



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



ENSAMBLAJE Y CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN (20.6 Y 57.5 kDa) Y PLÁSMIDO pEGFP-N1 PARA SU USO EN TERAPIA GÉNICA

T E S I S

Que para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

Trejo López Saúl Enrique

ASESORA DE TESIS:

Dra. María Eugenia Aranda Barradas

CO-ASESORA DE TESIS:

QFB Nydia Berenice González Ángeles

Av. 1° de Mayo s/n, Santa María las Torres, Campo uno, 54740 Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023



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 -FESS Cuautitlán, claves CI2217 y CI2267.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al técnico académico Francisco González Díaz, por su apoyo técnico en la realización de este trabajo de tesis.

Los agradecimientos que estoy escribiendo en esta noche no son solo por el apoyo a este trabajo, son por todo lo que han agregado a mi vida personal.

A mi tutora Dra. María Eugenia. Gracias por su paciencia, por sus consejos y por todo el apoyo que me brindo a lo largo de esta etapa de mi vida, gracias por darme la oportunidad de pertenecer a este proyecto y gracias nuevamente por la paciencia infinita que me ha dado.

A mi tutora Nydia Berenice. Gracias por el tiempo que me dedicó, no solo en dudas de esta tesis, si no en general de todas las materias que lleve con usted, fueron las mejores y las que más disfrutaba; usted es de las mejores maestras.

A mis padres. ustedes han sido siempre el motor que me impulsa a seguir, sin ustedes posiblemente no estaría en donde estoy ni sería quien soy, ustedes son quienes estuvieron siempre a mi lado en los días y noches más difíciles durante toda mi vida. Siempre han sido y siempre serán los mejores padres. Gracias por ser quienes son y por creer en m, los amo.

A mis hermanos. Gracias por el apoyo, por los consejos, risas, enojos, peleas y momentos en los que nos unimos ustedes junto con mis padres son lo más importante en mi vida, doy gracias a que ustedes son parte de mi vida.

INDICE

1.	ABREVIATURAS.....	6
2.	INDICE DE TABLAS.....	7
3.	INDICE DE FIGURAS.....	7
4.	RESUMEN	10
5.	INTRODUCCIÓN	11
5.1	TERAPIA GÉNICA.....	11
5.2	APLICACIONES	12
5.3	VECTORES	12
6.	MARCO TEÓRICO	13
6.1	CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES DE LOS PLÁSMIDOS PARA TERAPIA GÉNICA.....	13
6.2	MATERIALES MÁS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DE VECTORES NO VIRALES	15
6.3	CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES DEL QUITOSÁN	16
6.4	MÉTODOS DE ENSAMBLAJE DE NANOPARTÍCULAS.....	17
6.5	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIA GÉNICA	18
6.5.1	<i>Ensamblaje</i>	19
6.5.2	<i>Relación N/P (NP ratio)</i>	20
6.5.3	<i>Morfología</i>	20
6.5.4	<i>Tamaño de partícula y carga de superficie</i>	22
6.5.5	<i>Estructura secundaria</i>	23
6.5.6	<i>Funcionalidad biológica y eficiencia de transfección</i>	23
6.5.7	<i>Citometría de flujo</i>	25
7.	JUSTIFICACIÓN.....	25
8.	HIPÓTESIS	26
9.	OBJETIVOS.....	26
9.1	OBJETIVO GENERAL	26
9.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
10.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
10.1	PROPAGACIÓN Y AISLAMIENTO DEL PLÁSMIDO pEGFP-N1.....	27
10.1.1	<i>Aislamiento y purificación de pEGFP-N1 por la técnica de miniprep</i>	27
10.1.2	<i>Aislamiento y purificación de pEGFP-N1 por la técnica de maxiprep</i>	27
10.2	CUANTIFICACIÓN Y CONFIRMACIÓN DE INTEGRIDAD DEL PDNA.....	28
10.3	CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD DEL PEGFP-N1 MEDIANTE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA.....	29
10.4	DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE DOS LOTES DE QUITOSÁN	29
10.5	SOLUBILIZACIÓN DEL QUITOSÁN.....	29
10.6	ENSAMBLAJE DE NANOPARTÍCULAS	30
10.6.1	<i>Método de coacervación</i>	30
10.6.2	<i>Método de gelación ionotrópica</i>	30
10.7	ENSAYOS DE RETENCIÓN ELECTROFORÉTICA.....	30
10.8	ENSAYO DEL EFECTO DE PROTECCIÓN DEL QUITOSÁN SOBRE EL PDNA.....	31
10.9	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	31
10.10	DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ.....	31
10.11	DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA POR MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	32

