 % de ADN libre del complejo P4-HL-ADN, en los tiempos de 0 a 10 minutos de irradiación, casi no se nota la banda negra, esta empezó a notarse a partir del minuto 25, aumentando su intensidad gradualmente hasta el final del experimento con 90 minutos de irradiación. La banda oscura representa el ADN liberado del complejo P4-HL-ADN debido a la fotólisis provocada por la radiación UV.

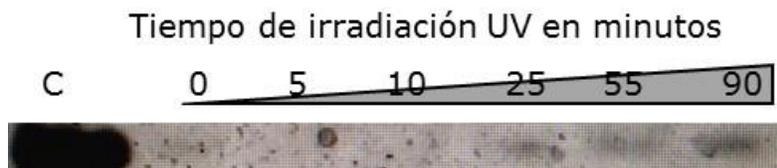


Figura 44: Electroforesis del complejo P4-HL-ADN irradiado a diferentes tiempos. Las franjas oscuras representan el ADN que se encuentra libre después de ser encapsulado. La electroforesis se hizo en gel de poliacrilamida 6% a 80V 45 minutos y 100 V 10 minutos. C representa el 100% de ADN libre, si no estuviera encapsulado por P4-HL.

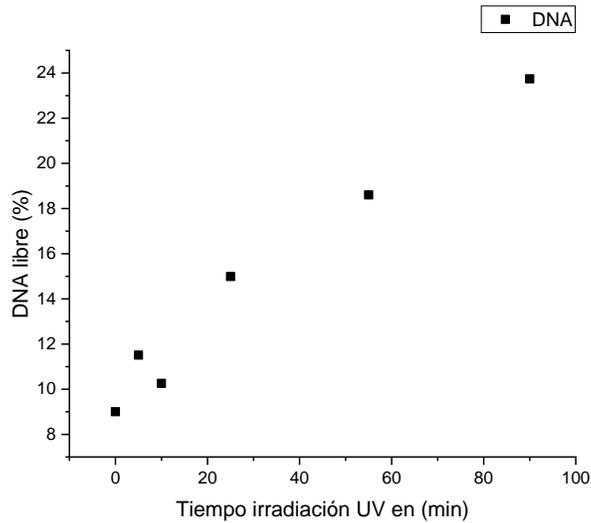


Figura 45: Relación del Tiempo de irradiación UV en minutos vs ADN libre (%).

Utilizando los datos obtenidos con ImageJ, se puede observar un comportamiento lineal entre el tiempo de irradiación y el ADN liberado del complejo P-HL-ADN (Figura 45), con estos datos se obtiene la siguiente ecuación: $Y = 0.158X + 9.8112$ $R^2 = 0.9728$ (Figura 46), donde Y es el porcentaje de ADN libre y X es el tiempo de irradiación.

