



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTILÁN**

“Evaluación del efecto de dos péptidos cariofílicos en el ensamblaje y funcionalidad de nanopartículas para terapia génica a base de quitosán utilizando el plásmido pEGFP-N1”

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

P R E S E N T A:

Karen Donají Olivo Escalante

A S E S O R A:

Dra. María Eugenia Aranda Barradas

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2022



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.

Esta investigación fue realizada gracias al programa UNAM-PAPIIT TA200420, al COMECyT mediante el Fondo para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Estado de México”, clave FICDTEM-2021-081 y al programa Cátedras de Investigación UNAM-FES Cuautitlán, clave CI2217

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría podido desarrollarse de no ser por la asesoría de la Dra. María Eugenia Aranda, que además de ser una gran asesora y excelente profesora es una gran persona, a la que agradezco por su comprensión y dedicación tanto a esta investigación como a la ciencia.

Por otro lado, me gustaría agradecer a la Dra. Paty Miranda quien prestó su laboratorio para el desarrollo experimental del presente trabajo y por siempre mostrar una increíble calidez mientras desarrollé mis actividades con ella. De la misma forma agradezco al Dr. Carlos Gerardo García Tovar que siempre estuvo dispuesto a apoyar con su conocimiento el desarrollo de este trabajo y también al técnico Francisco González Diaz por su apoyo en la realización de este trabajo de tesis.

Finalmente me gustaría agradecer a mis compañeros de tesis y servicio social, Yareli y Héctor, por formar un gran equipo. Y a Dios por darme esta oportunidad de hacer algo que me apasiona muchísimo.

DEDICATORIA

Me gustaría dedicar este trabajo principalmente a mis papás, que sin su apoyo y ánimos esto no habría sido posible, de la misma forma agradezco a mis hermanos que siempre hicieron lo que estaba a su alcance para apoyarme, desde hacerme compañía en mis desvelos y hacerme reír hasta acompañarme a la universidad o escucharme hablar de cosas que ni siquiera entendían con tal de apoyarme.

También quisiera dedicar este trabajo a mis amigos y compañeros de la universidad, principalmente a Chema, Daniel y Manu, que siempre estuvieron ahí para cualquier cosa que pudiera necesitar tanto en lo académico como en lo personal, además de que las risas jamás faltaron. Y por último le dedico este trabajo a Naruto Uzumaki, que fue mi inspiración para seguir mi camino ninja cuando estaba triste.

ÍNDICE

Índice de figuras	7
Índice de tablas	8
Abreviaturas.....	8
1. Resumen.....	10
2. Introducción	12
2.1.1 Concepto, tipos, ventajas y desventajas.....	12
2.1.2 Vectores y tipos de vectores.....	14
3. Marco Teórico	19
3.1 Quitosán.....	19
3.1.1 Características y estructura de quitosán.....	19
3.1.2 Quitosán como vector en terapia génica.....	19
3.1.3 Coacervación compleja para el ensamblaje de NPs.....	21
3.2 Péptidos cariofílicos	23
3.2.1 Concepto	23
3.2.2 Utilización de péptidos cariofílicos en NPpara terapia génica.....	23
3.2.3 Aspectos a considerar en el desarrollo de vectores no virales usando péptidos cariofílicos	25
3.3 Determinación de relaciones molares óptimas y parámetros para la caracterización de las NPs.....	26
3.3.1 Ensayos de retención para la determinación de relaciones molares óptimas	26
3.3.2 Determinación de tamaño de partícula y ZP	27
3.3.3 Determinación de morfología	27
3.3.4 Ensayos de transfección <i>in vitro</i>	28
4. Planteamiento del problema y justificación	30
5. Hipótesis	30
6. Objetivos.....	31
7. Metodología experimental.....	32
7.1 Preparación del Quitosán como vector	32

7.2	Aislamiento y propagación del plásmido pEGFP – N1	32
7.3	Restricción enzimática de pEGFP – N1	33
7.4	Preparación de las nanopartículas por coacervación compleja	33
7.5	Ensayos de retardamiento de los complejos pEGFP – péptido	34
7.6	Ensayos de retención de los complejos pEGFP – péptido – Quitosán	34
7.7	Caracterización de las NP.....	35
7.7.1	Determinación del tamaño de partícula y ZP	35
7.7.2	Determinación de morfología	35
7.8	Ensayos de transfección <i>in vitro</i>	35
7.8.1	Tinción de núcleos y citoesqueleto.	36
7.9	Ensayo de seguimiento de nanopartículas.....	36
8.	Resultados.....	38
8.1	Aislamiento y propagación del plásmido pEGFP – N1	38
8.2	Restricción enzimática del plásmido	38
8.3	Determinación de la concentración óptima de péptido con base en la migración electroforética	40
8.4	Determinación de la concentración óptima de quitosán por retención electroforética	41
8.5	Caracterización de las nanopartículas	43
8.5.1	Determinación de tamaño de partícula	43
8.5.2	Determinación de ZP	44
8.5.3	Índice de polidispersión (PI).....	46
8.5.4	Análisis Estadístico de los datos de Tamaño de partícula y ZP (ZP).....	47
8.5.5	Morfología.....	48
8.6	Ensayos de transfección <i>in vitro</i>	50
8.7	Ensayo de Internalización de NPs con Yoduro de Propidio	57
	Discusión de resultados	58
	Conclusión	69
	ANEXOS	78
	ANEXO 1: PLÁSMIDO pEGFP – N1.....	78
	ANEXO 2: KIT DE EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO	79

ANEXO 3: INFORMACIÓN DE LOS PÉPTIDOS CARIOFÍLICOS.....	82
Referencias.....	73

Índice de figuras

Figura 1: Mecanismo general para la internalización de NPs a las células blanco	16
Figura 2: Unidad repetitiva de la molécula de quitosán.....	19
Figura 3: Interacción de cargas para la formación de NPs.....	22
Figura 4: Mecanismo de la β importina	24
Figura 5: Gel de integridad del plásmido pEGFP – N1.....	38
Figura 6: Mapa lineal del plásmido con los sitios de cortes para diferentes enzimas	39
Figura 7:Gel de agarosa de la digestión del plásmido.....	40
Figura 8:Ensayo de retardamiento para los complejos pEGFP – péptido	41
Figura 9: Ensayo de retención de las NPs a diferentes concentraciones (%) de quitosán	42
Figura 10: Gráficos representativos de tamaño de partícula	43
Figura 11: Grafico comparativo de los tamaños de partícula para las diferentes muestras.....	44
Figura 12: Gráficos representativos de ZP.....	45
Figura 13: Grafico comparativo del ZP para las diferentes muestras.....	46
Figura 14: 1er Ensayo de Transfección. Células SiHa DAPI 20x	50
Figura 15: 2do Ensayo de Transfección. Células SiHa 40x, control sin Tx. Error! Bookmark not defined.	
Figura 16: 2do Ensayo de transfección. Células SiHa 40x tratadas con NPs quitosán de 20.6 kDa sin péptidos	52
Figura 17: 2do Ensayo de Transfección. Células SiHa 20x tratadas con NPs preparada con quitosán de 57.5 kDa sin péptidos	52
Figura 18: 2do Ensayo de Transfección. Células SiHa 20x tratadas con NPs con P1.....	53
Figura 19: 2do Ensayo de Transfección. Células SiHa 40x tratadas con NPs con P2.....	53
Figura 20: 3er Ensayo de Transfección. Células HeLa 20x tratadas con NPs con quitosán de 57.5 kDa.	54
Figura 21: 3er Ensayo de Transfección. Células HeLa 20x tratadas con NPs con quitosán de 20.6 kDa.. Error! Bookmark not defined.	

Figura 22: 3er Ensayo de Transfección. Células HeLa 20x tratadas con NPs P1	56
Figura 23: 3er Ensayo de Transfección. Células HeLa 20x tratadas con NPs P2	56
Figura 24: Ensayo de Internalización NPs P1	57
Figura 25: Ensayo de Internalización NPs P2..	57

Índice de tablas

Tabla 1: Índice de polidispersión de cada sistema	46
Tabla 2: Análisis estadístico e interpretación de la prueba <i>T de Student</i> para el tamaño de partícula.....	47
Tabla 3: Análisis estadístico e interpretación de la prueba <i>T de Student</i> para el ZP	48
Tabla 4: Análisis estadístico e interpretación de la prueba <i>T de Student</i> para el PI	48
Tabla 5: Microfotografías (SEM) a diferentes aumentos	49

Abreviaturas

AAV: Virus adenoasociados

Ads: Adenovirus

ATP: Adenosín trifosfato

CPP's: Péptidos penetrantes de membrana

CRISPR: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Inter espaciadas

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DD: Índice de desacetilación

DLS: Dispersión dinámica de luz

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

ER: Retículo endoplásmico

FBS: Suero fetal bovino

GDP: Guanosina difosfato

GFP: Proteína verde fluorescente

GTP: Guanosín trifosfato

HEPES: Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etano sulfónico

Kb: Kilobase

mM: Milimolar

miRNA: MicroRNA

MW: Peso molecular

NLS: Señal de localización nuclear

nM: Nanomolar

NPs: Nanopartículas

P1: Péptido 1

P2: Péptido 2

PAF: Paraformaldehído

PBS: Buffer de fosfatos

pDNA: Plásmido

Pld: Índice de polidispersión

mRNA: RNA mensajero

SEM: Microscopía electrónica de barrido

siRNA: RNA pequeño de interferencia

ZP: Potencial Z

1. Resumen

La terapia génica es un concepto amplio que abarca al conjunto de técnicas biotecnológicas y moleculares utilizadas para el tratamiento de enfermedades a través de la modificación del material genético de un individuo por medio de la transferencia de genes terapéuticos que pueden realizar las funciones de un gen sano o bien, silenciar un gen defectuoso, todo esto mediante el uso de vectores capaces de penetrar las membranas celulares (NIH, 2021).

Mediante el estudio de diversas enfermedades se ha logrado llegar a conocer los componente genéticos que actúan como causantes o se ven involucrados en el desarrollo de patologías hasta el progreso de estas, de aquí que en la actualidad sea posible pensar en estrategias enfocadas a tratamientos altamente específicos, además de efectivos; uno de estos es el envío dirigido de genes a las células a través de vectores, de donde proviene la creciente importancia en la actualidad de contar con vectores eficientes a la hora de entregar el material genético.

En este escenario donde los vectores poseen tal importancia para el desarrollo de la terapia génica, el presente trabajo se centra en la optimización de la capacidad de transfección del quitosán como vector no viral por medio del acoplamiento de dos péptidos cariofílicos, los cuales consisten en secuencias diferentes de aminoácidos que actúan como señales de localización nuclear y permiten la entrada al núcleo a través de receptores denominados importinas, lo que aumentaría la cantidad de DNA (ácido desoxirribonucleico) que entra al núcleo para efectuar la acción terapéutica.

Las nanopartículas (NPs) fueron ensambladas por coacervación compleja y la elección de las concentraciones para la obtención de las NPs con óptimas características se realizó a través de ensayos de retención de la migración en gel de agarosa para su posterior caracterización por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), determinación del tamaño por dispersión dinámica de la luz

(DLS), índice de polidispersión (Pdl) y potencial Z (ZP) por movilidad electroforética acoplada a láser Doppler (DLS). Finalmente se estudió el efecto de los dos péptidos cariofílicos en la transfección *in vitro* de las líneas celulares HeLa y SiHa, ambas de cáncer cervicouterino con la intención de comparar las características y funcionalidad de las NPs en función de los péptidos acoplados.

Desde la caracterización se observó un comportamiento diferente para cada uno de los péptidos, donde se encontró que el péptido 1 (P1) formó NPs de mayor tamaño (300 ± 20 nm) en comparación con el control (quitosán + plásmido) (218 ± 18 nm) y el péptido 2 (P2) (221 ± 19 nm), con diferencias estadísticamente significativas; a su vez, el Pld señaló las NPs formuladas con P1 como el sistema más polidisperso (Pld P1 0.213 ± 0.03) en comparación con los otros dos grupos de NPs (Pld Control 0.105 ± 0.038 , Pld P2 0.078 ± 0.018). En cuanto al ZP no hubo diferencias significativas. Finalmente, los ensayos de transfección mostraron una mayor eficiencia del P2 respecto al P1 y el control sin péptidos.

Con todo lo anterior se concluyó que el P2, en comparación con el P1, ofrece mejores resultados desde las propiedades físicas hasta las biológicas, por lo que la eficiencia de un péptido va a depender directamente de la secuencia y características de sus aminoácidos, las cuales tienen la capacidad de alterar las propiedades previamente descritas. Los péptidos cariofílicos aumentan la eficiencia de transfección cuando las secuencias tienen una composición de pocos aminoácidos neutros y varios aminoácidos catiónicos; sin embargo, la eficiencia de la transfección del quitosán como vector puede aún incrementarse a futuro por medio del acoplamiento de ligandos específicos, con la intención de desarrollar un vector casi tan eficiente como un virus sin las desventajas que eso conlleva.

2. Introducción

2.1 Terapia génica

La terapia génica fue propuesta hace casi ya 50 años; sin embargo, en los últimos 10 años se ha visto el creciente desarrollo de la misma, demostrando así que posee beneficios clínicos significativos en comparación con los tratamientos farmacológicos de rutina, además de proveer un enfoque completamente nuevo al tratamiento de enfermedades que se creían intratables tales como las inmunodeficiencias o las hemofilias, todo esto a partir de los avances en genética molecular y biotecnología (Smith, 2017).

2.1.1 Concepto, tipos, ventajas y desventajas

El concepto de terapia génica abarca a todas aquellas técnicas y metodologías que tienen la finalidad de modificar el material genético de un individuo, ya sea regulando la expresión de genes por medio de la introducción exógena de DNA, RNAm, RNA interferente pequeño (siRNA), microRNA (miARN), oligonucleótidos anti sentido o enviando directamente genes terapéuticos a células diana con el objetivo de curar una patología en específico (Yin, 2014).

No obstante, esto ha expresado múltiples desafíos a lo largo de su desarrollo, entre los que encontramos la mala optimización de las características farmacológicas en comparación con los fármacos convencionales (Ylä-Herttuala, 2017).

Según el tipo de material genético utilizado la terapia génica cuenta con diferentes variantes, entre las que encontramos las siguientes:

- **Terapia con DNA:** Este tipo de terapia consta del envío de DNA directamente al núcleo de la célula blanco, con la intención de integrarse como una parte más del genoma, en algunos casos tomando el lugar del

gen defectuoso o dar la producción de proteínas que resulten terapéuticas (Ylä-Herttuala, 2017).

- **Terapia con RNAm:** El potencial del RNAm en la terapia génica se debe a su capacidad de producir *in vivo* proteínas terapéuticas al llegar a la célula sin la necesidad de penetrar la membrana nuclear como sucede con una terapia basada en DNA. Aunque presenta como principal inconveniente ser una moléculas menos estable y más propensa a sufrir desnaturalización (Ylä-Herttuala, 2017).
- **Terapia con siRNA:** Se fundamenta en la capacidad de silenciamiento de casi cualquier gen que poseen los siRNA. tras la introducción exógena a la célula son incorporados a la maquinaria endógena de silenciamiento y son dirigidos hasta el gen objetivo (Ylä-Herttuala, 2017).
- **Terapia con miRNA:** La función de los miRNA endógenos es promover la degradación del RNAm o la inhibición de la traducción para la formación de proteínas. Su importancia clínica se debe a dicha capacidad para regular negativamente genes, como por ejemplo aquellos relevantes en los procesos carcinogénicos (Ylä-Herttuala, 2017).

Fundamentalmente, cada una de estas terapias busca la llegada de un tipo específico de material genético para la regulación de diversos procesos celulares y esto se debe a que casi cualquier secuencia del genoma tiene el potencial de ser modulado con fines terapéuticos por material genético de origen exógeno. Por lo que uno de los principales retos en el desarrollo de la terapia génica es la capacidad de hacer llegar el material genético seleccionado a la célula por medio de vectores que resulten seguros y eficaces permitiendo aprovechar las ventajas de este tipo de terapia; como la especificidad celular y el aprovechamiento de la respuesta inmunológica (Yin, 2014).

2.1.2 Vectores y tipos de vectores

La terapia génica presenta tres componentes indispensables que deben ser considerados para el desarrollo de protocolos exitosos: inicialmente se requiere de un gen que al ser expresado tenga efectos terapéuticos, en un segundo punto se requiere de conocer cuál es la célula blanco y finalmente el diseño del vector, entendiendo por vector a aquel vehículo que será el encargado de introducir el material genético a la célula blanco según sus necesidades; hasta el citoplasma o al núcleo (Rozalén, 2003). Al proceso mediante el que un gen exógeno terapéutico es introducido a una célula blanco le denomina *transfección*.

Vectores virales:

Son una herramienta utilizada para el suministro de genes que aprovecha la capacidad natural de los virus para penetrar la célula, introducir su material genético e inducir los procesos de replicación, transcripción y traducción. Los vectores virales utilizados actualmente con mayor frecuencia son los virus adenoasociados (AAV), los retrovirus / lentivirus y los adenovirus (Ads) (Chen, 2018). Los vectores virales, como retrovirus y adenovirus se han utilizado para aproximadamente el 80% de los ensayos clínicos de fase I aprobados debido a su capacidad para transfectar, sin tener gran éxito a causa de su relativa inocuidad (Ishii, 2001).

Estos virus no pueden ser utilizados directamente como se encuentran en la naturaleza y requieren de modificaciones para ser utilizados como vectores. Entre estos cambios encontramos: alterar la cápside, alterar las glicoproteínas que cubren a los virus envueltos y restringir la expresión de ciertos genes a través de promotores o potenciadores seleccionados. De manera general, este tipo de vectores suelen presentar una elevada especificidad, así como una eficiencia de transfección superior a la de los vectores no virales además de que la capacidad para almacenar material genético varía según el virus utilizado, yendo desde 5 kb hasta 30 kb (Lukashev, 2016).

Aunque estos vectores presentan múltiples ventajas sobre los vectores no virales, aún no se les puede considerar vectores ideales ya que sus costos de producción son elevados, no es posible eliminar todos los genes encargados de las acciones patogénicas, inducen de la respuesta inmunológica y tienen efectos citopáticos y citotóxicos causados por su administración que pueden llevar a que las terapias no sean efectivas (Lukashev, 2016).

Vectores no virales:

Este tipo de vectores están compuestos de diferentes materiales, entre los que tenemos; lípidos, péptidos catiónicos, polímeros catiónicos y moléculas inorgánicas como el fosfato de calcio. Pero pocos de estos vectores se han desarrollado hasta ahora clínicamente debido a su baja eficiencia de entrega en relación con los vectores virales, y sobre estos también presentan la ventaja de proteger al material genético de endonucleasas séricas, no ser inmunogénicos, un costo de producción menor y no tienen una restricción en el número de bases para transporte. Además, es prácticamente fácil crear y alterar químicamente vectores no virales a gran escala (Suryaji, 2019).

La interacción entre los vectores y las moléculas de DNA se basa en la atracción de las cargas, mientras el DNA posee una carga neta negativa provista por los grupos fosfato de los enlaces fosfodiéster los materiales utilizados para la síntesis de vectores se caracteriza por presentar cargas netas positivas, promoviendo la interacción electrostática y la formación de NPs (Vermeulen¹, 2018).

Actualmente el mecanismo por el cual la célula internaliza este tipo NPs a su citoplasma no está cien por ciento estudiado, sin embargo, la teoría que mejor explica este proceso es conocida como “*la esponja de protones*”, dicha propuesta plantea que la internalización del vector se realiza por medio de endocitosis (Vermeulen¹, 2018). Donde posteriormente el endosoma al madurar permite la entrada de protones a través de la ATPasa desde el citoplasma al interior del endosoma, donde el material del vector comienza a actuar como una “esponja” limitando la acidificación del endosoma por lo que comienza el bombeo de más protones que genera finalmente un desequilibrio osmótico iónico entre Cl⁻/ H⁺.

Teniendo como resultado el flujo de agua al interior del endosoma causando un aumento de la presión osmótica que provoca la ruptura del endosoma con la liberación del contenido endosómico en el citosol (Vermeulen², 2018) (Ver figura 1).