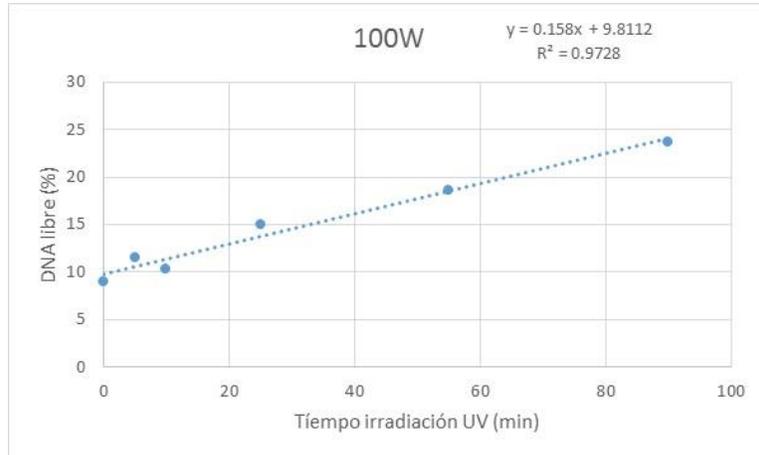
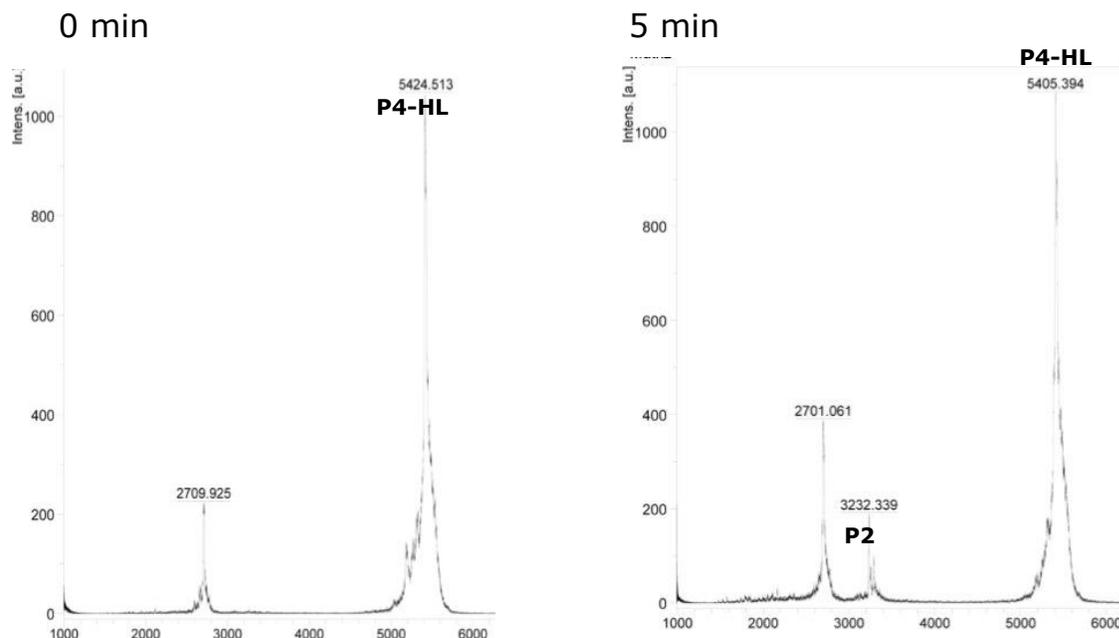


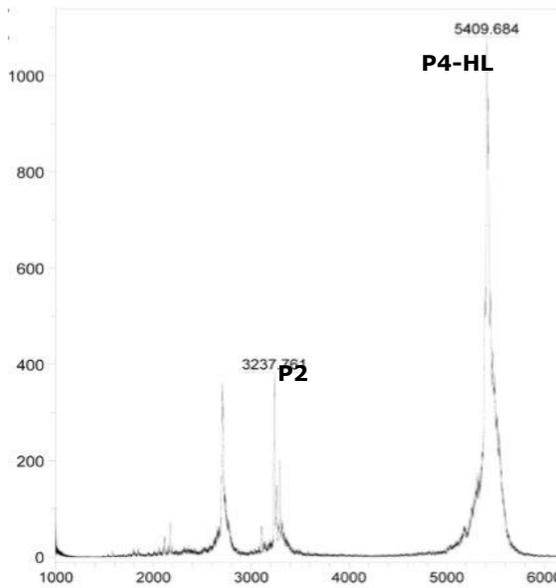
Figura 46: Relación lineal entre %ADN libre y el tiempo de irradiación.

Con este experimento podemos comprobar que P4-HL-ADN es capaz de liberar más rápidamente al ADN cuando la potencia de la lámpara UV es mayor. A un tiempo de **90 minutos** de irradiación hay una liberación del **24 %** de DNA.

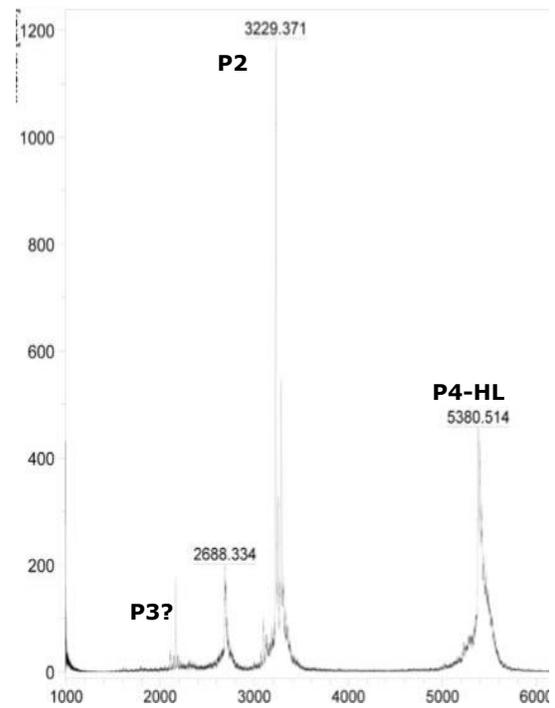
A partir de las muestras se hicieron determinaciones de pesos con MALDI-TOF. Con los resultados obtenidos por MALDI-TOF, podemos comprobar que el complejo P4-HL-ADN se hidroliza al ser irradiado por luz UV a 365nm con una potencia de 100 W por efecto de la fotólisis provocada, y puede "liberar" más rápido al ADN que se encuentra encapsulado. Desde del minuto 5 de irradiación empieza aparecer el pico de aproximadamente 3200 Da, que corresponde al segmento de P2 en donde se encuentra el segmento de unión a ADN (Figura 47). El pico correspondiente a P2 se mantiene visible desde el minuto 5 de irradiación, y va aumentando mientras aumenta el tiempo de irradiación.



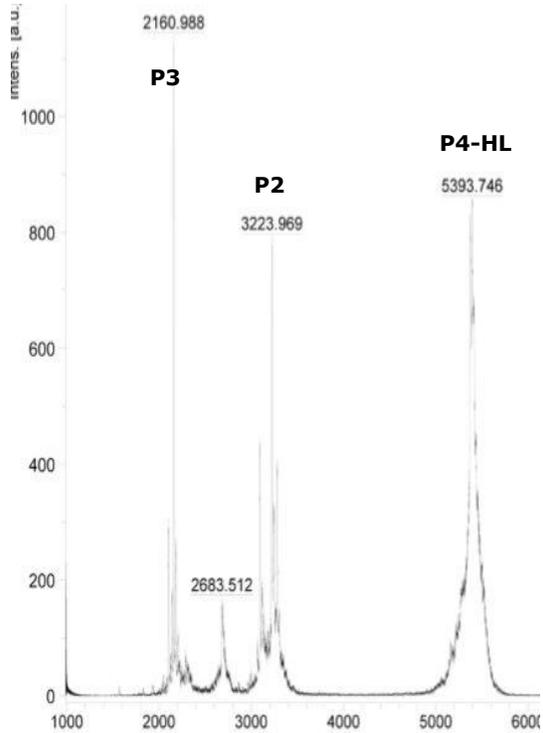
10 min



25 min



55 min



90 min

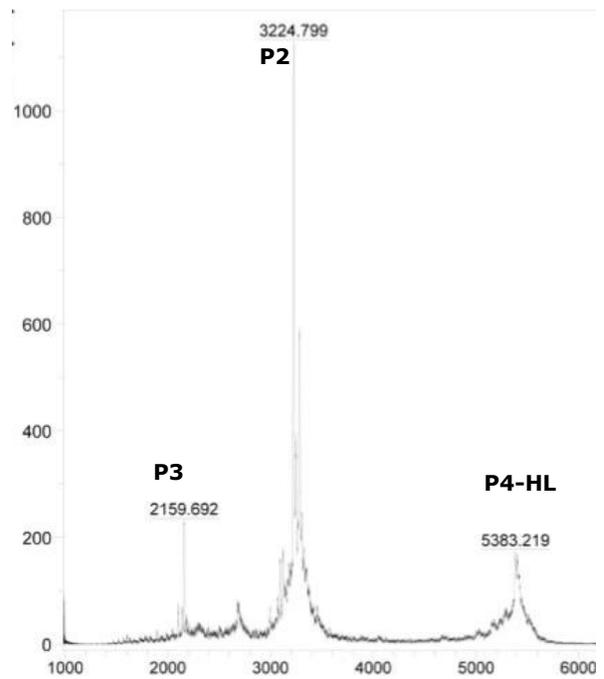


Figura 47: Resultados de MALDI-TOF del complejo P4-HL-ADN irradiado a diferentes tiempos con la lámpara 2. Al minuto 0 solo se encuentra presente el pico correspondiente a P4-HL, a los 5 minutos apareció el pico correspondiente P2, en el minuto 55 el pico correspondiente a P3 y a los 90 minutos de irradiación, el pico correspondiente a P4-HL es el más chiquito.

El segmento P3 es el péptido responsable del cambio estructural y del auto-ensamble. P3 aparentemente empezó a aparecer en el minuto 25 de irradiación, se ve más claramente en el minuto 55 de irradiación, teniendo el pico más alto.