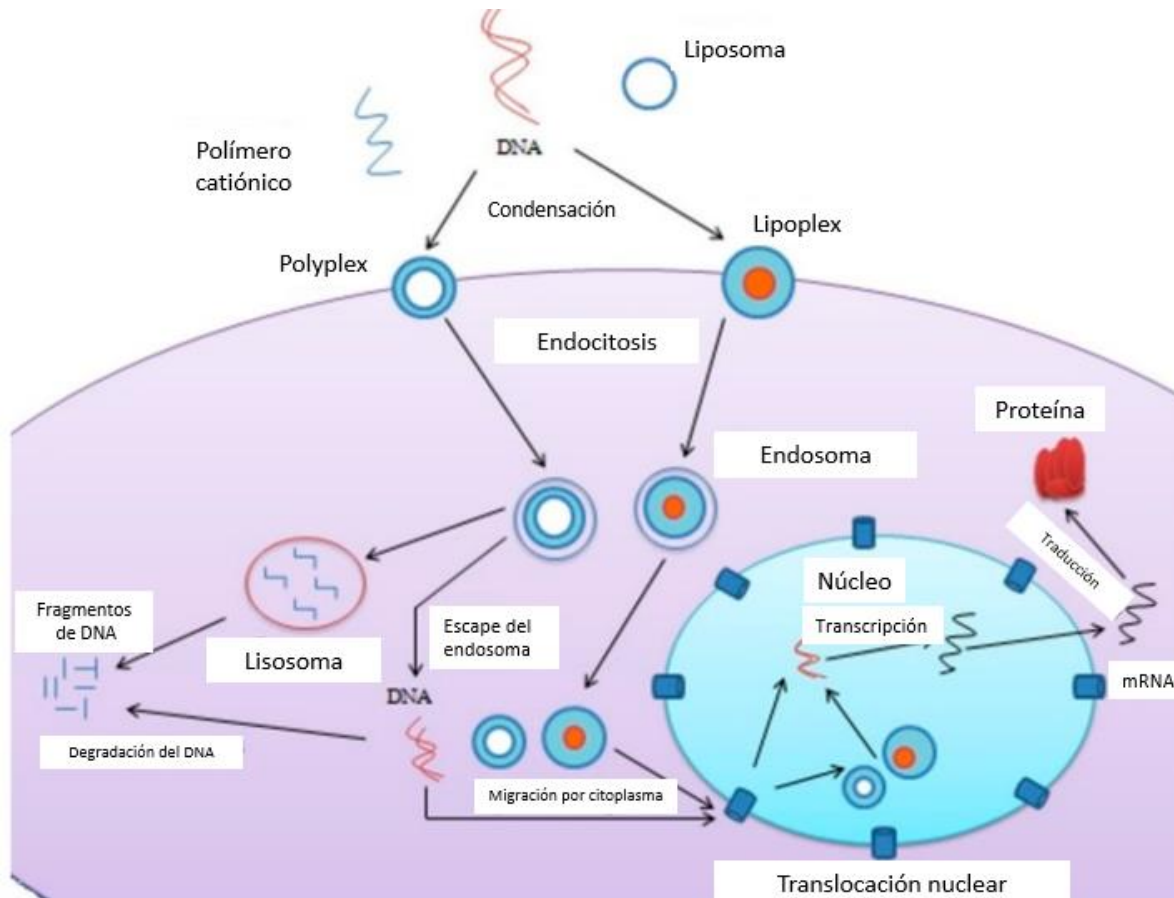


Figura 1: Mecanismo general para la internalización de NPs a las células blanco (Suryaji, 2019).

Según el material del que estén compuestos los vectores permite clasificarlos esencialmente debido a sus características estructurales y mecanismos de penetración celular.

Lípidos catiónicos

Son un amplio conjunto de macromoléculas caracterizado por tener propiedades de compuestos polares. Son considerados como potenciales vectores debido a su semejanza con los fosfolípidos y esteroides que conforman a las membranas celulares. Su composición consta de un grupo hidrofóbico constituido de ácidos

grasos de extensión variable y un grupo hidrofílico, compuesto por grupos amino que permiten el escape endosómico por el supuesto mecanismo de la esponja de protones. Entre los lípidos catiónicos de interés tenemos como ejemplo a DOTAP, DDAB y CTAB, su principal inconveniente es su deficiente estabilidad y su baja transfección, siendo esta última la que ha buscado mejorar por medio de la modificación de los dominios hidrófobos (Suryaji, 2019).

Péptidos penetrantes de células (CPP's)

Se trata de compuestos de origen peptídico, conformados aproximadamente por 5 - 30 residuos de aminoácidos que tienen la capacidad de penetrar las membranas celulares de forma activa por medio de la interacción específica con receptores en la membrana celular. En comparación con otros vectores no virales estos cuentan con la ventaja de tener una eficiencia de transfección mayor, además de que los complejos pDNA - CPP suelen proteger al DNA desnudo de mejor manera, evitando su degradación por endonucleasas, entre sus usos principales además de la entrega de genes tenemos la entrega de fármacos quimioterapéuticos y el reciente uso para el transporte del complejo CRISPR/Cas9 (Böhmová, 2018).

Polímeros catiónicos

Los polímeros catiónicos son macromoléculas con grupos funcionales que pueden ser protonados a pH fisiológico y poseen cargas positivas que les permite interactuar con los grupos fosfatos del DNA, estos complejos formados reciben el nombre de *poliplejos*. Estos se ensamblan en dos etapas, en la primera la interacción electrostática neutraliza las cargas de los nucleótidos y ya saturadas las uniones de los nucleótidos el DNA interactúa con él mismo, condensando las cadenas dentro del polímero. Entre las ventajas de usar polímeros catiónicos está la facilidad para la formación de poliplejos, su mayor estabilidad en comparación con los lipoplejos y menor citotoxicidad (Santos - Carballal, 2018).

Sin embargo, algunos de estos polímeros también están limitados en su aplicación debido a su pronunciada citotoxicidad. Por el contrario, los polímeros catiónicos

naturales, como el quitosán, demuestran una eficacia de transfección comparable a la alcanzada con los polímeros catiónicos sintéticos, pero muestran una baja toxicidad y buenos perfiles de bioseguridad *in vivo* (Raik, 2018).

3. Marco Teórico

3.1 Quitosán

3.1.1 Características y estructura de quitosán

El quitosán es un polímero catiónico biodegradable compuesto de β -D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (Ver Figura 2), producido por desacetilación alcalina de quitina, debido a sus grupos amino se comporta como una base débil en un pH entre 6.2 - 7.2, es únicamente soluble en un pH entre 1 – 6 en el que todos los grupos aminos se encuentran protonados, es en este intervalo de pH donde el quitosán puede desencadenar la apertura de las uniones estrechas, facilitando así el transporte de sustancias de carga positiva, fuera de este intervalo comienza agregarse y a precipitar (Guang, 2002).

El quitosán es biocompatible, biodegradable y no tóxico; por lo tanto, se ha propuesto como una alternativa más segura a otros vectores no virales en el transporte de pDNA, RNAm y la regulación por miRNA (Opanasopit, 2009).

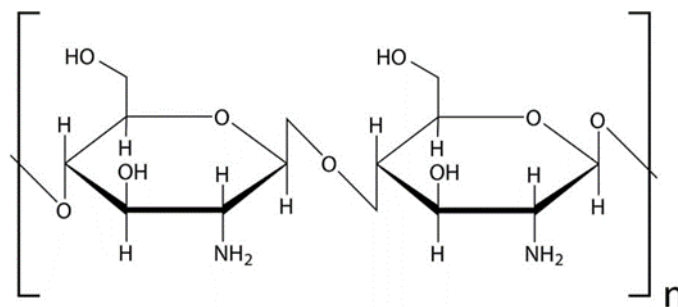


Figura 2: Unidad repetitiva de la molécula de quitosán (Imagen de elaboración propia)

3.1.2 Quitosán como vector en terapia génica

El quitosán comenzó a tener interés cuando fue posible observar su capacidad para unirse a bacterias y células de mamíferos al interactuar con las glicoproteínas de la membrana celular para posteriormente ser endocitado por la célula. Esto

pudo ser observado por B. Carreño – Domínguez en 1997 donde las microesferas de quitosán fueron captadas por células B16F10 de melanoma murino mediante fagocitosis, demostrando que la interacción con la membrana celular permite la entrada a las células para una posterior liberación de material genético (Guang, 2002)

Inicialmente el quitosán reacciona electrostáticamente con los nucleótidos, saturando todas las cargas negativas hasta neutralizar la carga total, posteriormente, se da una condensación de los ácidos nucleicos dentro del polímero formando el poliplejo que provee de protección contra la degradación por endonucleasas y a su vez permite la internalización celular. El proceso de condensación del DNA es impulsado entrópicamente, por lo que un polímero catiónico y el DNA forman de manera espontánea poliplejos al mezclarse (Raik, 2018).

En este punto es endocitado y tras la entrada del poliplejo a la célula bajo el mecanismo denominado como *esponja de protones* las aminas primarias del polímero catiónico, en este caso el quitosán, son protonadas y los ácidos nucleicos se desempaquetan en el citoplasma celular. Aunque aún no se comprende completamente qué tipo de quitosán funciona mejor para los diferentes tipos de genes terapéuticos que se buscan entregar, ha sido posible observar que los parámetros más importantes a considerar para la funcionabilidad de los poliplejos son la conformación, la forma y el tamaño de partícula (Santos - Carballal, 2018).

Entre los parámetros que influyen para la transfección en los vectores a base de quitosán tenemos el peso molecular (MW), el grado de desacetilación (DD), la relación N/P (relación de quitosán cargado positivamente y DNA cargado negativamente), el ZP y el pH del medio de transfección ya que cada uno de estos influye en los efectos de permeabilización y perturbación sobre la membrana célula (Guang, 2002).

Investigaciones pasadas de Sato y colaboradores (2001) han mostrado el efecto del pH en la transfección; donde la eficiencia de transfección a pH 6,9 es mayor

que a pH 7,6. A un pH inferior a 7, los restos de amina en el quitosán se protonan y los complejos de DNA-quitosán se cargan positivamente, lo que facilita la unión con las células cargadas negativamente. En cuestiones del peso molecular, el peso molecular óptimo del quitosán depende de las líneas celulares y puede influir en la estabilidad del complejo DNA-quitosán, la eficiencia de la captación celular y la disociación del DNA del complejo después de la endocitosis (Ishii, 2001).

Por otro lado, es importante señalar que el quitosán al comportarse como un polielectrolito tiende a agregarse cuando se encuentra en solución acuosa, como es el caso de las NPs, por lo que es importante tener dicha consideración al momento de realizar las lecturas de ZP, así como de tamaño de partícula, ya que la agregación de los complejos puede afectar la suspensión (Guang, 2002).

3.1.3 Coacervación compleja para el ensamblaje de NPs

La coacervación compleja es un método de autoensamblaje de NPs, basado en la formación de las NPs a partir de las interacciones electrostática entre moléculas cargadas en solución. Dentro de las ventajas que presenta este método es la obtención de complejos de geometría funcional y bien definida, a través de interacciones sencillas que no afectan la funcionalidad de lo que se desea transportar.

Los coacervados o en este caso, los poliplejos son formados con cargas opuestas entre sí interaccionando y en algunas ocasiones también pueden intervenir otro tipo de fuerzas como hidrofóbicas, Van der Waals y puentes de hidrógeno que estabilizan los complejos polisacárido – DNA (Köping-Höggård, 2004).

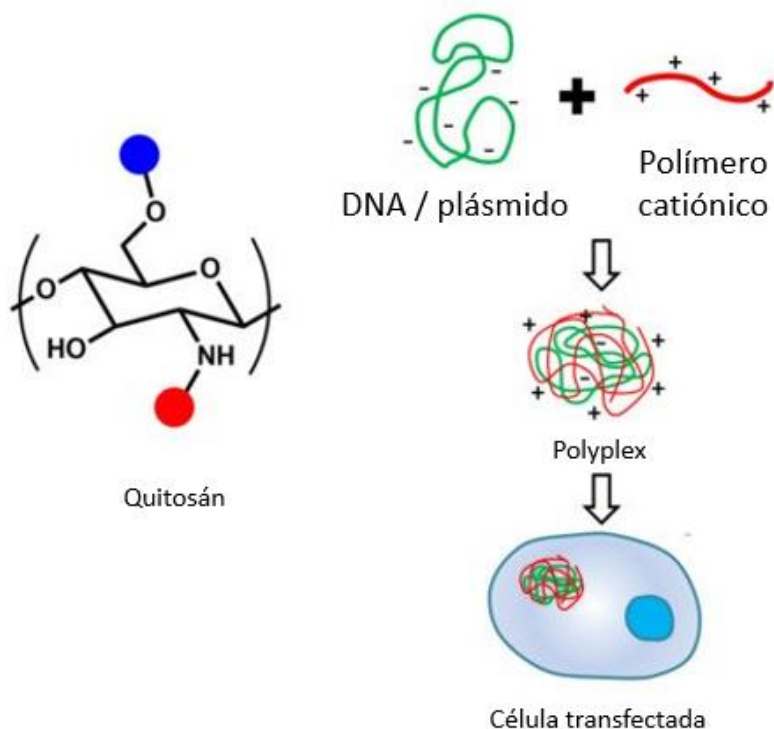


Figura 3: Interacción de cargas para la formación de NPs (Novo, 2015).

Las interacciones electrostáticas se dan según las cargas netas de las moléculas en las condiciones en las que se producen las mezclas, en el caso de la formación de los poliplexos DNA - quitosán, la interacción se da entre los grupos fosfato del DNA que le proporcionan una carga neta negativa con los grupos amino cargados positivamente del quitosán que lo convierten en un polielectrolito que se disuelve fácilmente en soluciones ácidas (Ver figura 3). Estas interacciones de carga generan cambios en la conformación del DNA hasta una forma condensada, inducida por el polication, así como por las cargas iónicas en el medio de disolución (Köping-Höggård, 2004).

Para la formación de este tipo de complejos se debe tener en cuenta la relación molar entre quitosán y DNA para obtener una partícula de tamaño y forma específicos, además del peso molecular del quitosán a utilizar, así como el grado de acetilación. Bajos grados de desacetilación generan sistemas hidrofóbicos y con menor densidad de carga, los cuales no favorecen las interacciones electrostáticas, mientras que, altos pesos moleculares del quitosán y altos grados

de desacetilación tienden a formar complejos esféricos y con mayor estabilidad (Cheng, 2014).

El tamaño de los complejos formados puede ir de los 150 nm hasta los 800 nm, en relación al peso molecular del quitosán utilizado, por lo que es importante tener esto a consideración ya que desde el punto de vista de la administración de fármacos el tamaño de partícula es particularmente importante ya que afecta fuertemente el tiempo de circulación, la entrada a la células diana y la biodisponibilidad del complejo, normalmente el tamaño ideal para la formación del endosoma es menor a 250 nm pero esto puede variar según el amortiguador, características de las células utilizadas y el ZP (Vinogradov, 2002).

3.2 Péptidos cariofílicos

3.2.1 Concepto

Los péptidos cariofílicos o también llamados comúnmente péptidos de señalización nuclear son secuencias de 5 - 20 aminoácidos, formados principalmente por aminoácidos básicos como la lisina (K) y la arginina (R) derivada de proteínas nucleares eucariotas y proteínas virales, la cual contienen una señal de localización nuclear (NLS) que es reconocida por proteínas receptoras intracelulares específicas que conforman los poros nucleares (Yin, 2012)

3.2.2 Utilización de péptidos cariofílicos en NP para terapia génica

A lo largo de la evolución las células han desarrollado diferentes mecanismos que protegen al DNA propio y a la célula de DNA exógeno que pueda resultar perjudicial como el de los virus, mientras que a su vez estos patógenos han desarrollado mecanismos de evasión. Por lo que conocer este tipo de relaciones entre la evasión y la defensa facilita la entrega de genes terapéuticos (Yin, 2013).

Sin embargo, los sistemas de transferencia de genes no virales todavía adolecen de una eficacia de transfección relativamente baja en comparación con los vectores virales, lo que dificulta su amplia aplicación clínica, pues al llegar el DNA

al citoplasma es liberado pero no internalizado al núcleo, por lo que la expresión del material genético terapéutico no se realiza. Los péptidos que contienen una señal de localización nuclear (NLS) se unen al DNA de modo que se forma un complejo DNA-NLS, mismo que puede ser reconocido como un sustrato de importación nuclear por proteínas receptoras intracelulares específicas conocidas como nucleoporinas, que forman un canal llevando el complejo formado al interior del núcleo celular (Cartier, 2002). El mecanismo de internalización nuclear más estudiado hasta la fecha es el regulado por la importina β , y es sobre el mismo que actúan los péptidos cariofílicos.

El sustrato se une a la importina β a través de la proteína adaptadora importina α para sustratos con NLS rico en arginina / lisina mediado por la GTPasa Ran (RanGAP) que convierte el GTP a GDP (Ver figura 4, punto 1). La subunidad α de importina se une a la señal de localización nuclear (NLS) y la subunidad β se

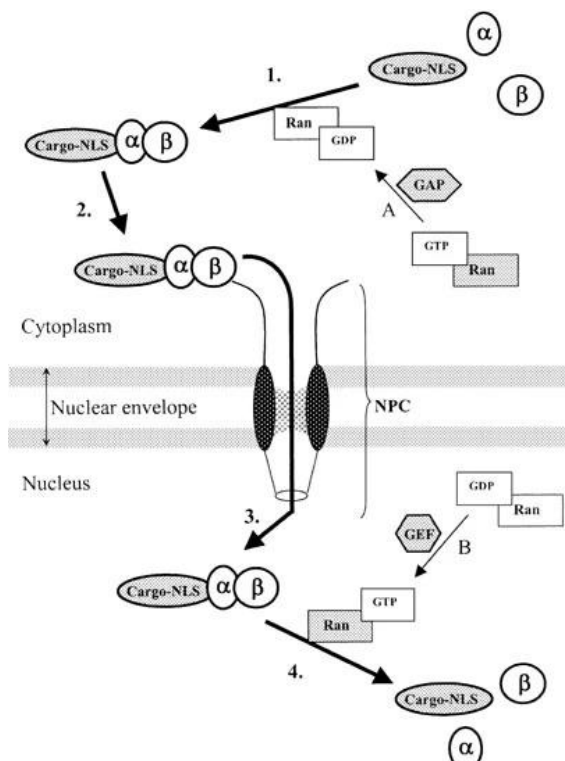


Figura 4: Mecanismo de la β importina. (Cartier, 2002)

acopla al complejo de poros nucleares y se transloca a través del canal al interior del núcleo (Ver figura 4, punto 2)

Cuando el complejo es internalizado (3) se disocia por medio del factor RanGEF que pasa de GDP a GTP y los factores α y β son enviados de nuevo al citoplasma para su reciclaje (Ver figura 4, punto 4).

La forma GDP permite la asociación del complejo mientras que la GTP lleva a cabo la disociación, por lo que la dirección del intercambio se ve dictada por la distribución de RanGEF y RanGAP.

3.2.3 Aspectos a considerar en el desarrollo de vectores no virales usando péptidos cariofílicos

Si bien la inserción de péptidos con secuencias NLS aprovecha la maquinaria de importación nuclear, el diseño de vectores no virales requiere tener en consideración diferentes factores que influyen la capacidad de los péptidos cariofílicos para mejorar la entrega de genes terapéuticos; como el método de incorporación del péptido NLS, el tipo de péptido NLS, la morfología del DNA y el tipo de unión con el péptido.

Tipo de unión y morfología del DNA

En el caso del DNA lineal se ha observado un incremento en la transfección de 2 a 7 veces cuando existen uniones con los péptidos NLS en uno de los extremos de la cadena con una unión que puede ser tanto covalente en una zona no codificante como electrostática, mientras que en el DNA plasmídico la transcripción se puede ver disminuida o inhibida si la unión de los péptidos se realiza de forma covalente y por otro lado, la unión por interacciones electrostáticas presenta la ventaja de ayudar a la condensación del DNA para la formación de heteroplejos (Bremner, 2004).

De la misma forma, se ha observado que en entregas de DNA desnudo el complejo NLS - DNA lineal ha tenido mayor transfección al complejo Plásmido - NLS, caso contrario a si se realiza un heteroplejo. Por lo que para entregas directas como es el caso de la microinyección los plásmidos pueden ser digeridos por enzimas de restricción a su forma lineal (Bremner, 2004).

Interacciones del péptido con los receptores nucleares y cantidad de péptido

No sería posible señalar con exactitud la cantidad de un péptido que debe utilizarse, sin embargo, se debe tener en cuenta que el complejo debe presentar las cargas positivas de la lisina y arginina para la interacción con los receptores de transporte, y su neutralización al unirse electrostáticamente al DNA impediría el reconocimiento, además de que si se desea formar un heteroplejo por

coacervación compleja también se debe buscar un balance de cargas para formar la nanopartícula (Bremner, 2004).

Purificación del complejo NLS -DNA

Los péptidos no conjugados al ser introducidos a la célula pueden competir por los sitios de internalización nuclear con los complejos formados, por lo que se debe tener en cuenta una purificación por precipitación con etanol de los complejos formados en casos en los que la transfección no sea exitosa de manera inicial, todo para asegurar que no exista competencia en los receptores que pueda afectar la transfección (Bremner, 2004).

3.3 Determinación de relaciones molares óptimas y parámetros para la caracterización de las NPs

3.3.1 Ensayos de retención para la determinación de relaciones molares óptimas

Una de las formas para la evaluación de NPs son los ensayos de retardamiento también llamados ensayos de cambio de movilidad electroforética, los cuales son una técnica que permite analizar las interacciones DNA - proteína, implementada por Fried y Crothers en 1981 para el estudio del operón lactosa, el fundamento de la técnica se basa en la estabilidad de los complejos formados con el DNA que impidan su migración durante la electroforesis en gel y no se limita a proteínas, pues se extiende al estudio de complejos formados de la unión DNA – péptido, y en general al estudio de complejos DNA – componentes catiónicos (Scott, 1994).

El ensayo consta de una electroforesis en gel, donde el DNA con carga neta negativa viaja desde el ánodo hasta el cátodo según su tamaño, sólo que en este caso en específico al evaluarse la estabilidad de los complejos se espera que la unión entre el DNA y la proteína o molécula de interés impida la migración o la retarde debido a la neutralización de las cargas, lo que mostraría que se está formando un complejo estable que protege al DNA. Para esto las muestras se dejan correr sobre el gel y al ser revelado se analiza la altura de la banda, donde la estabilidad del complejo será inversamente proporcional al desplazamiento e

incluso en algunos casos el complejo puede ser tan estable que resulte en la desaparición de la banda por una incapacidad de intercalamiento de los colorantes entre los pares de bases del DNA. De esta forma, y según sea lo que se busque de la interacción entre los componentes catiónicos y el DNA, será el grado de retención de la migración que determinará las relaciones molares óptimas entre el componente catiónico y el DNA (Scott, 1991).

3.3.2 Determinación de tamaño de partícula y ZP

Las NPs se pueden definir como partículas submicroscópicas con una dimensión inferior a 1000 nm, las cuales pueden mantener ciertas características fisicoquímicas específicas relacionadas con su tamaño. Es el tamaño quien determina si se trata de una nanopartícula, así como su posibilidad de ser endocitada por la célula. Para la determinación del tamaño de partícula se utilizan técnicas como la dispersión dinámica de la luz (DLS), basada en el movimiento browniano que poseen las partículas en solución, que al hacerles incidir un haz de luz provoca un desplazamiento de tipo Doppler que, tras diferentes tratamientos matemáticos, permiten conocer el radio hidrodinámico de la partícula, siempre y cuando esta sea esférica. Las NPs de menor tamaño poseen una mejor penetración que las contrapartes más grandes e incluso son capaces de cruzar capilares y sinusoides tisulares (Santos - Carballal, 2018).

El ZP se puede entender como la carga superficial de una partícula en relación con el líquido en el que está suspendida bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado que puede orientar respecto a la estabilidad de las NPs y éste se determina mediante movilidad electroforética acoplada a velocimetría laser Doppler. Cuando un ZP tiene valores positivos las NPs van a tender a repelerse por las cargas, mientras que a potenciales Z negativos las NPs precipitan o se aglomeran (Santos - Carballal, 2018).

3.3.3 Determinación de morfología

La microscopía electrónica tanto de barrido como de transmisión se ha utilizado para determinar la forma física de las NPs. Sigue el mismo principio que un

microscopio óptico con la diferencia de que en este caso se hace incidir sobre las muestras un haz de electrones en lugar de fotones, lo que le otorga una resolución de muchos órdenes de magnitud mayor que con microscopios normales dado que el poder de resolución es directamente proporcional a la longitud de onda de la irradiación (Chandra, 2016).

Para el caso preciso del quitosán se conoce que puede adoptar diferentes formas en complejos nanoparticulados, entre las que se encuentran la forma toroidal, esférica o globular. Cada una de estas puede observarse según la interacción entre el quitosán y el DNA y va a tener efectos directos sobre su estabilidad como complejo aunado a la capacidad de adentrarse a la célula (Santos - Carballal, 2018).

3.3.4 Ensayos de transfección in vitro

Los experimentos de transfección *in vitro* tienen como objetivo evaluar el rendimiento general de los vectores de administración de genes. La eficacia de la transfección se evalúa típicamente analizando la expresión de una proteína luminiscente como la luciferasa de luciérnagas, proteína verde fluorescente (GFP), proteínas fáciles de detectar como la B-galactosidasa o una combinación de estas. Y según sea el gen reportero escogido se puede utilizar diversas técnicas para el análisis de la expresión, como es el caso de la citometría de flujo o microscopía de fluorescencia para las proteínas fluorescentes. Otra técnica común cuando se utiliza como gen reportero alguna enzima es la detección de la fluorescencia o formación de metabolitos coloridos, como en el caso de la reacción enzimática de la luciferasa (Bono, 2020)

Por otro lado, aunque existen diferentes genes reporteros, cada uno de ellos sirve para la evaluación de aspectos distintos. Los genes de proteínas fluorescentes son buenos descriptores de la eficacia de la transfección a nivel de células individuales, que normalmente se define como el porcentaje de células que expresan la proteína codificada, mientras que los genes que codifican enzimas como la expresión de luciferasa proporciona información sobre los niveles de expresión de pDNA dentro de una población celular pero no en células

individuales. Es por esto que para una evaluación completa se sugiere la mezcla de genes reporteros que permitan conocer tanto la transfección a nivel individual como poblacional (Bono, 2020).

4. Planteamiento del problema y justificación

En la actualidad con los conocimientos en materia de salud el desarrollo de la terapia génica posee gran importancia para el avance de los tratamientos médicos, en especial para el de enfermedades que no pueden ser tratadas a través de fármacos y terapias convencionales o no tienen un buen pronóstico tras ser detectadas, por lo que se requiere de estrategias innovadoras que ayuden a la población que enfrenta este tipo de enfermedades, de aquí la importancia del desarrollo de vectores no virales óptimos que puedan asegurar la llegada del material genético al núcleo celular para ser expresado y efectuar la acción terapéutica. En este trabajo se busca diseñar y caracterizar NPs basadas en un vector no viral como el quitosán, así como demostrar y comparar los efectos de la adición de dos péptidos cariofílicos tanto en sus características como en su funcionalidad.

5. Hipótesis

Al acoplar un péptido cariofílico al plásmido pEGFP-N1 mediante interacción electrostática previo al ensamblaje por coacervación compleja de NPs con quitosán, la eficiencia de la transfección aumentará debido a la afinidad de estas moléculas por el núcleo celular, aumentando la expresión del material genético enviado, lo que contribuye a superar el gran inconveniente que presentan los vectores no virales en el envío de genes terapéuticos, que es la baja eficiencia de transfección.

6. Objetivos

Objetivo general

Desarrollar NPs utilizando quitosán como vector no viral para el envío de genes terapéuticos con una mayor eficiencia de transfección a través del acoplamiento de dos péptidos cariofílicos comparando su efecto en las características y funcionalidad biológica de las NPs mediante microscopía electrónica, dispersión dinámica de luz, retención electroforética y ensayos de transfección *in vitro*.

Objetivos particulares

- Aislar el plásmido pEGFP – N1 de cepas de *Escherichia coli* en medio LB a través de un kit comercial.
- Determinar las relaciones molares óptimas (plásmido: péptido: quitosán) para el ensamblaje de las NPs utilizando dos péptidos.
- Caracterizar las NPs obtenidas determinando tamaño y polidispersión por dispersión dinámica de luz, morfología por microscopía electrónica de barrido y ZP mediante movilidad electroforética acoplada a laser-Doppler.
- Evaluar la funcionalidad biológica determinando la eficiencia de transfección *in vitro* de las NPs utilizando las líneas celulares HeLa y SiHa.

7. Metodología experimental

La parte experimental de este trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, ubicado en la Unidad de Posgrado a cargo de la Dra. Patricia Miranda y con asesoría de la Dra. María Eugenia Aranda Barradas, en colaboración con el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), Juriquilla y con el laboratorio 4 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán Campo 4, a cargo del Dr. Carlos Gerardo García Tovar, pertenecientes a la Universidad Nacional Autónoma de México.

7.1 Preparación del Quitosán como vector

El quitosán pulverizado se obtuvo a partir del exoesqueleto de camarón con un MW de 20.6 kDa y un DD de 85-90%. Fue producido y caracterizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y se utilizó sin ningún otro tratamiento adicional (Miranda, 2011). A partir de este pulverizado fue preparada una solución stock de quitosán al 1% con ácido acético al 1% mediante la adición progresiva del sólido con agitación constante a temperatura ambiente hasta su completa disolución y posteriormente se balanceó el pH a 5.5 con la adición gota a gota de NaOH.

7.2 Aislamiento y propagación del plásmido pEGFP – N1

La propagación se realizó en medio LB con kanamicina 50 µg/ml de una cepa bacteriana de *Escherichia coli* transformada con el plásmido pEGFP-N1 con agitación constante durante 17 horas a 37 °C. Para el aislamiento del plásmido se utilizó el kit comercial Qiagen Megaprep plasmid extraction que incluye los buffers, soluciones y la columna de separación. Para mayor detalle sobre el plásmido revisar el **ANEXO 1** y sobre el kit revisar el **ANEXO 2**.

Tras el aislamiento las muestras fueron resuspendidas en agua inyectable. Se realizó un gel de integridad utilizando agarosa al 1%, el cual fue cargado con 5 µl de muestra, 1 µl de GelRed y 1 µl de buffer de carga y se dejó correr durante 20 minutos a 121 mV.

Para la cuantificación se utilizó el Espectrofotómetro para Microplacas Epoch™, donde se determinó la concentración de plásmido en cada una alícuota, así como su relación 260/280 por duplicado, de donde se obtuvieron las medias para la realización de cálculos para la preparación de soluciones stock de plásmido a 100 µg/ml.

7.3 Restricción enzimática de pEGFP – N1

La digestión enzimática se realizó con la enzima EcoRI. Se colocó 1 µg de pEGFP -N1 con 5 µl de Buffer y 1 µl de EcoRI y se dejó en incubación a 37°C por una hora. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% con GelRed y se dejó correr la electroforesis por 45 minutos a 121 mV.

7.4 Preparación de las nanopartículas por coacervación compleja

Para la formación de las NPs por coacervación compleja se preparó una dilución stock de pEGFP – N1 a 100 µg/ml utilizando Na₂SO₄ (25 mM) como diluyente. Para el ensamblaje se colocó en tubos Eppendorf de 1.6 ml un volumen de plásmido concentración stock, al que se le adicionó un equivalente en volumen de péptido cariofílico manteniendo la relación volumen 1:1 y posteriormente la mezcla se llevó a agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasada la primera agitación se añadió el quitosán manteniendo la relación volumen 1:1:1 entre el plásmido - péptido- quitosán y se agitó a temperatura ambiente durante media hora.

7.5 Ensayos de retardamiento de los complejos pEGFP – péptido

Las secuencias de ambos péptidos cariofílicos que se probaron se muestran a continuación:

Secuencia Péptido 1	CGGGPKKKRKVED
Secuencia Péptido 2	PAAKRVKLD

Para mayor detalle de las características de los péptidos revisar el **ANEXO 3**.

Los péptidos liofilizados se resuspendieron en 1 ml de agua inyectable (3 mg/ml), a partir de esta solución stock fueron preparadas diluciones **1:400** para el **péptido 1** y **1:500** para el **péptido 2**. De las soluciones anteriores de ambos péptidos fueron preparadas soluciones a una concentración de: **0.03 µM, 0.07 µM, 0.15 µM, 0.2 µM, 0.3 µM** con agua inyectable como diluyente.

Los complejos fueron ensamblados siguiendo la metodología de coacervación compleja descrita anteriormente sin adicionar quitosán. Tras la agitación, las muestras fueron cargadas de la siguiente manera: 15 µl de muestra con 1 µl de GelRed y 1 µl de Buffer de carga en cada pocillo de un gel de agarosa 1% que se dejó correr a 121 mV durante 30 minutos.

7.6 Ensayos de retención de los complejos pEGFP – péptido – Quitosán

Las concentraciones establecidas para cada uno de los péptidos fueron las siguientes:

Concentración del Péptido 1	0.2 µM
Concentración del Péptido 2	0.5 µM

Se prepararon diferentes concentraciones de quitosán: **0.03 %, 0.04%, 0.6 %, 0.8%, 0.1%, 0.12% y 0.14%**. Para la formación de los complejos por coacervación compleja y se repitió la metodología anterior, mezclando 25 µl del plásmido con 25 µl de péptido (1 o 2) a la concentración señalada previamente y se mantuvo en agitación por 30 minutos. Tras la agitación fueron añadidos 25 µl quitosán a cada

una de las concentraciones variables que se deseaba probar y se mantuvo en agitación por 30 minutos más.

Efectuada la segunda agitación, se realizó un nuevo gel de agarosa 1% donde se cargaron por pocillo 15 µl de muestra con 1 µl de GelRed y 1 µl de Buffer, finalmente se dejó correr a 121 mV durante 30 minutos para posteriormente ser revelado y fotografiado.

7.7 Caracterización de las NPs

7.7.1 Determinación del tamaño de partícula y ZP

La determinación se realizó en el equipo Zetasizer PRO (Malvern Panalytical, Reino Unido) con 3 lecturas por muestra con un tiempo de exposición de 180 segundos, las muestras fueron colocadas en una celda de plástico modelo DTS1070 (Malvern, Reino Unido) e introducidas al equipo. Para esto se prepararon 150 µl de cada muestra que se aforó con agua inyectable para llenar la celda. Las NPs fueron preparadas manteniendo la proporción 1:1:1 entre el plásmido 0.064 µM, péptido P1 [0.2 µM] o P2 [0.5 µM] y quitosán 0.14%, condiciones ya establecidas. Se utilizó el programa Originlab 8 para exportar los datos que arrojo el ZetasizerPro y obtener los gráficos correspondientes.

7.7.2 Determinación de morfología

Se prepararon las NPs correspondientes al P1 y al P2 siguiendo la metodología anterior manteniendo la proporción 1:1:1 de plásmido – péptido – quitosán. Las muestras fueron colocadas en un porta muestras donde fueron secadas y se les dio un baño ionizante con oro. Las NPs fueron analizadas en el microscopio electrónico JEOL JSM-6060LV Scanning Electron Microscope (Jeol Inc., MA, USA) usando 20 Kv, ubicado en el CFATA, Juriquilla de la Universidad Nacional Autónoma de México.

7.8 Ensayos de transfección in vitro

Los ensayos de transfección se realizaron en líneas celulares HeLa y SiHa, proporcionadas por la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez, del Instituto Nacional de

Cancerología (Ciudad de México, México). Se sembraron 1.5×10^5 células por pozo en una placa de 24 pozos y fueron cultivadas en cubreobjetos estériles de 1 cm de ancho en medio DMEM suplementado con el 10% de suero fetal bovino (FBS) e incubadas a 37° C con un 5% de CO₂.

Llegando al 60% de confluencia, las NPs equivalentes a 10 µg de plásmido se diluyeron con 2 ml de medio de cultivo sin suplementar y se añadieron de esta forma a los pozos de las células tras el retiro del medio. Se mantuvo en incubación por 16 horas con las NPs, transcurrido este tiempo se retiró el tratamiento cambiando el medio por medio fresco suplementado con FBS al 10% y se dejó incubar por 48 horas más.

Al retirar el medio de cultivo se realizó la fijación con paraformaldehído (PAF) al 10% en PBS por 20 minutos. Pasado el tiempo de fijación, el PAF fue retirado de los pozos, y se realizó un lavado doble con buffer de fosfatos (PBS) para eliminar los residuos.

Posteriormente y de acuerdo con los resultados obtenidos se repitió el mismo procedimiento utilizando medio DMEM suplementado al 10% para la transfección.

7.8.1 Tinción de núcleos y citoesqueleto

Tras los lavados con PBS se permeabilizaron las células con Tritón X100 al 0.05% por 5 minutos, se lavó una vez más con PBS y fueron colocados 30 µl de faloidina rodaminada 1:150 por muestra. Estas fueron incubadas en la oscuridad por 20 minutos y lavadas con PBS. Posterior a esto se realizó el montaje con DAPI acoplado al medio de montaje y fueron sellados los cubreobjetos para la observación al microscopio de fluorescencia.

7.9 Ensayo de seguimiento de nanopartículas.

Previo a la formación de los complejos el plásmido 100 µg/ml se marcó con yoduro de propidio (PI) concentración final en el medio 10 µM y se mantuvo en agitación por 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Tras el marcaje del

plásmido para el seguimiento los complejos se ensamblaron las NPs siguiendo la misma metodología de coacervación compleja, descrita anteriormente.

Las células se cultivaron de la misma forma que en los ensayos *in vitro*, sin embargo, esta vez se utilizaron con una confluencia del 70 – 80%. Tras retirar el medio de cultivo fueron colocados los tratamientos y se realizó la fijación con PAF 10% en PBS a los 30 y 60 minutos de haber sido colocados. Los cubreobjetos fueron lavados con PBS 2 veces y se realizó la tinción con DAPI acoplado al medio de montaje para la observación al microscopio de fluorescencia.

8. Resultados

8.1 Aislamiento y propagación del plásmido pEGFP – N1

Posterior al uso del Qiagen Kit para la extracción del plásmido pEGFP- N1 se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 5) y se cuantificó y obtuvo el índice 260/280 mediante espectrofotometría con la finalidad de evaluar la pureza e integridad del plásmido pEGFP -N1.

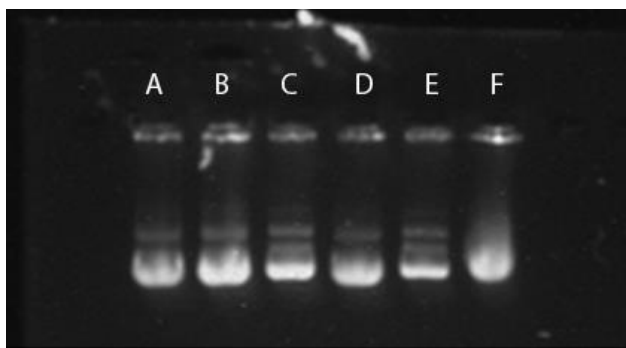


Figura 5: Gel de integridad del plásmido pEGFP – N1, agarosa al 1% tinción con GelRed. (A – F): alícuotas pertenecientes al mismo lote.

El índice 260/280 promedio fue 1.903 y en el gel se mostró que el plásmido se encontraba íntegro y con una población dominante en su forma superenrollada.

8.2 Restricción enzimática del plásmido

Con el fin de confirmar la identidad del plásmido, se realizó la linealización del plásmido. Con el mapa del plásmido obtenido con NEBcutter (Figura 6), se eligió utilizar *EcoRI* ya que tiene un sitio único de corte. El plásmido tiene una medida total de 4733 pb donde *EcoRI* corta en 629.

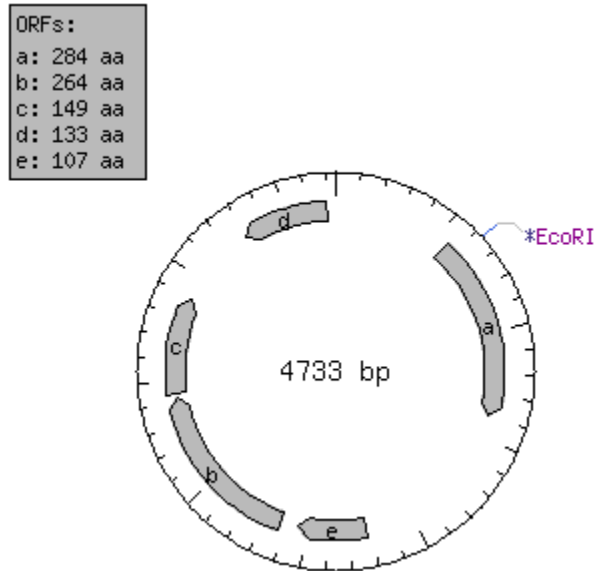


Figura 6: Mapa lineal del plásmido con los sitios de cortes para diferentes enzimas, obtenido de NEBcutter

La digestión con *EcoRI* formó una única banda, la cual migró en el gel de agarosa hasta encontrarse muy proxima a la banda de 4,000 pb, lo que confirmó la identidad del plásmido, mientras que en el carril del plásmido libre se observó una migración característica de un plásmido en forma superenrollada, con una mayor migración que la forma lineal.

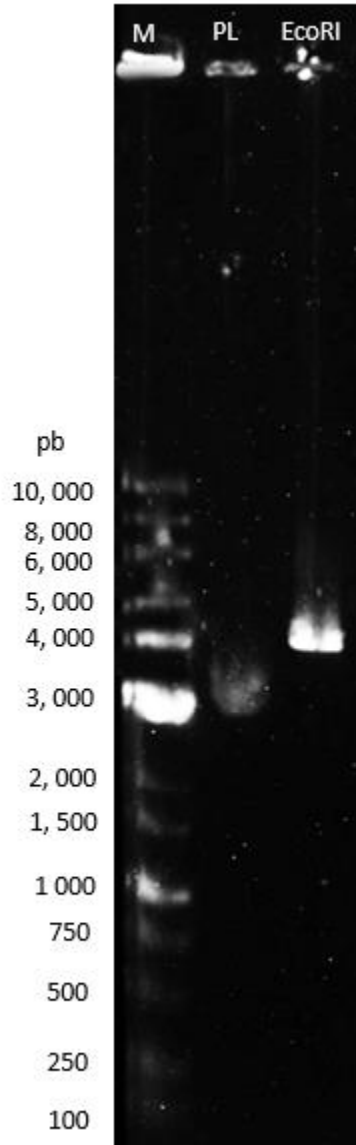


Figura 7:Gel de agarosa 1% tinción con GelRed de la digestión del plásmido. (M) marcador, (PL) plásmido libre super enrollado, digestión *EcoRI*.

8.3 Determinación de la concentración óptima de péptido con base en la migración electroforética

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para establecer la concentración óptima de péptido utilizando una concentración constante de plásmido (64 nM) y concentraciones crecientes de péptido. Se utilizó como parámetro el trazo de una

línea de referencia (recta azul) en el extremo superior de la banda correspondiente al plásmido libre que debía coincidir con la mitad de la banda del complejo péptido – plásmido (Figura 8). Previamente se ha reportado que la concentración óptima de péptido se puede definir como un retardo de la migración de los complejos de aproximadamente la mitad de la banda del plásmido libre (Hernández, 2012).