El pico correspondiente a P4-HL disminuye desde el minuto 25 de irradiación UV, en el minuto 90 de irradiación el pico es muy pequeño a comparación con el de tiempo 0 que es cuando P4-HL no se ha hidrolizado. Esto puede significar que en este tiempo P4-HL está más de 50% hidrolizado.

Conclusiones

1. El péptido P4-HL forma complejos con ADN 25pb.
2. A una concentración de **50 μM** de P4-HL y **0.2 μM** de ADN, se observó que el péptido une por completo al ADN 25pb (corresponde a una proporción molar de 1:0.004).
3. Existe una diferencia cuando P4-HL encapsula al ADN con una solución con diferentes días de almacenamiento (nueva y vieja) de P4-HL. Cuando la solución de stock de P4-HL es nueva, éste encapsula (casi en su totalidad) al ADN **0.2 μM** a una concentración de **15 μM** . Cuando se prepara con una solución vieja (varios días o semanas almacenado) de P4-HL, se necesita una concentración mayor a **50 μM** para acomplejar al ADN 0.2 μM .
4. Al irradiar el péptido P4-HL con luz UV de 365 nm se puede notar claramente cómo va bajando su capacidad para formar el complejo P4-HL-ADN. Esto es debido a la hidrólisis de P4-HL provocada por el efecto de la fotólisis por luz UV.
5. Cuando P4-HL se irradia por un tiempo mayor a 90 minutos con la lámpara 1, este es incapaz de encapsular totalmente al ADN con las concentraciones estudiadas.

6. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos saber a qué tiempo y con qué concentración se puede encapsular el 50% de ADN 25 pb.
7. Se escogió una longitud de 365 nm sobre una menor ya que la primera es menos tóxica para su eventual uso con células vivas.
8. El complejo P4-HL-ADN al ser irradiado es capaz de liberar al ADN debido a la hidrólisis de P4-HL provocada por el efecto de fotólisis. Esto quiere decir que se puede controlar la liberación de ADN del complejo P4-HL-ADN gracias a la respuesta de un estímulo externo que en este caso sería la luz UV. Y de esta manera suministrar los ácidos nucleicos y liberarlos en el momento y tiempo adecuados.
9. A mayor tiempo de irradiación, la banda de P4-HL, en el gel SDS-PAGE se va desvaneciendo. Esto es debido a que P4-HL se está hidrolizando en P3 y P2.
10. Al cambiar la concentración de P4-HL de [125 μ M] a [180 μ M] no hay mucho cambio con respecto a la hidrolisis provocada por los efectos de la radiación UV, ya que ambos en un tiempo de 180 minutos de irradiación llegan a un valor del 58% de P4-HL sin hidrolizar.
11. Al irradiar a P4-HL con una lámpara de **100W**, se puede observar como la hidrólisis del péptido es mucho mayor, al punto que con un tiempo de **90 minutos** de irradiación se puede hidrolizar casi por completo a P4-HL.
12. Cuando P4-HL es irradiado por la **lámpara 1** los picos en el estudio de MALDI-TOF correspondientes a P2 y P3 empiezan aparecer a los **120 min** de irradiación. En contraste, cuando P4-HL es irradiado por la lámpara 2 de **100W** los picos correspondientes a P2 y P3 empiezan aparecer a los **10 min** de irradiación.

13. Cuando el complejo P4-HL-ADN es irradiado con una lámpara de **100W**, es capaz de liberar más del **24%** de AN cuando se somete a irradiación por 90 minutos.
14. Estos resultados son satisfactorios ya que demuestran que el péptido P4-HL es capaz de hacer complejos estables con ADN 25pb (P4-HL-ADN) en condiciones normales de presión y temperatura de la CDMX. Además de poder controlar la liberación de ADN en el sitio específico, ya que el complejo P4-HL-ADN es responsivo a un estímulo externo que es la luz UV. En este sentido P4-HL puede ser un buen modelo para sistemas de liberación controlada de ADN en base a péptidos.