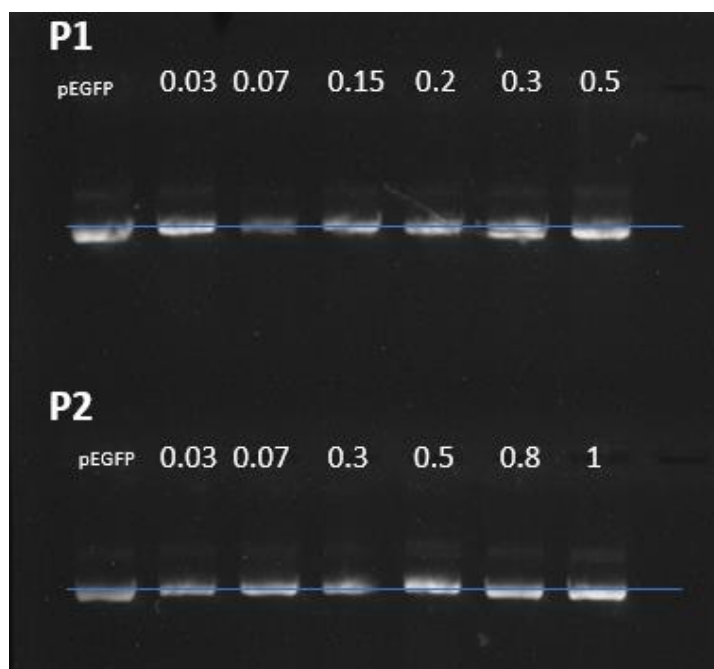


Figura 8:Ensayo de retardamiento para los complejos pEGFP – péptido utilizando una concentración constante de plásmido [64 nM] y concentraciones crecientes de péptido [μM]. P1: péptido 1, P2: péptido 2. Gel de Agarosa al 1%, tinción GelRed.

En el ensayo se observó el comportamiento esperado en las muestras donde el incremento en la concentración del péptido es directamente proporcional al retardo en la migración. A partir de este ensayo y siguiendo el criterio reportado previamente, a partir del trazo de la línea se consideraron como concentraciones óptimas de trabajo [0.2 μM] para el P1 y [0.5 μM] para el P2.

8.4 Determinación de la concentración óptima de quitosán por retención electroforética

Las NPs para este ensayo se prepararon con las concentraciones de péptido determinadas en el ensayo de retención anterior (Figura 8) y con concentraciones

crecientes de quitosán (%). Estas se cargaron en el gel con el objetivo de determinar la concentración óptima de quitosán analizando la retención en la migración y el encapsulamiento del plásmido.

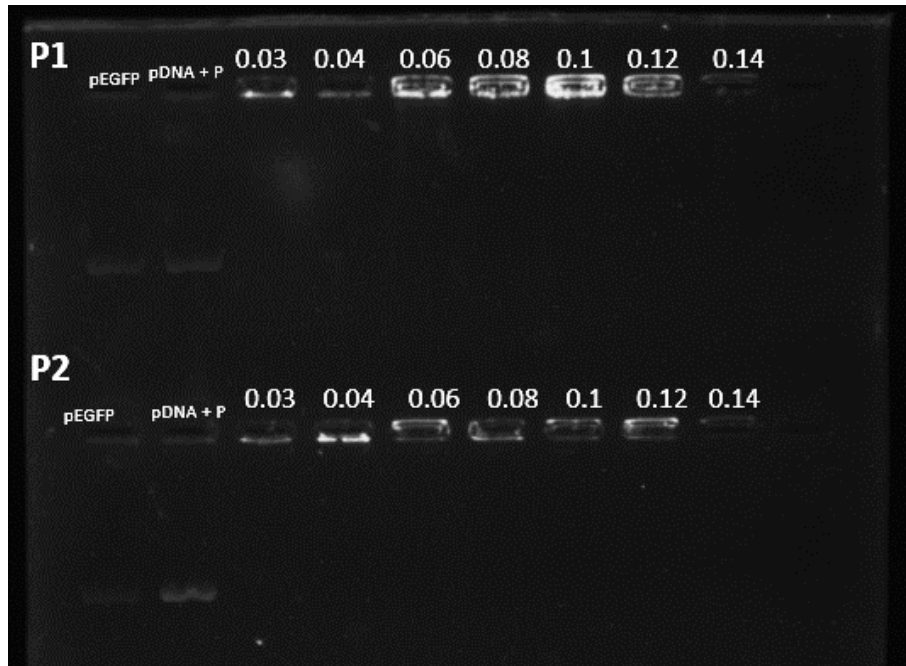


Figura 9: Ensayo de retención de las NPs a diferentes concentraciones (%) de quitosán. En el primer carril se colocó el plásmido libre, en el segundo una mezcla 1:1 del plásmido [64 nM] con el péptido a la concentración correspondiente y en los carriles contiguos. Gel de agarosa 1% tinción GelRed.

Se observó que todas las concentraciones de quitosán retienen la migración del DNA, manteniéndolo dentro del pocillo, mientras que con la concentración de 0.14% el DNA además de no migrar no pudo ser observado (*Figura 9*).

8.5 Caracterización de las nanopartículas

8.5.1 Determinación de tamaño de partícula

Para la determinación del tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS) se utilizó el instrumento ZetaSizer Pro, con una $n = 3$. Los datos arrojados fueron procesados en el software Origin 8 y se obtuvieron los siguientes tamaños: 218 ± 18 nm para las NPs control sin péptido, 300 ± 20 nm en el caso del P1 y 221 ± 19 nm para el P2 (Figuras 10 y 11).

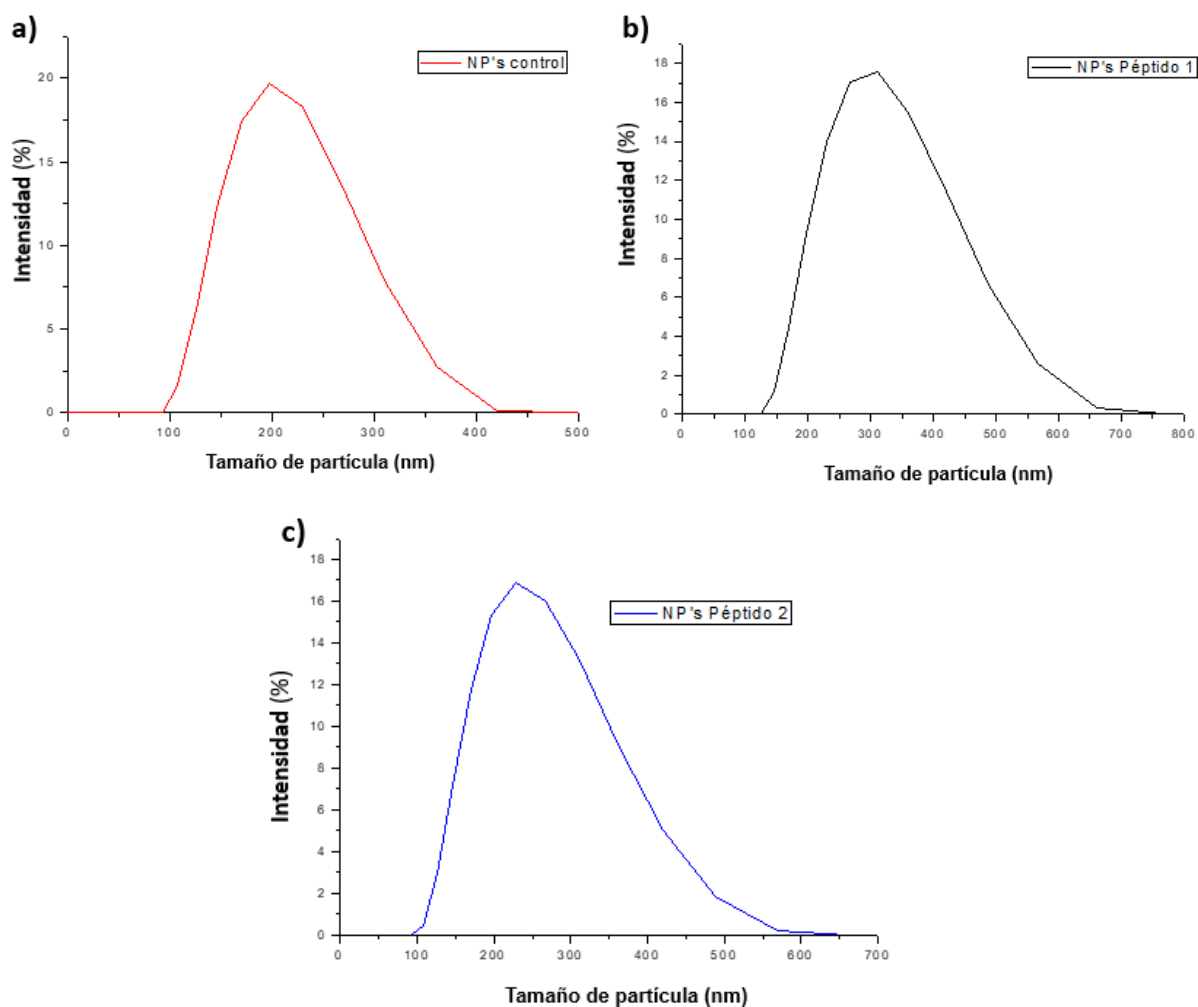


Figura 10: Gráficos representativos de tamaño de partícula. (a) NPs control, (b) NPs con P1, (c) NPs con P2.

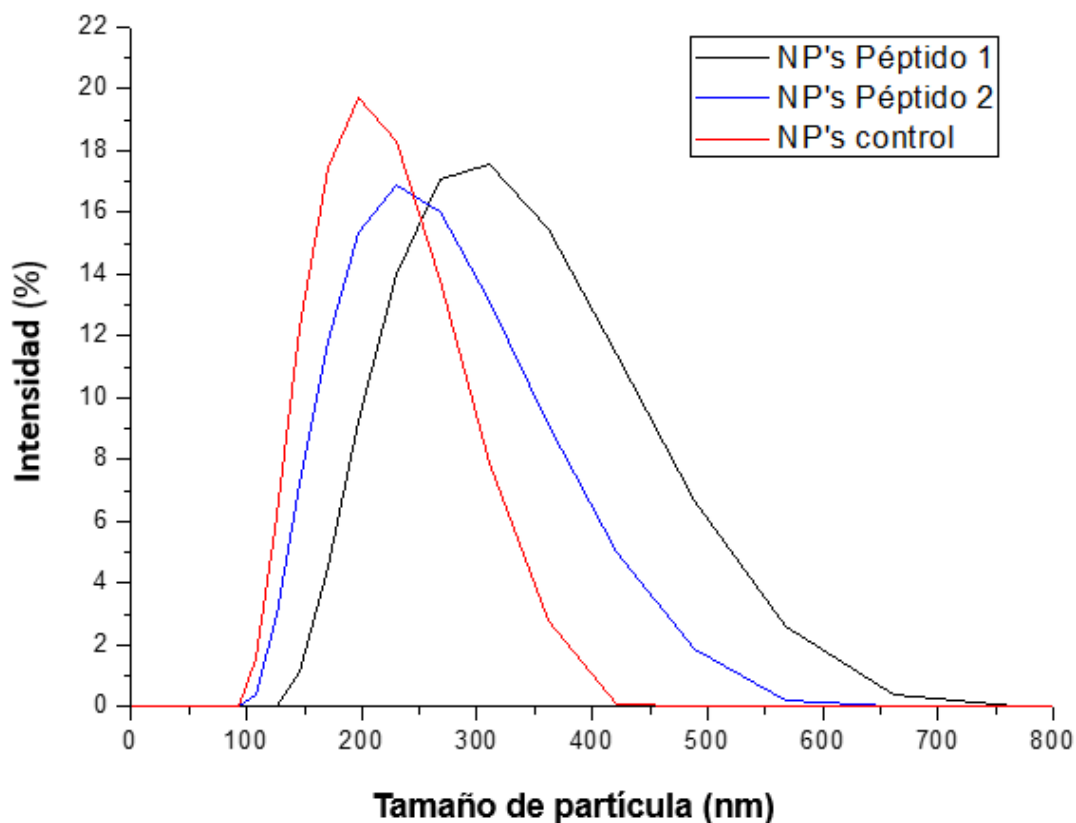


Figura 11: Grafico comparativo de los tamaños de partícula obtenidos para las diferentes muestras.

8.5.2 Determinación de ZP

Las mediciones para ZP se realizaron mediante movilidad electroforética acoplada a Láser Doppler utilizando el instrumento ZetaSizer Pro. De la misma forma, fueron procesadas en el software Orgin Pro 8 donde se obtuvieron las siguientes mediciones correspondientes a los picos de intensidad; para las NPs control se determinó un ZP de 19.64 ± 1.2 mV, para las NPs con P1 fue de 19.69 ± 1.3 mV y finalmente, para las NPs con P2 se obtuvo un valor de 20.76 ± 1.4 mV (Figuras 12 y 13).

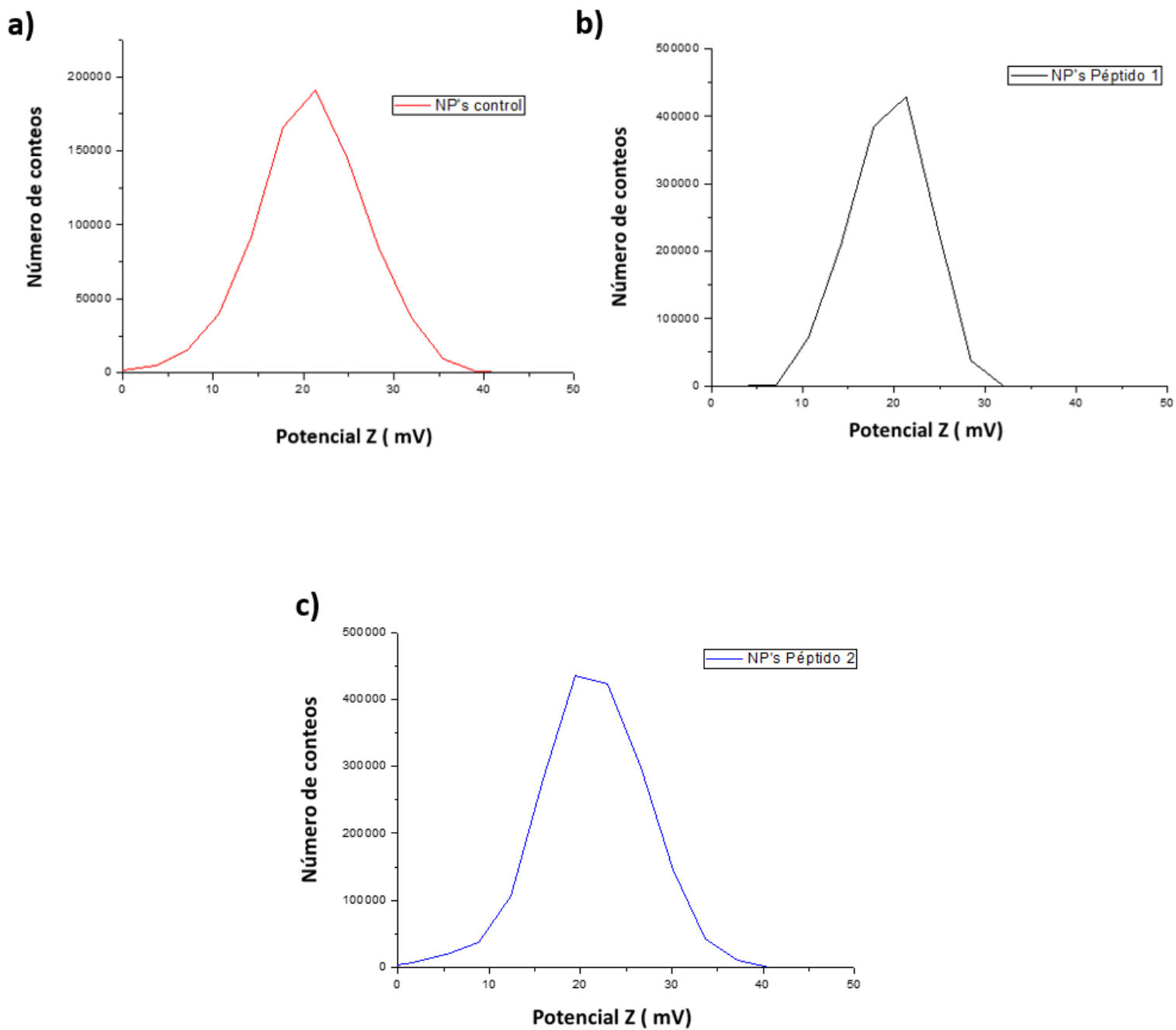


Figura 12: Gráficos representativos de ZP. (a) NPs control, (b) NPs con P1, (c) NPs con P2.

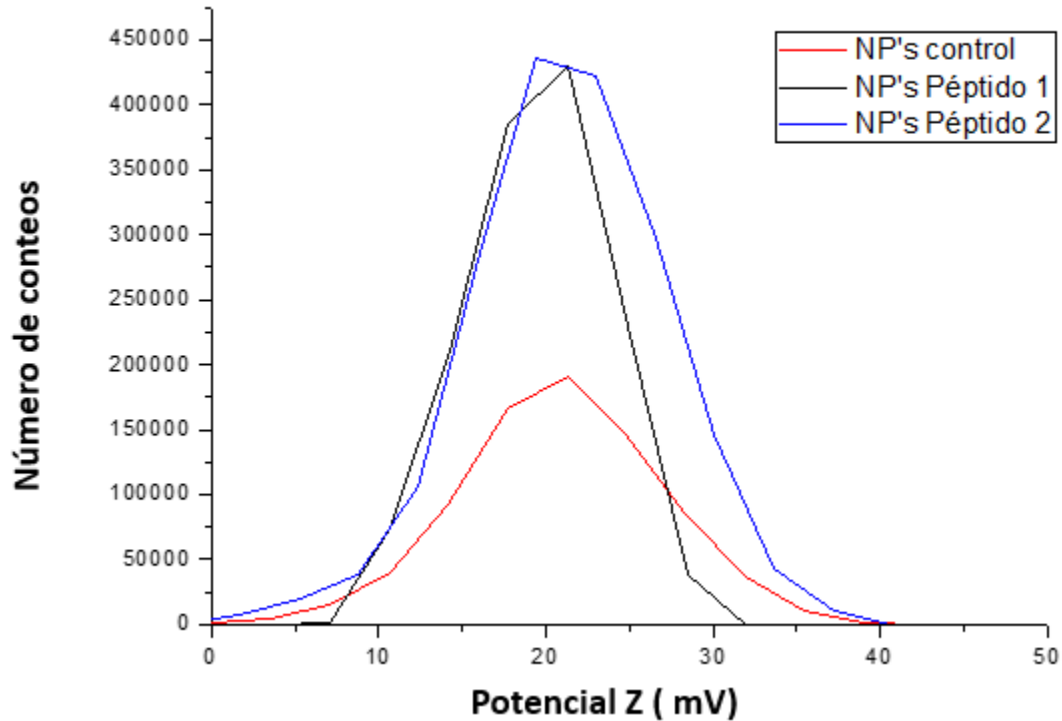


Figura 13: Gráfico comparativo del ZP obtenido para las diferentes muestras.

8.5.3 Índice de polidispersión (PId)

Durante la medición de tamaño y ZP también se recopiló el PIId de cada uno de los grupos de NPs, obteniéndose los valores mostrados en la Tabla 1, donde se considera una muestra monodispersa cuando $PIId \leq 0.1$ (Clayton, 2016) y una muestra heterogénea donde se descarta el DLS con $PIId > 0.7$ (Danaei, 2018).

PIId	
NP's control	0.105 ± 0.038
NP's P1	0.213 ± 0.03
NP's P2	0.078 ± 0.018

Tabla 1: Índice de polidispersión de cada sistema

8.5.4 Análisis Estadístico de los datos de tamaño de partícula y ZP

Con la finalidad de establecer si existen diferencias significativas entre los valores tanto de tamaño como de ZP entre los grupos de NPs, se realizó una prueba *T* de *Student* para cada una de las características analizadas con un valor $\alpha = 0.05$. Para el tamaño de partícula se encontró que no hay diferencia significativa entre el tamaño de las NPs control y las formuladas con el P2, mientras que las NPs formuladas con el P1 poseen tamaños significativamente mayores que aquellas formuladas con el P2 y el control sin péptido (Tabla 2).

	Tamaño de partícula (nm)	P(T<=t) dos colas	Interpretación
NPs control	218 ± 18	0.00655295	Existen diferencias significativas. P < 0.05
NPs P1	300 ± 20		
NPs control	218 ± 18	0.8373244	No existen diferencias significativas. P > 0.05
NPs P2	221 ± 19		
NPs P1	300 ± 20	0.00826766	Existen diferencias significativas. P < 0.05
NPs P2	221 ± 19		

Tabla 2: Análisis estadístico e interpretación de la prueba *T* de *Student* para el tamaño de partícula.

En el caso del ZP las mediciones no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos, por lo que las mediciones son similares en todas las NPs ensambladas como se muestra en la Tabla 3.

	ZP (mV)	P(T<=t) dos colas	Interpretación
NPs control	19.69 ± 1.3	0.6213869	No existen diferencias significativas. P > 0.05
NPs P1	19.64 ± 1.2		
NPs control	19.69 ± 1.2	0.1920518	No existen diferencias significativas. P > 0.06
NPs P2	20.76 ± 1.4		
NPs P1	19.64 ± 1.2	0.2340000	No existen diferencias significativas. P > 0.07
NPs P2	20.76 ± 1.4		

Tabla 3: Análisis estadístico e interpretación de la prueba *T de Student* para el ZP

Para finalizar, el último parámetro analizado fue el índice de polidispersión, que indica el grado de homogeneidad en una muestra, donde se encontró que el P2 genera menor dispersión en los tamaños que el P1 y el control, y a su vez, el P1 aumenta la polidispersión (PI_d) en las muestras, todo de forma estadísticamente significativa (Tabla 4).

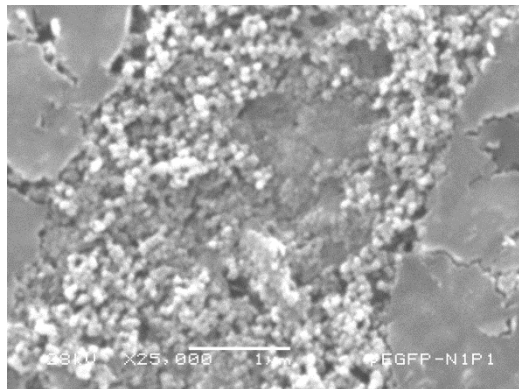
	PI _d	P(T<=t) dos colas	Interpretación
NPs control	0.105 ± 0.038	0.043918	Existen diferencias significativas. P < 0.05
NPs P1	0.213 ± 0.03		
NPs control	0.105 ± 0.038	0.0003182	Existen diferencias significativas. P < 0.05
NPs P2	0.078 ± 0.018		
NPs P1	0.213 ± 0.03	0.049723	Existen diferencias significativas. P < 0.05
NPs P2	0.078 ± 0.018		

Tabla 4: Análisis estadístico e interpretación de la prueba *T de Student* para el PI_d

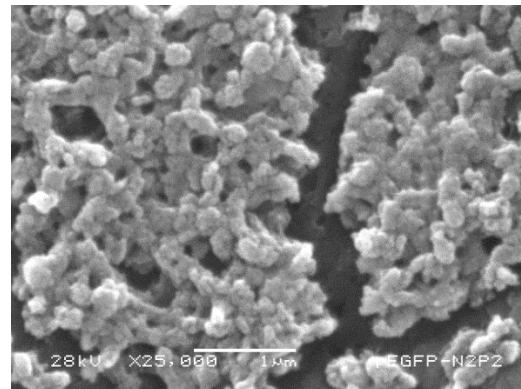
8.5.5 Morfología

Para la determinación de morfología de las NPs por microscopía electrónica de barrido, se analizaron las muestras de NPs preparadas con el P1 y las preparadas

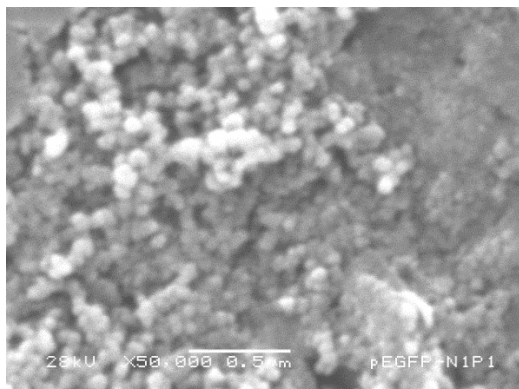
con el P2. El menor de los aumentos utilizado fue de 25000x, donde se observa desde el inicio que las NPs preparadas con el P2 tienen menor aglomeración, y en ambos casos presentan forma esférica (Tabla 5).



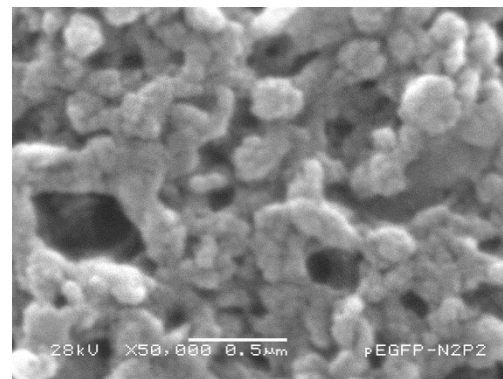
NPs P1 a 25,000x



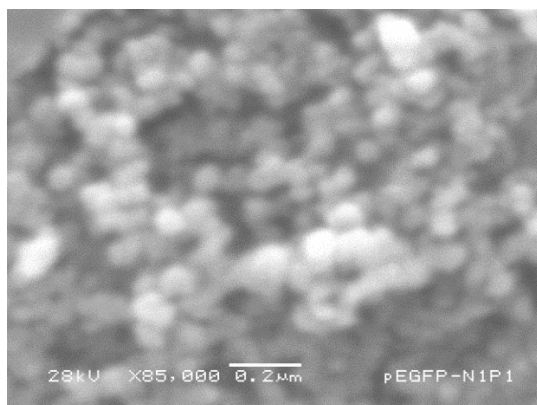
NPs P2 a 25,000x



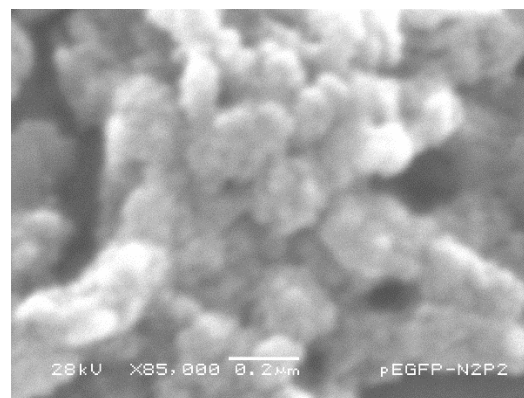
NPs P1 a 50,000x



NPs P2 a 50,000x



NPs P1 a 85,000x



NPs P2 a 85,000x

Tabla 5: Microfotografías (SEM) de las NPs a diferentes aumentos

8.6 Ensayos de transfección *in vitro*

El primer ensayo de transfección se realizó en células SiHa a un 60% de confluencia, a las cuales se les adicionó de forma directa las NPs a los pozos con medio libre de FBS, donde se presentó un vire pronunciado del indicador del rosado a amarillo y posteriormente se añadió HEPES para corregir el pH. En filtro FITC no se encontró fluorescencia correspondiente a transfección. Se utilizaron dos muestras de quitosán con diferentes pesos moleculares (20.6 kDa y 50.5 kDa), para observar los efectos de este sobre las células (Figura 14).

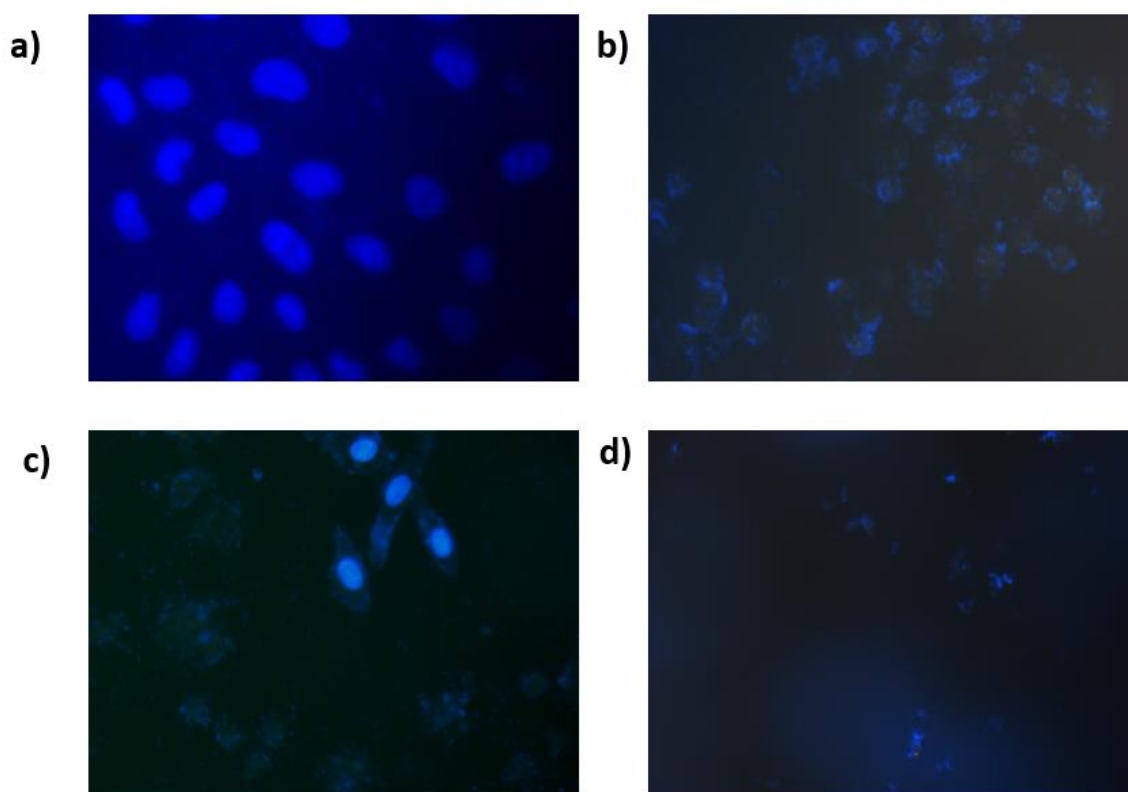


Figura 14: 1er Ensayo de Transfección. Células SiHa DAPI 20x (a) Control sin Tx. (b) Control con únicamente pEGFP – N1. (c) NPs con quitosán de 20.6 kDa. (d) NPs con quitosán de 57.5 kDa.

Se planteó un segundo ensayo de transfección, donde en vez de colocar las NPs directamente en los pozos fueron previamente diluidas en 1 ml de medio fresco sin suplementar y después de unos minutos fueron añadidas a los pocillos que contenían 1 ml de medio fresco, manteniendo un volumen total del 2 ml de medio

por pocillo. No se observó un vire del indicador pronunciado, manteniéndose en tonos violetas. Durante la microscopía también fue observado utilizando el filtro FITC, sin embargo, no se encontró ninguna fluorescencia que señalara transfección. Además de DAPI, se realizó tinción de citoesqueleto con Faloidina Rodaminada (Figura 15).

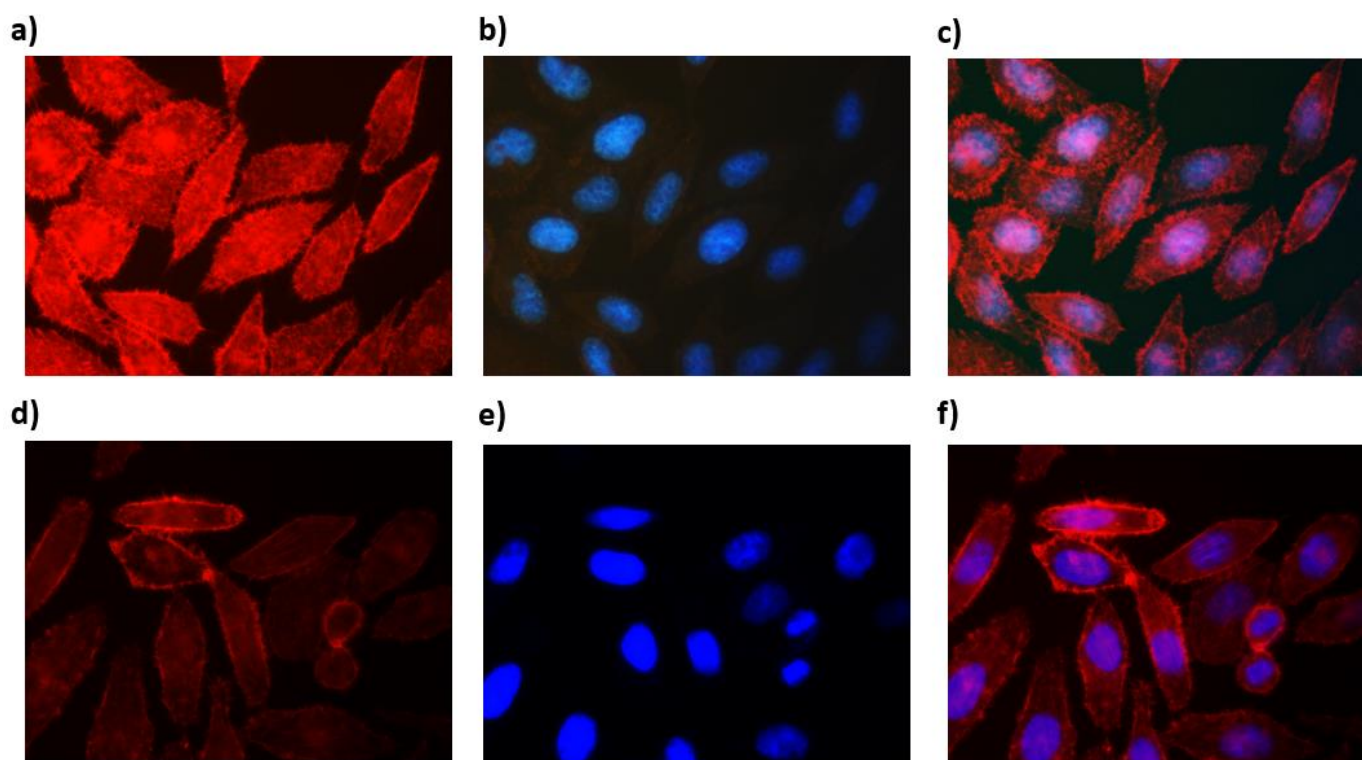


Figura 15: 2do Ensayo de Transfección. Células SiHa 40x sin Tx. (a) Células sin Tx filtro RH. (b) Células control sin Tx filtro DAPI. (c) Montaje de imagen células sin Tx. (d) Control pEGFP - N1 filtro RH, (e) Control pEGFP - N1 DAPI, (f) Montaje de imagen células control con pEGFP - N1.

En el segundo ensayo también fueron probadas NPs de bajo peso molecular 20.6 kDa y alto peso molecular 57.5 kDa, ambas sin péptidos cariofílicos para observar los efectos del quitosán por sí sólo en las células. De la misma forma que con las laminillas de muestras anteriores, se observó en el filtro FITC donde se encontró fluorescencia no correspondiente a células, ya que no hubo una colocación de la proteína verde fluorescente con superficies celulares (Figuras 16 y 19).

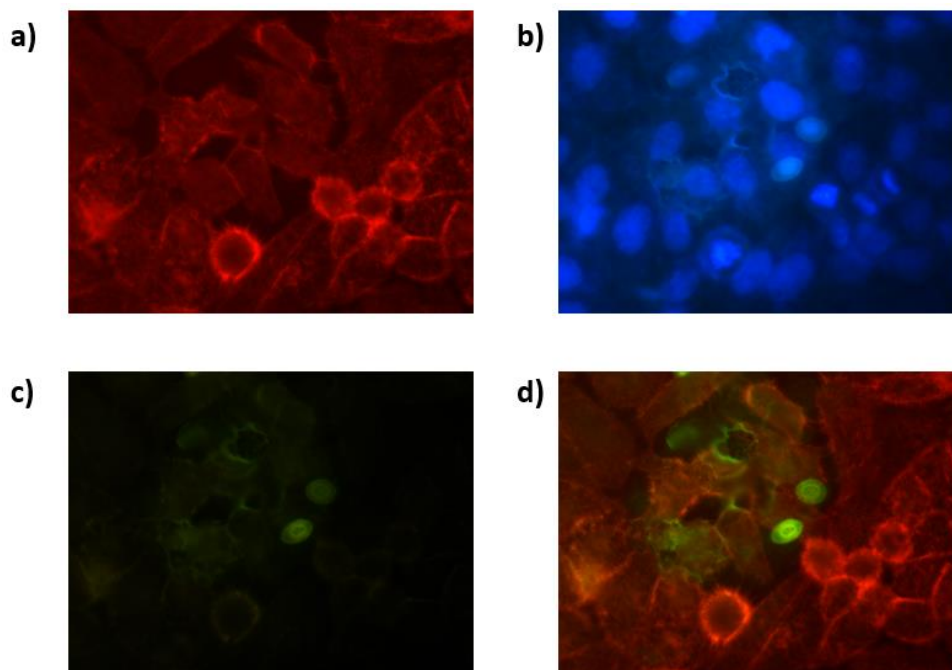


Figura 16: 2do Ensayo de transfección. Células SiHa 40x tratadas con NPs quitosán de 20.6 kDa sin péptidos. (a) Filtro RH, (b) Filtro DAPI, (c) Filtro FITC, (d) Montaje de las imágenes.

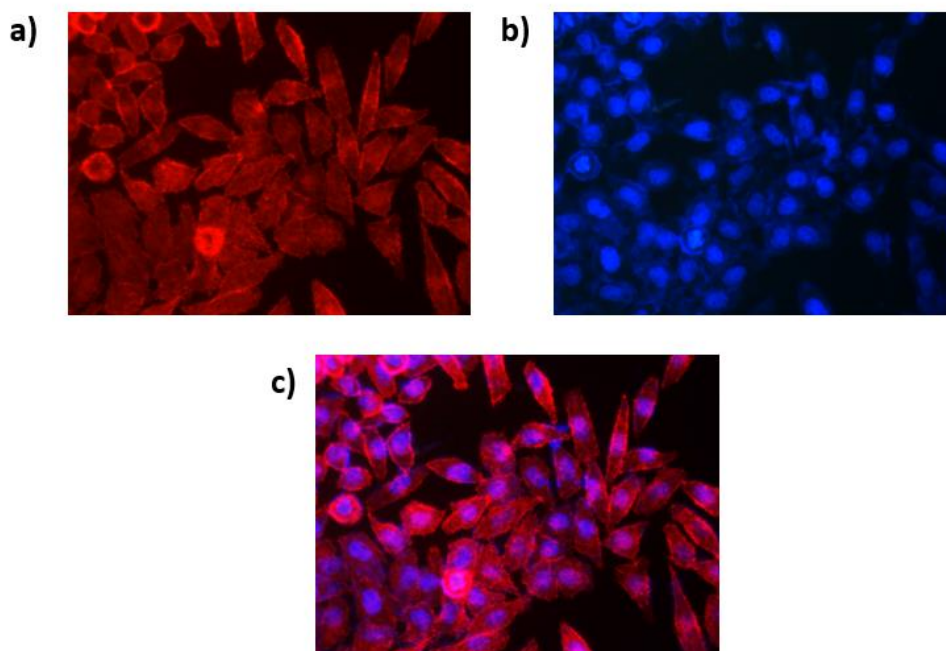


Figura 17: 2do Ensayo de Transfección. Células SiHa 20x adicionadas con NPs preparada con quitosán de 57.5 kDa sin péptidos. (a) Filtro RH, (b) Filtro DAPI, (c) Filtro FITC, (d) Montaje de las imágenes.

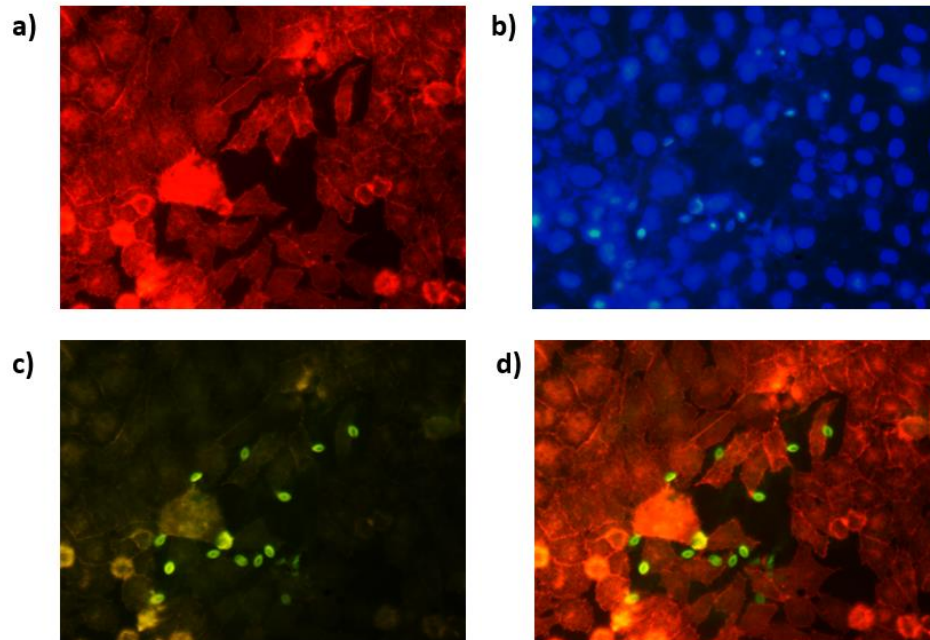


Figura 18: 2do Ensayo de Transfección. Células SiHa 20x tratadas con NPs con P1. (a) Filtro RH, (b) Filtro DAPI, (c) Filtro FITC, (d) Montaje de las imágenes.