Apéndice I

Para el gel de poliacrilamida:

Concentración de poliacrilamida	20%	6%
Agua	2376 μ l	2993 μ l
Tris	2475 μ l	1250 μ l
10%SDS	99 μ l	-----
40% acrilamida-bisacrilamida	4950 μ l	750 μ l
TEMED	12 μ l	12 μ l
10% persulfato amonio	60 μ l	60 μ l

Preparación de complejos P4-HL-AN

Preparación de las soluciones stock:

	Concentración
AN en agua	10 μ M
P4-HL	50 y 500 μ M
HEPES	1M pH 7.4

El AN se guarda en congelador. P4-HL y HEPES se guardan en refrigeración. En la siguiente tabla se dan los μ L que deben ser agregados para preparar las muestras y el orden en el que deben de ir en la mezcla:

	P4-HL [10 μ M]				P4-HL [100 μ M]					
¹ Agua	16	10	6	0	14	13	12	10	6	0
² Buffer	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
³ AN	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
⁴ P4-HL	0	6	10	16	2	3	4	6	10	16
Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración final en la muestra μ M										
AN	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
P4-HL	0	3	5	8	10	15	20	30	50	80

ESPECIFICACIONES DE MALDI-TOF

Todos los estudios hechos por la técnica de MALDI-TOF, se hicieron en el Laboratorio de Servicios Analíticos del Instituto de Química UNAM.

Parámetros de Adquisición.

Nombre del método de Adquisición:

D:\Methods\flexControlMethods\LNM_UNAML_12kDa.par

Modelo Operativo de adquisición: Lineal. Polaridad de Voltaje: POS. Número de disparos: 120.

Información de Instrumento

Usuario: UNAM. Instrumento: FLEX-PC. Tipo de Instrumento: microplex.

HIDRÓLISIS DEL PÉPTIDO P4-HL CON LUZ UV

Tiempos de la exposición a luz UV con **lámpara 1 UV** 365nm

1º experimento 15, 61, 120, y 183 minutos

2º experimento 19, 60, 120, 180, 270 y 677 minutos

Tiempos de exposición con **lámpara 1 UV** 254nm

3º experimento 20, 234, y 676 minutos

Tiempos de exposición a luz UV con **lámpara 2 UV** (100W) 365nm

4º experimento 10, 20, 103, 180, 240 y 286 minutos

EFFECTO EN LA UNIÓN A ÁCIDO NUCLEICO DEL PÉPTIDO P4-HL PREVIAMENTE IRRADIADO CON LUZ UV.

Tiempos de irradiación con **lámpara 1 UV** 365nm

1º experimento 30, 60, 90, y 127 minutos

A continuación se muestra el volumen en μL con el que deben ser preparadas las soluciones y el orden en el que deben de ser agregados.

Reactivo									
¹ Agua	16	10	6	0	14	13	10	6	0
² Buffer	2	2	2	2	2	2	2	2	2
³ AN 2 μM	2	2	2	2	2	2	2	2	2
⁴ P4-HL irradiado	0	6	10	16	2	3	6	10	16
	P4-HL 10 μM				P4-HL 100 μM				

Tiempos de irradiación con **lámpara 1 UV** 365 nm

2º experimento 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos

Preparación de la muestra después de que P4-HL es irradiado.

Reactivo	μL
Buffer	2
Ácido nucleico [$2\mu\text{M}$]	2
P4-HL [$100\mu\text{M}$] irradiado	16

Tiempos de irradiación con la **lámpara 2 UV** (100W) 365 nm

3° experimento 10, 25, 45, 90, 180, 220 minutos

Preparación de la muestra después de que P4-HL es irradiado.

Reactivo	μl
Buffer	2
Ácido nucleico [$2.5\mu\text{M}$]	2
P4-HL 160 μM irradiado	4

LIBERACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO DE LOS COMPLEJOS P4-HL-AN AL IRRADIAR CON LUZ UV.