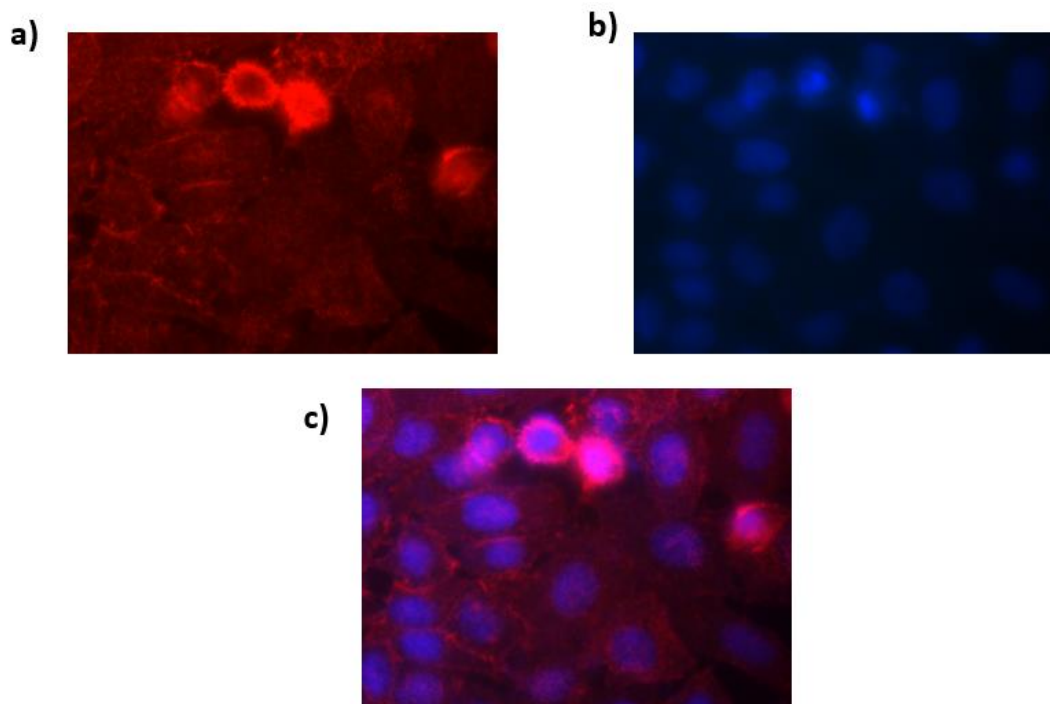


Figura 19: 2do Ensayo de Transfección. Células SiHa 40x tratadas con NPs con P2. (a) Filtro RH, (b) Filtro DAPI, (c) Montaje de las imágenes.

Con los resultados obtenidos se planteó una modificación más para el tercer ensayo, esta vez las NPs se diluyeron en 2 ml de medio DMEM con FBS 10% y se trabajó en células HeLa. Como controles se utilizaron las NPs de quitosán de 57.5 kDa y 20.6 kDa, se observó mayor transfección con el quitosán de bajo peso encontrando varias células por campo (Figura 21), mientras que en alto peso las células eran 1 – 2 por campo (Figura 20).

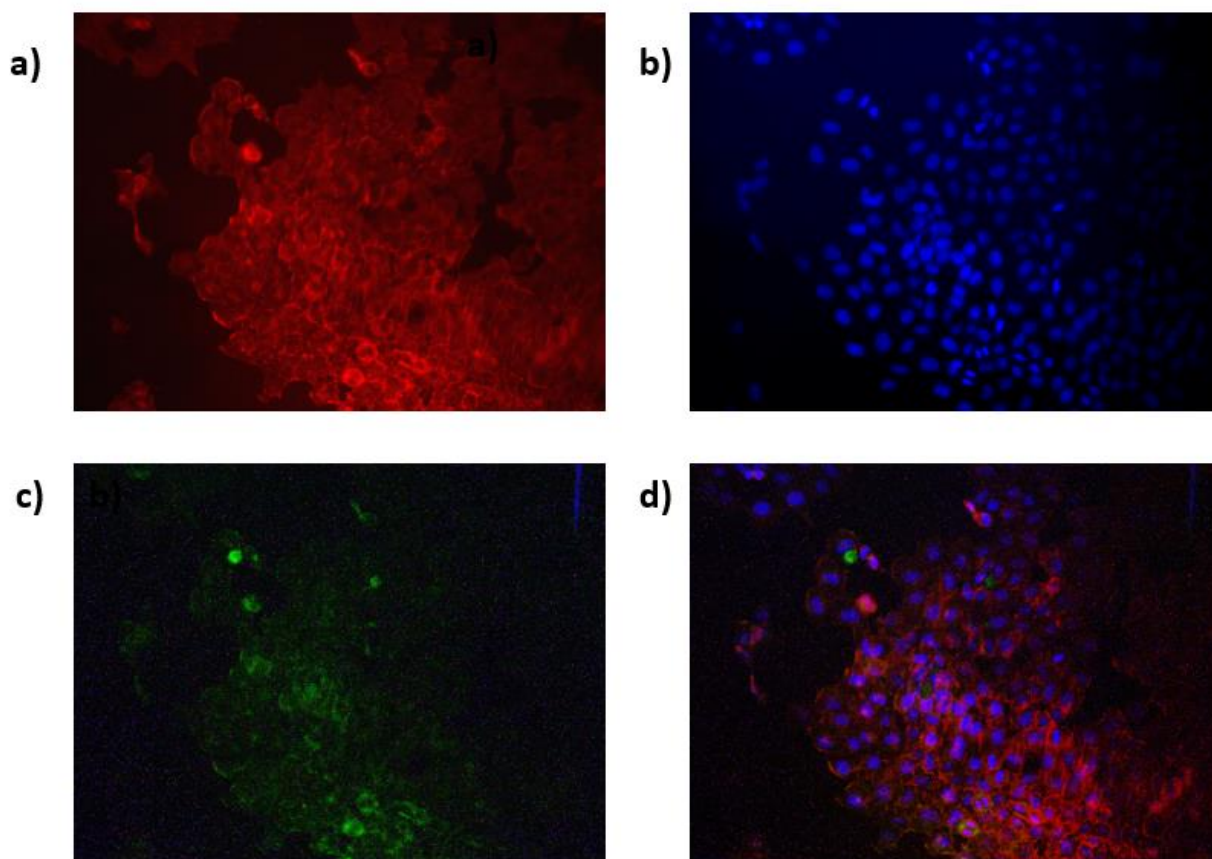


Figura 20: 3er Ensayo de Transfección. Células HeLa 20x tratadas con NPs 57.5 kDa (a) Filtro RH, (b) Filtro DAPI, (c) Filtro FITC, (d) Montaje de las imágenes.

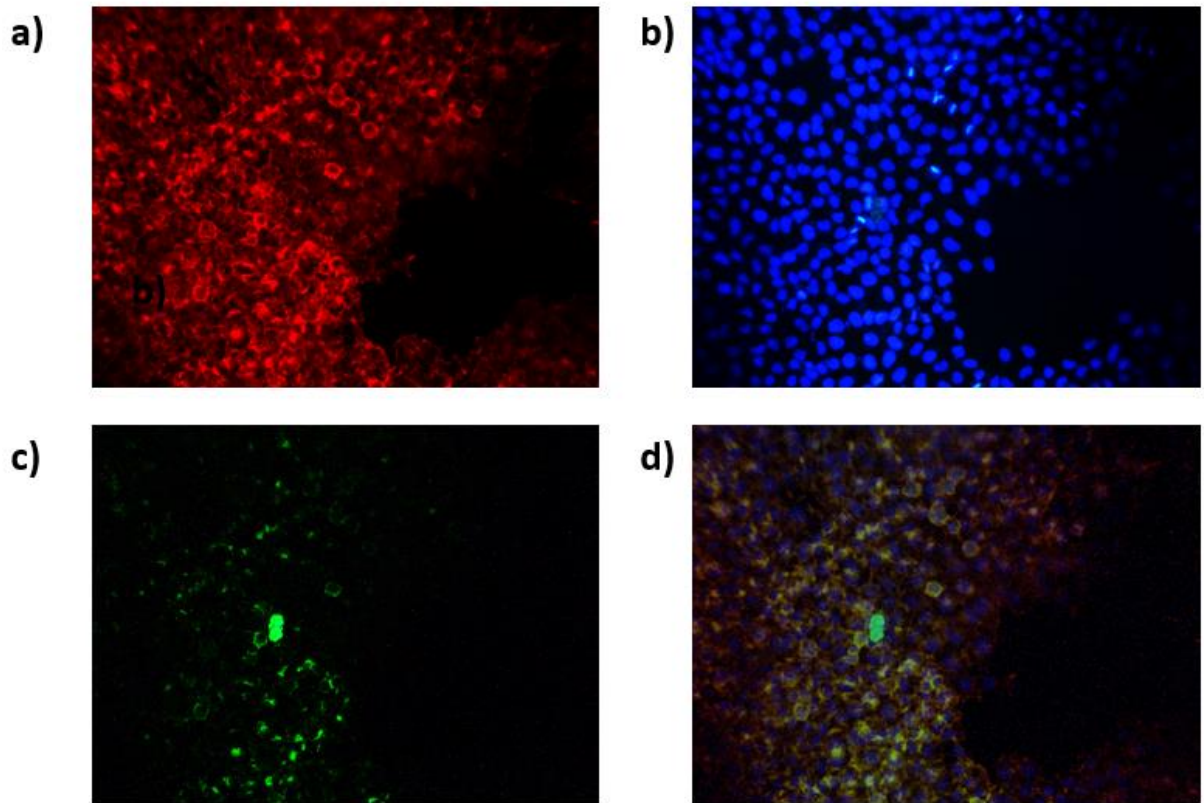


Figura 21: 3er Ensayo de Transfección. Células HeLA 20x tratadas con NP's 20.6 kDa (a) Filtro RH, (b) Filtro DAPI, (c) Filtro FITC, (d) Montaje de las imágenes.

En el caso de la transfección con NPs acopladas a péptidos cariofílicos, el P2 (Figura 23) mostro un mayor número de células transfectadas por campo en comparación con el P1 (Figura 22), donde la transfección fue apenas de 1 a 2 células por campo, similar a la obtenida con alto peso molecular de quitosán (57.5 kDa) mientras que en el caso el P2 los campos mostraban mayor cantidad de células transfectadas. Toda fluorescencia correspondía a células.

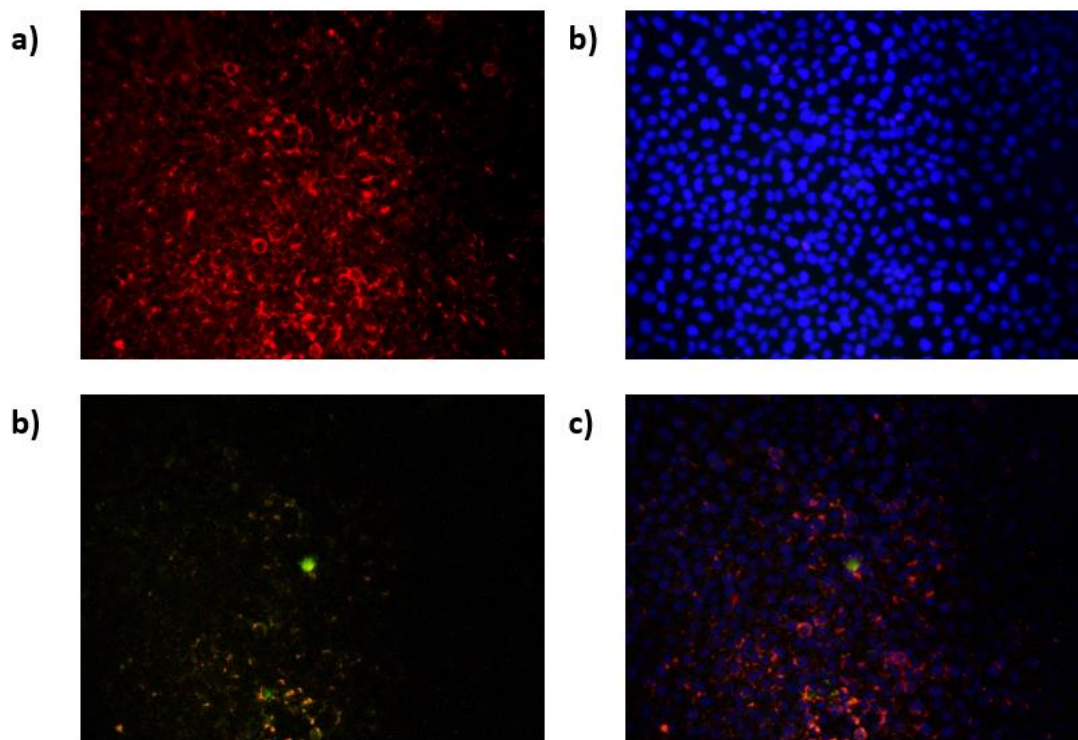


Figura 22: 3er Ensayo de Transfección. Células HeLa 20x tratadas con NPs P1. (a) Filtro RH, (b) Filtro DAPI, (c) Filtro FITC, (d) Montaje de las imágenes.

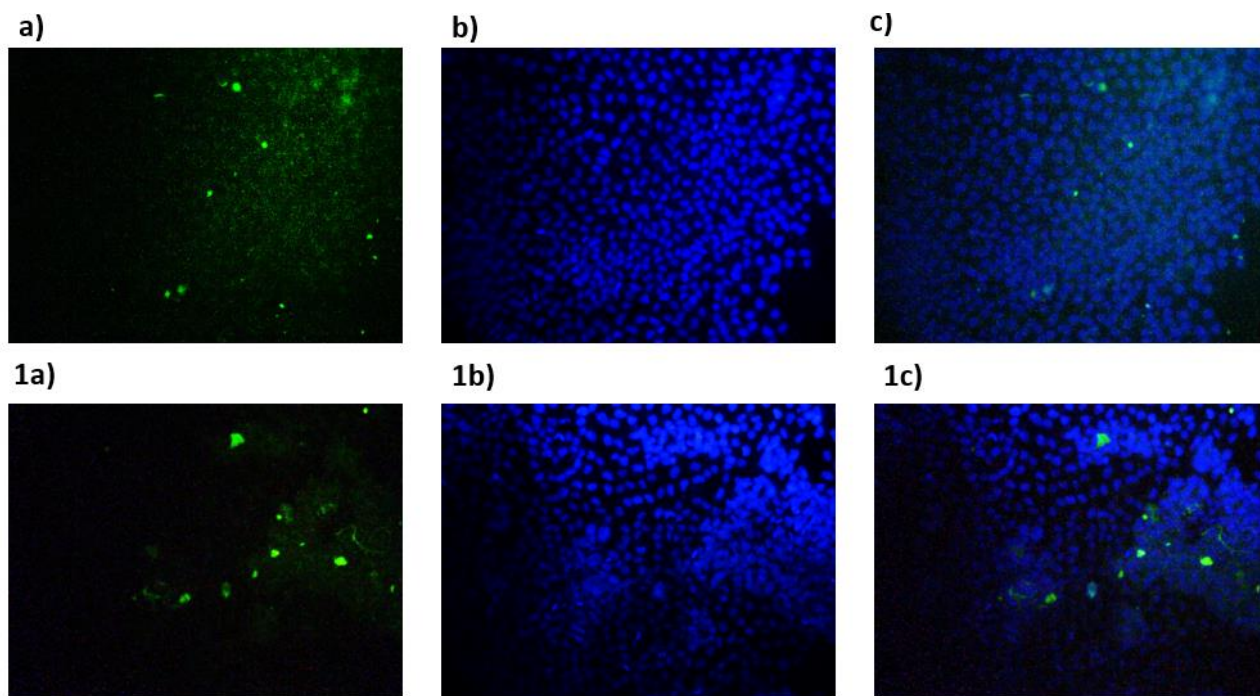


Figura 23: 3er Ensayo de Transfección. Células HeLa 20x tratadas con NPs P2. 1a, 1b y 1c corresponden a un campo diferente. (a y 1a) Filtro FITC, (b y 1B) Filtro DAPI, (c y 1c) Montaje de las imágenes.

8.7 Ensayo de Internalización de NPs con Yoduro de Propidio

Tanto las NPs con P1 como las del P2 fueron fijadas a los mismos tiempos, transcurridos 30 y 60 minutos después de la aplicación de las NPs, siguiendo el mismo protocolo de fijación y montaje con DAPI que en todas las laminillas. Se encontró que para ambos péptidos las NPs logran penetrar la célula aproximadamente en 30 minutos y localizarse en el espacio citoplasmático, mientras que a los 60 minutos el marcaje del plásmido coincide con el núcleo (Figura 24 y 25).

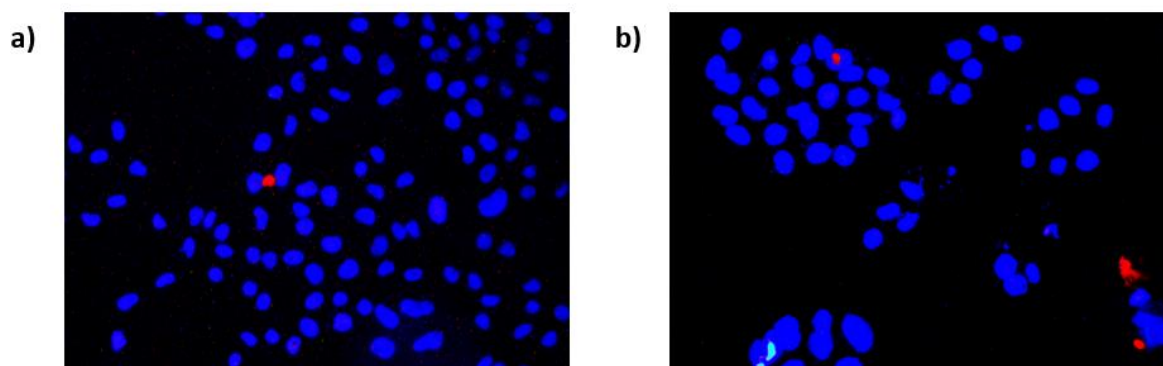


Figura 24: Ensayo de Internalización NPs P1. Los puntos rojos señalan la ubicación del plásmido, 20x. (a) NPs P1 a 30 min, (b) NPs P1 a 60 min.

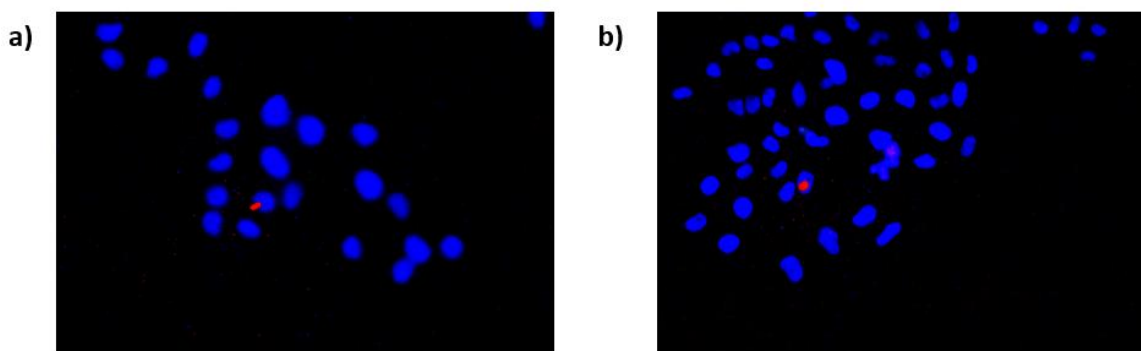


Figura 25: Ensayo de Internalización NPs P2. Los puntos rojos señalan la ubicación del plásmido, 20x. (a) NPs P2 a 30 min, (b) NPs P2 a 60 min.

Discusión de resultados

Como se mencionó inicialmente, para el diseño de NPs aplicadas a la terapia génica se requiere esencialmente de dos componentes; el material genético que se desea entregar y el vector, que al acoplarse prometen efectuar la acción correctiva o terapéutica en la célula. Para el desarrollo de este trabajo se decidió utilizar como primer componente el plásmido pEGFP – N1 ya que este codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) y permite la evaluación de la transfección *in vitro* de manera más sencilla, actuando como gen reportero que permita establecer condiciones de trabajo para el posterior uso de un gen terapéutico. Y, como segundo componente se utilizó el quitosán, ya que posee muchas ventajas opacadas por la baja eficiencia de transfección, por lo que el acoplamiento de péptidos cariofílicos al diseño final de la nanopartícula lo podría volver un vector ideal aumentando la transfección, sin los efectos inmunológicos y citotóxicos presentes en un vector viral, además de resultar más accesible en cuanto producción.