Tiempos de irradiación con lámpara 1 UV 365 nm

1° experimento 15, 30, 45, 60, 90, 120, y 180 minutos

Orden y cantidad para la preparación del complejo P4-HL-AN

Reactivo	μL
Buffer	18
Ácido nucleico [$2\mu\text{M}$]	18

P4-HL 100 μM	144
-------------------------	-----

Tiempos de irradiación con lámpara 2 UV 365 nm

2º experimento 5, 10, 25, 55, y 90 minutos

Preparación del complejo P4-HL-AN

Reactivo	μL
Buffer	16
Ácido nucleico [2.5 μM]	16
P4-HL 160 μM irradiado	32

BIBLIOGRAFÍA

- Hernández-García A., Álvarez Z., Simkin D., Madhan A., Pariset E., Tantakitti F., Lee S. S., Kiskinis, E. & Stupp S., 2019, Peptide-siRNA supramolecular particles for neural cell transfection, *Advanced Science*, Issue 3, 1801458.
- Rosemary Kanasty, Joseph Robert Dorkin, Arturo Vegas, and Daniel Anderson, 2013, Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials* Vol. 12 (967-972).
- Hong-Jun Li, Hong-Xia Wang, Chun-Yang Sun, Jin-Zhi Du and Jun Wang, 2014, Shell-detachable nanoparticles based on a light-responsive amphiphile for enhanced siRNA delivery, *Royal Society of Chemistry Advances*, 4, 1961.
- Chang Seok Ki, Han Shih, Chien-Chi Lin, 2013, Facile preparation of photodegradable hydrogels by photopolymerization, *Polymer* 54 (2115-2122).
- Sachin P. Patil, Basem A. Moosa, Shahad Alsaieri, Kholod Alamoudi, Aws Alshamsan, Abdulaziz Almalik, Karim Adil,

Mohamed Eddaoudi and Niveen M. Khashab, 2016, Supramolecular self-assembly of histidine-capped-Dialkoxyl-Anthracene a visible-light triggered platform for facile siRNA delivery, *Chemistry Eur. J.*, (13789-13793).

- Jodi M. Ryter and Steve C. Schultz, 1998, Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA, *The EMBO J.* Vol. 17 No. 24, (7505-7513).
- Ru Cheng, Fenghua Meng, Chao Deng, Harm-Anton Klok, Zhiyuan Zhong, 2013, Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticle for programmed site-specific drug delivery, *Biomaterials* Vol. 34, (3647-3657).
- Francesco Cardarelli, Luca Digiaco, Cristina Marchini, Augusto Amici, Fabrizio Salomone, Giuseppe Fiume, Alessandro Rossetta, Enrico Gratton, Daniela Pozzi and Giulio Caracciolo, 2016, The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Nature, Scientific reports.*
- Hamidreza M. Aliabadi, Breanne Landry, Chongbo Sun, Tian Tang, Hasan Uludag, 2012, Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: Where do we stand?. *BIOMATERIALS* Vol. 33, (2546-2569).
- Anders Wittrup and Judy Lieberman, 2015, Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics, *NATURE REVIEWS GENETICS* Vol. 16, (543-552).
- Ozana Onaca, Ramona Enea, David W. Hughes, Wolfgang Meier, 2009, Stimuli Responsive Polymersomes as Nanocarriers for Drug and Gene Delivery, *MACROMOLECULAR BIOSCIENCE* Vol. 9, (129-139).

- Simona Mura, Julien Nicolas and Patrick Couvreur, 2013, Stimuli-responsive nanocarriers for Drug delivery, NATURE MATERIALS Vol. 12, (991-104).
- Hyukjin Lee, Abigail K. R. Lytton-Jen, Yi Chen, Kevin T. Love, Angela I. Park, Emmanouil D. Karagiannis, Alfica Sehgal, William Querbes, Christopher S. Zurenko, Muthusamy Jayaraman, Chang G Peng, Klaus Charisse, Anna Borodovsky, Muthiah Manoharan, Jessica S. Donahoe, Jessica Truelove, Mathias Nahrendorf, Robert Langer and Daniel G. Anderson, 2012, Molecularly Self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery, NATURE NANOTECHNOLOGY, (389-393).
- Aneesh T. Veetil, Kasturi Chakraborty, Kangni Xiao, Myles R. Minter, Sangram S. Sisodia and Yamuna Krishnan, 2017, Cell-targetable DNA nanocapsules for spatiotemporal release of caged bioactive small molecules, NATURE NANOTECHNOLOGY Vol. 12, (1183-1189).
- Blanca Ortiz-Quintero, 2009, RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Revista de Investigación Clínica/ Vol. 61 Num. 5, (412-427).
- Álvaro D. Olivera, María F. Barreiro, Mary Lopretti, 2012, Microesferas de Quitosano como potenciales transportadores de ácidos nucleicos y otros bioactivos, Revista Iberoamericana de Polímeros, Volumen 13(5), (238-244).
- Irene Adán Barrientos, 2018, Nuevos Péptidos Penetrantes para la entrega intracelular de ácidos nucleicos, Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Farmacia.
- J. C. Carey y M. J. Bamshad, 2013, Capítulo 12: Terapia Génica, Universidad de Navarra España, Centro de Documentación de Bioética.