Obtención y purificación del plásmido pEGFP - N1

Teniendo en cuenta la importancia de ambos componentes, el primer paso para la construcción de las NPs fue la obtención del plásmido con alto grado de pureza e integridad. El aislamiento se realizó a través de un kit comercial basado en la lisis alcalina acoplado al uso de columnas cromatográficas, ya que el método de extracción puede influir directamente en la entrega mediada por polímeros y lípidos catiónicos, la actividad biológica y la estabilidad del plásmido (De la Vega, 2013).

La presencia de nucleasas puede afectar la estabilidad del plásmido; impurezas aniónicas como DNA genómico o lipopolisacáridos, así como residuos proteicos cambian la morfología de los complejos ensamblados a base de compuestos catiónicos, así como el tamaño final. Por otro lado, el método de obtención también será un factor que determine la proporción del pDNA superenrollado

biológicamente activo en el producto final y/o alterar irreversiblemente la conformación general además de su estabilidad, pues a mayor compactación el plásmido se encontrará mayormente protegido del medio y será mejor encapsulado por el agente catiónico, teniendo un efecto directo sobre la eficiencia de transfección (De la Vega, 2013).

Con todo esto en mente se obtuvo el índice $260/280 = 1.91$, que se encuentra dentro del rango de pureza óptima de $1.8 - 2$ (Banco Nacional de DNA Carlos III, 2020), de la misma forma se realizó un gel de integridad (*Figura 5*) donde se identificó que el plásmido se encontraba íntegro, además de que la mayor proporción en las alícuotas pertenecía al plásmido superenrollado correspondiente a la banda de mayor intensidad en el gel de agarosa, recordando que la forma supercompacta migra con mayor facilidad entre los poros del gel de agarosa.

Finalmente, como medida extra se planteó linealizar el plásmido e identificarlo de acuerdo con su tamaño. Para esto se utilizó *EcoRI* ya que cuenta con un único sitio de corte dentro de la secuencia, a las 629 pb. Como se esperaba *EcoRI* realizó el corte en su sitio de restricción y permitió la confirmación de la identidad del plásmido por la obtención de un único fragmento lineal con una longitud de 4,733 pb que se ubicó alrededor de la marca de las 4,000 pb en el carril de marcador en el gel de agarosa.

Ensayos de retardamiento de la migración para los complejos péptido / pEGFP – N1

El objetivo de los ensayos de retardamiento fue observar los efectos de los péptidos cariofílicos sobre el plásmido y con ello elegir una concentración óptima para el ensamblaje. Una de las características de los péptidos cariofílicos es su carga neta positiva que permite la interacción electrostática con el plásmido para la formación de ensamblajes supramoleculares (Wang, 2019).

Dicho tipo de ensamblajes presentan la ventaja de no ser enlaces de tipo covalente por lo que no tienen efectos sobre la funcionalidad del plásmido. Sin embargo, es de suma importancia no saturar dichas cargas negativas, pues al

utilizar de la misma forma un polímero catiónico que forma poliplejos por interacción electroestática, una saturación de las cargas negativas del plásmido evita el encapsulamiento del plásmido por el quitosán, dejándolo expuesto a la degradación e imposibilitando la entrada a la célula. Para mantener un equilibrio entre las cargas se estudió qué cantidad se debía utilizar, donde la literatura señala que con base en la extensión del péptido cariofílico, y del plásmido, las concentraciones ideales se localizan en un intervalo de 0.5 – 15 de ratio N/P, es decir el cociente entre la concentración de grupos amino o de péptido y la concentración de grupos fosfatos o del plásmido (Opanasopit, 2009).

Establecida una concentración constante de 64 nM del plásmido, se probaron concentraciones que dieran como resultado ratios dentro del intervalo establecido a partir de la revisión bibliográfica de diversos artículos donde se utilizaban péptidos cariofílicos (Yin, 2012).

En cuanto al parámetro utilizado para la elección de la concentración óptima de péptido fue aquella concentración molar que lograra la retención un equivalente a la mitad de la banda del plásmido libre, una retención mayor impide la formación del poliplejo debido a la ausencia de la interacción electroestática y una menor retención señala una cantidad insuficiente de péptido cariofílico para ejercer su efecto (Hernández, 2012).

Respecto a los péptidos, desde el primer ensayo comienzan a observarse diferencias importantes, ya que a una concentración de plásmido constante la concentración óptima cambió en función del péptido manejado, mientras que en el P1 se seleccionó 0.2 μM en el P2 se optó por 0.5 μM con un ratio N/P de 3 y 8 respectivamente. Teniendo en consideración la longitud de las secuencias de aminoácidos de cada uno de los péptidos (Péptido 1: 13 aa, Péptido 2: 9 aa), es posible correlacional la longitud de la secuencia con la cantidad necesaria para causar la retención buscada, a mayor extensión de la secuencia del péptido la carga positiva aportada por cada aminoácido incrementa lo que satura una mayor cantidad de cargas negativas del plásmido por lo que requieren menores o mayores concentraciones de péptido en función de su longitud. Teniendo claros

los puntos anteriores se puede señalar que durante el acoplamiento de péptidos cariofílicos para la formación de complejos se debe tener en cuenta tanto el ratio N/P que expresa la relación molar entre los elementos cargados, como la extensión de la secuencia y carga de aminoácidos.

Ensayos de retención para complejos plásmido – péptido – quitosán

Aun cuando los ensayos de retención y de retardamiento se realizan de la misma manera, su objetivo es distinto; de ahí el cambio de nombre. En el primero se analiza la retención de la migración a causa de una disminución de la carga negativa por la interacción con los péptidos cariofílicos, mientras que el ensayo de retención tiene como objetivo observar el encapsulamiento completo del plásmido por el quitosán reteniendo el mismo en el pozo. En los ensayos realizados la concentración de 0.14% de quitosán fue tomada como la óptima de trabajo, pues en el gel (*Figura 8*) se puede notar cómo el pozo correspondiente a esta concentración no se encuentra iluminado, como si no se hubiese colocado la muestra y esto se debe a que el encapsulamiento es tan completo que el GelRed no puede actuar como intercalante de DNA para emitir fluorescencia y por ende nos habla de la protección total que ejerce el quitosán sobre el plásmido ante la acción de nucleasas, manteniéndolo funcional para el envío de genes (Santos – Carballal, 2018).

De esta forma, tanto la concentración a utilizar de quitosán como la de péptidos fueron establecidas para el resto del trabajo, pues bajo estas elecciones las NPs deberían tener las propiedades fisicoquímicas y biológicas requeridas para una transfección exitosa.

Caracterización de las nanopartículas

Con el objeto de conocer las características físicas de las NPs se analizaron cuatro parámetros: el tamaño de partícula, índice de polidispersión, ZP y morfología, donde para cada uno de estos parámetros se ha observado que se mantiene una relación directa con la funcionalidad biológica del sistema. Las NPs preparadas para todas estas determinaciones se realizaron siguiendo

exactamente la misma metodología y sin ninguna variación de las condiciones ya establecidas como constantes a partir de los ensayos iniciales: [pEGFP] = 100 µg/ml, [QN]= 0.14%, [P1]= 0.2 µM, [P2]= 0.5 µM. Todas concentraciones de las soluciones preparadas de cada componente se mezclaron manteniendo la proporción 1:1:1 en sus volúmenes.

El tamaño de partícula determinado por el equipo fue de 218 ± 18 nm para el control, 300 ± 20 nm en el caso de las NPs P1, y finalmente de 221 ± 19 nm para las NPs P2. El tamaño de partícula es uno de los parámetros más importantes a considerar en el diseño de NPs, ya que está directamente relacionado con la facilidad con la que la célula pueda internalizar la nanopartícula.

En el caso de nuestras NPs todas coinciden en tener un tamaño superior a los 200 nm por lo que, debido a su tamaño y aunado a que no se encuentran acoplados a un ligando la endocitosis se da de forma inespecífica. El quitosán forma NPs catiónicas con gran afinidad a la membrana; cuando ambas interaccionan la nanopartícula se ve envuelta por la membrana citoplasmática y es endocitada (Barar, 2015). Sin embargo, este proceso de manera normal causa cierta deformación en la membrana citoplasmática, que en el caso de las NPs puede ser muy dañino para la célula si los complejos son de tamaños muy grandes, ya que mientras mayor sea el tamaño de la nanopartícula endocitada el daño a la membrana puede afectar la estabilidad de la membrana, generar tensión y permeabilidad, por lo que complejos de gran tamaño no ingresan a la célula (Zhang, 2015). En el caso de NPs menores a 100 nm la endocitosis se realiza mediada por moléculas transportadoras denominadas como caveolas y siguen un destino hasta el retículo endoplasmático (ER), sin embargo, estos tamaños suelen tener la desventaja de ser al dirigidos al ER la captación nuclear disminuye (Grosse, 2005).

Con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre los tamaños de los tres grupos de NPs trabajados se realizó un análisis estadístico, donde resalta que las NPs control y las NPs P2 no tenía diferencias entre sus tamaños, por lo que el P2 no afecta el tamaño de la nanopartícula final a diferencia del P1 donde

hubo un incremento de tamaño de aproximadamente 100 nm en comparación con el P2 y el control, lo que implica una mayor dificultad para la célula durante la internalización y a su vez una disminución de la transfección.

De la misma forma que el tamaño de partícula el ZP arrojó información sobre el comportamiento que se espera tengan las NPs. El ZP es una de las claves en el diseño de NPs dado que es uno de los determinantes de la estabilidad de un sistema, así como de la adhesión celular (Gaikwad, 2019). Este parámetro se puede definir como una medida de la carga superficial de las partículas en suspensión y muestra el grado de repulsión entre las mismas. Dicho de otra forma, valores de ZP elevados hablan de muestras cargadas positivamente, mientras que valores de ZP por debajo de cero hablan de partículas cargadas negativamente (Watters, 2012).

Dicho de otra forma, un ZP alto implica partículas cargadas positivamente que evitan la agregación debido a una repulsión de cargas en la suspensión, lo mismo ocurre con ZP muy negativos, pues existe la misma repulsión entre la carga de las superficies de las partículas, pero esta vez con cargas negativas, mientras que valores neutrales o no tan alejados del 0 nos habla de que la repulsión es superada por la atracción.

Por lo que valores óptimos se encuentran cercanos a -30 mV y a 30 mV, mientras que los valores que mayor estabilidad brindan y son menos propensos a formar agregados son aquellos localizados aproximadamente entre 20 – 40 mV (Samimi, 2019).

Particularmente en las NPs preparadas en este trabajo se obtuvieron valores de ZP para las NPs control de 19.65 ± 1.3 , NPs P1 19.64 ± 1.2 y NPs P2 20.76 ± 1.4 ; no existieron diferencias significativas entre los sistemas, que a su vez se encontraron dentro de los valores que se consideran que proveen de estabilidad a los sistemas, evitando que existan conglomerados de NPs generados por atracción de cargas.

El índice de polidispersión es otro de los valores que el Zeta Sizer puede brindarnos, este se utiliza para estimar la uniformidad promedio de una solución de partículas; valores más grandes de PId a una muestra dispersa, así como también puede indicar la agregación de NPs. De aquí que una muestra se considera monodispersa u homogénea cuando el valor de PId es menor o igual de 0.1 (Clayton, 2016) y heterogénea con un valor de PId > 0.7, que indica que la muestra se encuentra distribuida de una manera tan desigual que los datos para DLS no sería confiables y, por tanto, se descarta como opción de caracterización (Danaei, 2018). Para los grupos analizados se obtuvieron los siguientes valores: NPs control 0.105 ± 0.038 , NPs P1 0.213 ± 0.03 y NPs P2 0.078 ± 0.018 . Entre estos valores destaca que existen diferencias significativas tanto entre los péptidos como entre ellos con el control, por lo que según los valores de PId las NPs P1 son un sistema polidisperso a diferencia de las NPs control y P2, que se comportan como sistemas monodispersos, e incluso entre ellos las NPs P2 muestras menor dispersión que el control, por lo que el P2 estabiliza el sistema y lo homogeniza, disminuyendo de esta forma la formación de agregados.

Por último, dentro de la caracterización se incluyó la microscopía electrónica de barrido. La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una de las mejores técnicas en la caracterización de NPs, pues implica la observación directa de las dimensiones de las NPs y proporciona una imagen de la forma geométrica y su distribución. En el caso particular del quitosán se ha reportado que las NPs pueden tener tres morfologías diferentes, entre las que encontramos las esféricas, toroides y varillas en función del peso molecular y el ratio N/P (Picola, 2013).

Es importante señalar que la morfología tiene efectos sobre la eficiencia de transfección, siendo la forma esférica la más funcional, ya que permite la correcta endocitosis; mientras que las morfologías toroidales y de varilla rompen la propia morfología del endosoma (Zhang, 2019). En el caso de las NPs preparadas tanto controles como P1 y P2 mostraron una morfología esférica; sin embargo, en las fotografías se observa mayor aglomeración en la muestra correspondiente a P1. De forma general existen factores que incrementan la aglomeración en las NPs

como son el pH, ZP, tamaño, etc., sin embargo, teniendo en consideración previa estos parámetros, el proceso de secado dentro de la preparación de las muestras para SEM contribuye de manera importante a la aglomeración apreciada en las fotografías. Ghomransi, 2020).

En el caso de las NPs de este trabajo el ZP no contó con diferencias significativas, mientras el pH para ambas muestras fue de 5, que resulta un pH adecuado teniendo en consideración que el quitosán comienza a volverse insoluble a partir de un pH de 6. El tamaño fue significativamente mayor en las NPs 1, por lo que se puede inferir que es este cambio en el tamaño de ± 100 nm lo que realmente está generando la aglomeración, junto con el índice de polidispersión superior a 0.1 que señala una muestra polidispersa a causa de la formación de agregados.

De aquí que, en cuanto a caracterización, las NPs 2 muestran mejores resultados que las NPs 1 en cada uno de los parámetros estudiados y como se comentó anteriormente tienen efectos sobre la transfección.

Ensayos de transfección *in vitro*

El primero de los ensayos de transfección se realizó colocando directamente las NPs en los pozos de las células HeLa, obteniendo un vire completo del indicador a amarillo, por lo que se adicionó HEPES para balancear el pH del medio, sin embargo, el HEPES resulta citotóxico ya que es un generador de especies reactivas de oxígeno (Zigler, 1985). De esta forma el pH de las NPs, así como la adición de HEPES resultaron en la muerte celular, observándose durante la microscopía únicamente restos celulares en contraste con los núcleos íntegros observados en la muestra control sin tratamiento.

A partir del primer ensayo la primera modificación que se planteó fue diluir las NPs en 2 ml de medio para regular el pH previo a la adición directa sobre el pocillo, además de que se cambió por la línea celular SiHa al ser menos sensible a los cambios de pH. En este caso el vire del medio fue mínimo, manteniéndose en los colores cercanos del fucsia. Por otro lado, se añadió la tinción con faloidina rodaminada para la observación de los filamentos de actina que nos permitieran

observar que las células se encontrasen íntegras. Al ser observadas las preparaciones se encontró que las células se encontraban íntegras y con una confluencia de aproximadamente el 80% - 90%, por lo que diluir las NPs con medio logró equilibrar lo suficiente el pH para evitar la muerte celular; sin embargo, a pesar de que las células se mantuvieron íntegras no fue posible observar transfección en ninguno de los campos.

Con los ensayos de transfección anteriores en mente se planteó esta vez realizar la transfección con medio DMEM suplementado con FBS, en un inicio los ensayos se plantearon con medio libre dado que las proteínas séricas presentes en el FBS pueden interactuar con las NPs haciendo que se formen agregados lo suficientemente grandes que eviten la internalización de las NPs, lo que en un inicio es correcto en sistemas *in vivo*, pues en cultivos celulares las células se encuentran ancladas al cubre objetos en la parte inferior del pocillo, por lo que para que las NPs interactúen con las células es necesario que estas lleguen hasta allí por sedimentación, por lo que la fuerza g así como la sedimentación centrífuga de poliplejos aceleran la interacción con la célula e impulsan la eficiencia de transfección *in vitro* (Pezzoli, 2017).

Debido al tamaño que tienen las NPs y bajo peso del quitosán estas se mantienen flotando en el medio libre de FBS, por lo que no llegan a interactuar con la célula ni a ser internalizadas. Al añadir FBS al 10% al medio usado para diluir las NPs, así como el medio de transfección, la interacción de las NPs con las proteínas séricas genera agregados que aumentan el peso de los complejos enviados causando que estos sedimenten por gravedad e interactúen con la membrana celular. De esta forma, al añadir FBS al medio de transfección fue posible confirmar la transfección en todas las muestras observando fluorescencia en el filtro FITC que colocalizó con células.

Con el objetivo de comparar los efectos del peso molecular del quitosán se prepararon NPs con quitosán de bajo peso molecular (20.6 kDa) y de alto peso (57.5 kDa); en este caso se observó una mayor transfección en las NPs preparadas con quitosán de 20.6 kDa en comparación con las NPs de 57.5 kDa,

por lo que se confirmó la elección de quitosán de 20.6 kDa para el ensamblaje de NPs con los péptidos cariófilicos. Las diferencias en la transfección son bastante notorias, encontrando varias células por campo en el caso de las NPs de bajo peso en contraste con las NPs de alto peso donde apenas podía localizarse una célula por campo. Y esto se debe principalmente a que el tamaño de partícula decrece conforme el peso molecular disminuye, generando NPs de menor tamaño que a su vez aumentan la eficiencia de transfección por un aumento en la internalización (Santos – Carballal, 2018).

En el caso de los péptidos desde la primera vista es notable la diferencia en el número de células transfectadas con las NPs P2 en contraste con las NPs P1 y el control de bajo peso molecular; en este caso las células por campo se mantienen superiores a 10, mientras que en las células tratadas con NPs 1 se localiza apenas 1 célula transfectada por campo; incluso menos que en aquellas tratadas con el control carente de péptidos cariófilicos, por lo que los efectos del péptido cariófilico se están viendo opacados completamente por las propiedades físicas de las NPs.

En cuanto a propiedades físicas las NPs P2 son similares a las NPs control, ya que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas, por lo que el incremento en la transfección se ve directamente relacionado con la adición del péptido cariófilico. Tras la endocitosis de la nanopartícula ésta por efecto “esponja de protones” termina por liberar el plásmido acoplado al péptido cariófilico en el citoplasma, en este punto es donde el péptido cariófilico que posee una señal de localización nuclear (NLS) es reconocido como un sustrato de importación nuclear por las nucleoporinas. El plásmido acoplado al péptido se une a la importina β a través de la importina α mediado por GTPasa, posteriormente la subunidad α se une directamente a los aminoácidos de la NLS y la subunidad β se acopla al complejo de poros nucleares y lleva consigo al plásmido acoplado con el péptido al interior del núcleo a través del poro nuclear.

Esencialmente en el caso de las NPs P1, el mecanismo tras la endocitosis es el mismo; sin embargo, es notorio que la transfección es mucho menor con apenas

una célula por campo, siendo incluso menor que en las células tratadas con las NPs control sin péptido. Teniendo en cuentas las propiedades físicas descritas anteriormente podemos notar que la diferencia radica en que las NPs ensambladas con el péptido 1 tienen un tamaño de partícula mayor y un índice de polidispersión igualmente mayor que sugiere la formación de agregados de NPs que pueden incluso observarse en la microscopía (SEM). Es este tamaño superior y formación de agregados, que no sucede en el caso de las NPs P2 y sí en las NPs 1 lo que lleva al impedimento de la célula para endocitar las NPs, que al no ser internalizadas por la célula es imposible ver el efecto del péptido como señalizador nuclear.

La diferencia entre los péptidos radica en la longitud y secuencia que poseen, mientras que el péptido 1 tiene una extensión de 13 aminoácidos y la secuencia CGGGPKKKRKVED, el péptido 2 es más corto con una extensión de 9 aminoácidos y secuencia PAAKRVKLD.

Entre ambos péptidos la cantidad de residuos catiónicos es similar, al igual que aminoácidos de carga negativa; sin embargo, donde radica su diferencia es en el número de aminoácidos con carga neutra; estos no interaccionan con el DNA para su compactación ni con ninguno de los componentes que conforman las NPs, pero sí ocupan un espacio en el ensamblaje final. De esta forma el péptido 1 tiene una condensación ineficiente del DNA con respecto al P2, por lo que las NPs generadas a partir del acoplamiento de cada uno de ellos difieren inicialmente en el tamaño que trae consigo un aumento en la formación de agregados y por ende disminución de la transfección. Péptidos cariofílicos de mayor extensión tienen mejores efectos en la transfección; sin embargo, esto sólo se cumple si los péptidos más largos tienen una mayor cantidad de residuos catiónicos que uno de menor longitud, pues son estos residuos catiónicos los que interaccionan con el pDNA y lo compactan (Ragin, 2002).

El último ensayo en realizarse fue el de internalización, con el objetivo de NPs dar seguimiento a la endocitosis de las NPs y el tiempo que podía tardar; para esto el plásmido fue marcado con yoduro de propidio antes del ensamblaje de las

nanopartícula ya que una vez ensambladas las NPs, el yoduro de propidio no podría intercalarse con el plásmido por el encapsulamiento completo del quitosán, como sucedió con el GelRed durante los ensayos de retención.

La transfección se realizó usando suero y fueron tomadas muestras a los 30 y a los 60 minutos. En estas se observó que en ambos péptidos las NPs lograban penetrar la célula aproximadamente a los 30 minutos, mientras que a los 60 minutos ya se encontraban cerca del núcleo y en algunos casos correspondían con el mismo, de esta forma se confirmó que las NPs sí contaban con la capacidad de ser endocitadas por las células, en el tiempo que se espera, pues el proceso de endocitosis de NPs tarda aproximadamente de 30 minutos a unas horas (Behzadi,2017). Por lo que probablemente de extender el tiempo de ensayo se hubiera visto mayor cantidad del plásmido marcado localizando con el citoplasma y principalmente con el núcleo.

Conclusión

El desarrollo de NPs es un trabajo complejo, ya que las características requeridas para que actúen como vectores óptimos son bastante específicas. Teniendo en cuenta las células, son sistemas que no permiten la entrada a cualquier tipo de complejos, aunado a la serie de mecanismos que protegen a la célula de material genético externo y las propias características del vector como la citotoxicidad.

En este trabajo se buscó una forma de aprovechar todas las características del quitosán como vector mejorando su eficiencia de transfección con la adición de péptidos. En comparación, el P2 generó NPs con características más aptas para la transfección; tamaños inferiores a los 250 nm, sistemas monodispersos con poca aglomeración y de alta estabilidad como lo reflejan el índice de polidispersión y el ZP, mientras que el P1 en contraste formó NPs con tamaños aproximados de 300 nm, polidispersos y con una mayor aglomeración.

Por lo que, si bien la adición de péptidos cariofílicos aumenta la eficiencia de la transfección en vectores no virales como el quitosán, tal es ejemplo del P2, este aumento también es dependiente de una buena elección de péptido y las propiedades físicas resultantes de la interacción péptido – DNA.

A partir de lo desarrollado en este trabajo, se plantea como perspectiva a futuro el acoplamiento de ligandos a las NPs, para de esta forma lograr terapias dirigidas e incrementar por una vía más la eficiencia de transfección además de los péptidos cariofílicos, con la finalidad de lograr el desarrollo del quitosán como un vector altamente eficaz para la entrega de material genético y transcripción de este para el posterior uso en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

Referencias

1. Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. *Universidad de Salamanca*. www.bancoadn.org
2. Barar J. (2015). Bioimpacts of nanoparticle size: why it matters?. *BioImpacts: BI*, 5(3), 113–115. <https://doi.org/10.15171/bi.2015.23>
3. Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., et al. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society reviews*, 46(14), 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>
4. Bloomfield V. A. (1996). DNA condensation. *Current opinion in structural biology*, 6(3), 334–341. [https://doi-org/10.1016/s0959-440x\(96\)80052-2](https://doi-org/10.1016/s0959-440x(96)80052-2)
5. Böhmová, E., Machová, D., Pechar, M., Pola, R., Venclíková, K., et al. (2018). Cell-penetrating peptides: a useful tool for the delivery of various cargoes into cells. *Physiological research*, 67(Suppl 2), S267–S279. <https://doi-org/2443/10.33549/physiolres.933975>
6. Bono, N., Ponti, F., Mantovani, D., & Candiani, G. (2020). Non-Viral in Vitro Gene Delivery: It is Now Time to Set the Bar!. *Pharmaceutics*, 12(2), 183. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020183>
7. Bremner, K. H., Seymour, L. W., Logan, A., & Read, M. L. (2004). Factors influencing the ability of nuclear localization sequence peptides to enhance nonviral gene delivery. *Bioconjugate chemistry*, 15(1), 152–161. <https://doi.org/10.1021/bc034140k>
8. Vermeulen, L., Brans, T., Samal, S. K., Dubrue, P., Demeester, J., et al. (2018). Endosomal Size and Membrane Leakiness Influence Proton Sponge-Based Rupture of Endosomal Vesicles. *ACS nano*, 12(3), 2332–2345. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07583>
9. Cartier, R., & Reszka, R. (2002). Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene therapy*, 9(3), 157–167.
10. Chandra Hembram, K., Prabha, S., Chandra, R., Ahmed, B., & Nimesh, S. (2016). Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1), 305–314. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.948548>
11. Chen, Y. H., Keiser, M. S., & Davidson, B. L. (2018). Viral vectors for gene transfer. *Current Protocols in Mouse Biology*, 8, e58. doi: [10.1002/cpmo.58](https://doi.org/10.1002/cpmo.58)
12. Clayton, K. N., Salameh, J. W., Wereley, S. T., & Kinzer-Ursem, T. L. (2016). Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics*, 10(5), 054107. <https://doi.org/10.1063/1.4962992>
13. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F.,

- Javanmard, R., et al. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
14. De La Vega J, Braak BT, Azzoni AR, Monteiro GA, Prazeres DM. Impact of plasmid quality on lipoplex-mediated transfection. *J Pharm Sci*. 2013;102(11):3932-3941. <https://doi:10.1002/jps.23709>
 15. Flock, S., & Houssier, C. (1997). Effect of glycine on DNA structural transitions induced by multivalent cationic compounds. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 15(1), 53–61. <https://doi-org/10.1080/07391102.1997.10508945>
 16. Gaikwad, V. L., Choudhari, P. B., Bhatia, N. M. & Bhatia, M. S. (2019). Characterization of pharmaceutical nanocarriers: in vitro and in vivo studies. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*, 33-58. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816505-8.00016-3>
 17. Ghomrasni, N. B., Chivas-Joly, C., Devoille, L., Hochepped, J. F., & Feltin, N. (2020). Challenges in sample preparation for measuring nanoparticles size by scanning electron microscopy from suspensions, powder form and complex media. *Powder Technology*, 359, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.10.022>
 18. Grosse, S., Aron, Y., Thévenot, G., François, D., Monsigny, M., & Fajac, I. (2005). Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. *The journal of gene medicine*, 7(10), 1275–1286. <https://doi-org/10.1002/jgm.772>
 19. Guang Liu, W., & De Yao, K. (2002). Chitosan and its derivatives--a promising non-viral vector for gene transfection. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 83(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00144-x](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00144-x)
 20. Hernandez-Baltazar, D., Martinez-Fong, D., & Trudeau, L. E. (2012). Optimizing NTS-polyplex as a tool for gene transfer to cultured dopamine neurons. *PloS one*, 7(12), e51341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051341>
 21. Ishii, T., Okahata, Y., & Sato, T. (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1514(1), 51-64.
 22. Köping-Höggård, M., Vårum, K. M., Issa, M., Danielsen, S., Christensen, B. Stokke, B. T., & Artursson, P. (2004). Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene therapy*, 11(19), 1441–1452. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302312>
 23. Lukashev, A. N., & Zamyatnin, A. A., Jr (2016). Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry. Biokhimiia*, 81(7),700–708. <https://doiorg/10.1134/S0006297916070063>
 24. Maucksch, C., Connor, B. and Rudolph, C. (2013). Plasmid DNA Concatemers: Influence of Plasmid Structure on Transfection Efficiency. In *Minicircle and Miniplasmid DNA Vectors*, M. Schleaf (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9783527670420.ch5>
 25. Miranda, S.P. (2000). Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a

- quitosán. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. México, No. De patente 293022, No. de expediente 005444, No. de folio 1175930-5
26. NIH, 2022. *Terapia génica*. [online] Genome.gov. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Terapia-genica>
 27. Novo, L., Mastrobattista, E., van Nostrum, C. F., Lammers, T., & Hennink, W. E. (2015). Decationized polyplexes for gene delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 12(4), 507–512. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.988136>
 28. Ocampo, S. M., Rodriguez, V., de la Cueva, L., Salas, G., Carrascosa, J. L., Josefa Rodríguez, M., et al. (2015). g-force induced giant efficiency of nanoparticles internalization into living cells. *Scientific reports*, 5, 15160. <https://doi-org/10.1038/srep15160>
 29. Opanasopit, P., Rojanarata, T., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., & Ruktanonchai, U. (2009). Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes. *International journal of pharmaceutics*, 382(1-2), 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.029>
 30. Patil, S., Gao, Y. G., Lin, X., Li, Y., Dang, K., Tian, Y., Zhang, W. J., Jiang, S. F., Qadir, A., & Qian, A. R. (2019). The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5491. <https://doi-org/2443/10.3390/ijms20215491>
 31. Pezzoli, D., Giupponi, E., Mantovani, D., & Candiani, G. (2017). Size matters for in vitro gene delivery: investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation. *Scientific reports*, 7, 44134. <https://doi-org/10.1038/srep44134>
 32. Picola, I. P. D., Busson, K. A. N., Casé, A. H., Nasário, et al. (2013). Effect of ionic strength solution on the stability of chitosan–DNA nanoparticles. *Journal of Experimental Nanoscience*, 8(5), 703–716. <https://doi.org/10.1080/17458080.2011.602120>
 33. Ragin, A. D., Morgan, R. A., & Chmielewski, J. (2002). Cellular import mediated by nuclear localization signal Peptide sequences. *Chemistry & biology*, 9(8), 943–948. [https://doi-org/10.1016/s1074-5521\(02\)00189-8](https://doi-org/10.1016/s1074-5521(02)00189-8)
 34. Raik, S. V., Andranoviš, S., Petrova, V. A., Xu, Y., Lam, J. K. W., Morris, G. A., & Skorik, Y. A. (2018). Comparative study of diethylaminoethyl-chitosan and methylglycol-chitosan as potential non-viral vectors for gene therapy. *Polymers*, 10(4), 442.
 35. Rozalén, J., Callejo, V. C., & Jordán, J. (2003). Terapia génica. Vectores de expresión. *Offarm: farmacia y sociedad*, 22(8), 102-108.
 36. Samal, S. K., Dash, M., Van Vlierberghe, S., Kaplan, D. L., Chiellini, E., Van Blitterswijk, C., & Dubruel, P. (2012). Cationic polymers and their therapeutic potential. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7147-7194.
 37. Samimi, S., Maghsoudnia, N., Eftekhari, R. B., & Dorkoosh, F. (2019). Lipid-based nanoparticles for drug delivery systems. Characterization and biology of nanomaterials for drug delivery. Elsevier, 47-76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00003-9>

38. Santos-Carballal, B., Fernández Fernández, E., & Goycoolea, F. M. (2018). Chitosan in Non-Viral Gene Delivery: Role of Structure, Characterization Methods, and Insights in Cancer and Rare Diseases Therapies. *Polymers*, 10(4), 444. <https://doi.org/10.3390/polym10040444>
39. Scott, V., Clark, A. R., & Docherty, K. (1994). The gel retardation assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 31, 339–347. <https://doi.org/10.1385/0-89603-258-2:339>
40. Smith, C., & Blomberg, P. (2017). Genterapi – från idé till verklighet - Ännu har få patienter behandlats och preparaten är ofta mycket dyra – men utvecklingengår fort nu [Gene therapy – from idea to reality]. *Lakartidningen*, 114, EWYL.
41. Sun, Y., Xian, L., Xing, H., Yu, J., Yang, Z., Yang, T., Yang, L., & Ding, P. (2016). Factors influencing the nuclear targeting ability of nuclear localization signals. *Journal of drug targeting*, 24(10), 927–933. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1184273>
42. Suryaji, P., Gao, Y. G., Lin, X., Li, Y., Dang, K., Tian, Y., & Qian, A. R. (2019). The development of functional non-viral vectors for gene delivery. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5491
43. Thomas, T. J., Tajmir-Riahi, H. A., & Pillai, C. (2019). Biodegradable Polymers for Gene Delivery. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(20), 3744. <https://doi.org/10.3390/molecules24203744>
44. Vélez, A., Camilo A., & Martínez, L.M. (2013). Terapia genica: una opción de tratamiento y una controversia ética. *Gene therapy: a treatment option and an ethics controversy*. *Revista Salud Uninorte*, 29(2), 341-350.
45. Vermeulen, L., De Smedt, S. C., Remaut, K., & Braeckmans, K. (2018). The proton sponge hypothesis: Fable or fact?. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 129, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.034>
46. Vermeulen, L., Brans, T., Samal, S. K., Dubruel, P., Demeester, J., De Smedt, S. C., Remaut, K., & Braeckmans, K. (2018). Endosomal Size and Membrane Leakiness Influence Proton Sponge-Based Rupture of Endosomal Vesicles. *ACS nano*, 12(3), 2332–2345. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07583>
47. Vinogradov, S. V., Bronich, T. K., & Kabanov, A. V. (2002). Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Advanced drug delivery reviews*, 54(1), 135–147.
48. Wang, H., Feng, Z., & Xu, B. (2019). Supramolecular Assemblies of Peptides or Nucleopeptides for Gene Delivery. *Theranostics*, 9(11), 3213–3222. <https://doi.org/10.7150/thno.31854>
49. Watters, R. J., Kester, M., Tran, M. A., Loughran Jr, T. P., & Liu, X. (2012). Development and use of ceramide nanoliposomes in cancer. *Methods in enzymology* (508), 89–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391860-4.00005-7>
50. Wirth, T., Parker, N., & Ylä-Herttua, S. (2013). History of gene therapy. *Gene*, 525(2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
51. Ylä-Herttua, S. (2017). The pharmacology of gene

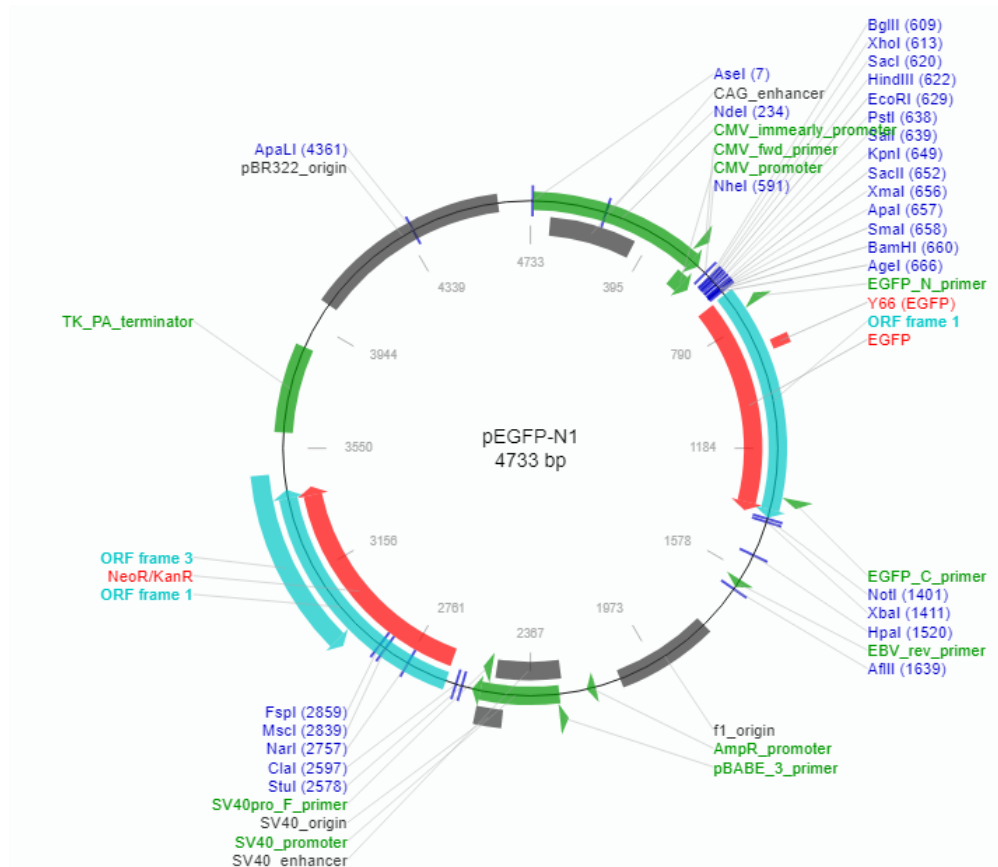
- therapy. *Molecular Therapy*, 25(8), 1731-1732.
52. Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature reviews. Genetics*, 15(8), 541–555.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302312>
53. Yin, J., Meng, X., Zhang, S., Zhang, D., Wang, L., & Liu, C. (2012). The effect of a nuclear localization sequence on transfection efficacy of genes delivered by cobalt(II)-polybenzimidazole complexes. *Biomaterials*, 33(31), 7884–7894.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.017>
54. Zhang, S., Gao, H., & Bao, G. (2015). Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS nano*, 9(9), 8655–8671.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03184>
55. Zigler, J. S., Jr, Lepe-Zuniga, J. L., Vistica, B., & Gery, I. (1985). Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association*, 21(5), 282–287.
<https://doi.org/10.1007/BF02620943>

ANEXOS

ANEXO 1: PLÁSMIDO pEGFP – N1

El plásmido pEGFP – N1 es un vector de clonación que expresa fluorescencia y codifica una variante corrida hacia el rojo de la proteína verde fluorescente que se ha optimizado para presentar mayor fluorescencia y expresión en células de mamíferos. Este otorga resistencia a la kanamicina a las bacterias que lo portan y usa a la neomicina como marcador de selección.

Mapa circular del plásmido pEGFP – N1 obtenido de AddGene:



ANEXO 2: KIT DE EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO

Los kits de plásmidos de QIAGEN se basan en la lisis alcalina como método de extracción de DNA plasmídico y utilizan columnas de intercambio aniónico QIAGEN de flujo por gravedad para una purificación eficaz del DNA plasmídico. La resina de intercambio iónico contenida en las columnas permite obtener plásmidos con alta pureza a partir de los lisados bacterianos y la eliminación de RNA y proteínas se realiza a través del lavado con sal para la obtención final del plásmido por precipitación con alcohol isopropílico.

Procedimiento general para el uso del kit:

- 1.- Inocular con la colonia bacteriana fresca de 5 - 10 ml de medio Luria adicionado con antibióticos, incubar a 37°C por 8 hrs y mantener en agitación a 300 rpm. Utilizar un recipiente por lo menos con capacidad 4 veces mayor al volumen del medio.
- 2.- Realizar diluciones del cultivo 1/500. Incubar 15 hrs a 37°C con agitación constante.
- 3.- Centrifugar a 6000 g por 15 min/ 4 °C para obtener el pellet. Resuspender en 10 ml de buffer P1 con RNAsa y LyseBlue.
- 4.-Añadir el buffer P2, mezclar por inversión el tubo sellado e incubar a temperatura ambiente 5 min. Revisar que el tubo tome una coloración azul homogénea.
- 6.- Añadir el Buffer P3, mezclar por inversión e incubar en hielo por 20 min, debe observarse viscoso, mezclar hasta que esta consistencia disminuya o el color desaparezca.
- 7.- Centrifugar a más de 20, 000 g por 30 min a 4°C y remover el sobrenadante. Posteriormente centrifugar el sobrenadante por 15 min bajo las mismas condiciones.

8.- El lisado obtenido verterlo dentro de la columna del kit e incubar por 10 min a temperatura ambiente. Encender el vacío pasado este tiempo y cuando se termine el líquido añadir 50 ml de Buffer FWB2, el lisado obtenido tras la filtración contiene el DNA plasmídico.

9.- Añadir el buffer QBT a la punta y esperar que la columna se vacíe por efecto de la gravedad.

10.- Añadir el sobrenadante obtenido y lavar con Buffer QT. La primera fracción contiene contaminantes en su mayoría mientras que la segunda contiene el plásmido.

11.- Eluir el plásmido con Buffer QF, no utilizar tubos de policarbonato.

12.- Añadir isopropanol para precipitar el DNA, mezclar por inmersión del tubo y centrifugar a 15,000 g a 4°C. Decantar el sobrenadante cuidadosamente de no perder el pellet.

13.- Lavar el pellet de DNA con etanol al 70%. Dejar secar al aire libre y disolver en buffer de pH fisiológico o ligeramente alcalino. No agitar.

Composición de los Buffers

Buffer	Composición	Almacenamiento
P1	50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A	2–8°C, después de la adición de la RNasa A
P2	200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)	15–25°C
P3	3 M de acetato de potasio, pH 5.5	15–25°C
FWB2	1 M de acetato de potasio, pH 5.5	15–25°C
QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0 15% isopropanol (v/v) 0.15% Triton® X-100 (v/v)	15–25°C
QC	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C
QF	1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C
QN	1.6 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C
TE	10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA	15–25°C
STE	100 mM NaCl; 10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA	15–25°C

ANEXO 3: INFORMACIÓN DE LOS PÉPTIDOS CARIOFÍLICOS

Los péptidos que fueron utilizados se adquirieron con LifeTein LLC, una empresa que cuenta con el diseño de péptidos y péptidos personalizados el 18 de noviembre del 2020. Estos péptidos cuentan con las siguientes características y secuencia de aminoácidos.

Datos de los péptidos utilizados en el ensamblaje de las nanopartículas

Péptido ID	Secuencia	Pureza	Formula	Peso molecular
Péptido 1	CGGGPKKKRKVED	98.667%	C ₅₈ H ₁ O ₄ N	14000.07
Péptido 2	PAAKRVKLD	98.531%	C ₄₄ H ₈ ON ₁	996.9

Nomenclatura de una sola letra para los aminoácidos esenciales

Aminoácido	Simbolo de una letra
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ácido aspártico	D
Cisteína	C
Glutamina	Q
Ácido glutámico	E
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptófano	W
Tirosina	Y
Valina	V