10.12	ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN <i>IN VITRO</i>	32
10.13	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
11.	RESULTADOS.....	33
11.1	EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y MAPEO DEL PLÁSMIDO PEGFP-N1	33
11.2	MÉTODOS DE ENSAMBLAJE DE NANOPARTÍCULAS.....	35
11.2.1	<i>Método de coacervación</i>	35
11.2.2	<i>Formación de nanopartículas de quitosán-TPP por el método de gelación ionotrópica</i> 38	
11.2.3	<i>Ensamblaje de nanopartículas por el método de coacervación incrementando la fuerza iónica</i> 40	
11.3	DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA Y CARGA DE SUPERFICIE.....	43
11.3.1	<i>Nanopartículas por el método de gelación ionotrópica</i>	44
11.3.2	<i>Determinación de tamaño de partícula y carga de superficie de las nanopartículas por el método de coacervación</i>	45
11.4	DETERMINACIÓN DE FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA.....	50
12.	DISCUSIÓN	51
12.1	NANOPARTÍCULAS ENSAMBLADAS POR EL MÉTODO DE COACERVACIÓN COMPLEJA	52
12.2	NANOPARTÍCULAS FORMULADAS POR EL MÉTODO DE GELACIÓN IONOTRÓPICA	53
12.3	NANOPARTÍCULAS FORMULADAS POR EL MÉTODO DE COACERVACIÓN INCREMENTANDO LA FUERZA IÓNICA 54	
12.4	EFFECTO DEL PESO MOLECULAR DEL QUITOSÁN EN LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DE LAS NANOPARTÍCULAS	56
13.	CONCLUSIONES	58
14.	PERSPECTIVAS.....	58
15.	REFERENCIAS.....	59
	ANEXO 1.....	65
	ANEXO 2.....	68

1. ABREVIATURAS

bp	Bases pairs/ pares de bases
CaCl ₂	Cloruro de calcio
°C	Grados centígrados
DNA	Desoxyribonucleic acid/ ácido desoxirribonucleico
DLS	Dynamic Light Scattering/ dispersión dinámica de la luz
dL/g	Decilitro por cada gramo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	Food and Drug Agency
GFP	Green Fluorescent Protein/ Proteína verde fluorescente
g	Gramos
g/dL	Gramo sobre decilitro
HCl	Ácido clorhídrico
HAc	Ácido acético
LB	Caldo Luria Bertani
LiCl	Cloruro de Litio
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LVD	Laser Doppler Velocimetry / Láser de velocimetría Doppler
kDa	kilodaltons
M	Molar
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
N	Normal
NaAc	Acetato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng/μL	Nanogramos por microlitro
nm	Nanómetros
PBS	Phosphate Buffer Solution / Solución Buffer de Fosfatos
pEGFP-N1	Plasmid Enhanced Green Fluorescent Protein Neomycin Phosphotransferase genes/ plásmido de la proteína verde fluorescente mejorada y genes de neomicina transferasa
pDNA	DNA plasmídico
pH	Potencial de Hidrógeno
Q:TPP	Quitósán: Tripolifosfato
rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ribonucleic acid / ácido ribonucleico

SDS	Dodecil Sulfato de sodio
SEM	Scanning Electronic Microscope/ Microscopio electrónico de barrido
shRNA	RNA de interferencia
STE	Sodium (chloride)- Tris-EDTA
TEM	Transmision Electronic Microscope / Microscopio electrónico de transmisión
TPP	Tripolifosfato
Tris	Trisaminometano
µL	Microlitros
µg	Microgramos

2. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	CONCENTRACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO PEGFP-N1 POR MINIPREP	33
TABLA 2.	CONCENTRACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO PEGFP-N1 POR MAXIPREP.....	33
TABLA 3.	PARÁMETROS ESTABLECIDOS PARA LOS ENSAYOS DE GELACIÓN IONOTRÓPICA.....	38
TABLA 4.	RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ZETASIZER A LAS DIFERENTES CONDICIONES DE TRABAJO CON LAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN-TRIPOLIFOSFATO.	45
TABLA 5.	RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ZETASIZER PRO PARA LAS NANOPARTÍCULAS REALIZADAS CON NA ₂ SO ₄ -PDNA/QUITOSÁN.....	46
TABLA 6.	PROMEDIOS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA TABLA 5 CON SU RESPECTIVO VALOR DE <i>P</i>	47
TABLA 7.	PRUEBA DE DOS COLAS PARA EL POTENCIAL Z PARA NANOPARTÍCULAS RECÍEN PREPARADAS Y CON 30 DÍAS DE ALMACENAMIENTO.....	49

3. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	MAPA DEL PLÁSMIDO PEGFP-N1 CON LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN	14
FIGURA 2.	IMAGEN REPRESENTATIVA DE UN GEL DE ELECTROFORESIS PARA UN ENSAYO DE RETENCIÓN	19
FIGURA 3.	MICROGRAFÍAS DE NANOPARTÍCULAS VISUALIZADAS EN TEM.....	21
FIGURA 4.	MICROGRAFÍA DE SEM DE NANOPARTÍCULAS NTS-POLIPLEX (NEUROTENSINA POLIPLEX) EN SEM EN FORMA OVALADA Y ESFÉRICA	22
FIGURA 5.	MICROGRAFÍAS DE NANOPARTÍCULAS VISUALIZADAS EN AFM.	22

FIGURA 6. MICROGRAFÍA CONFOCAL DE UNA TRANSFECCIÓN CON NTS-POLIPLEX CON PEGFP-N1 <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	25
FIGURA 7. MAPEO DEL PLÁSMIDO EGFP-N1.....	34
FIGURA 8. A) MAPA DE SITIOS DE CORTE DEL PLÁSMIDO PEGFP-N1 PARA LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN <i>HINDIII</i> Y <i>HPAI</i> . B) ELECTROFORESIS TEÓRICA OBTENIDA DE NEBCUTTER.	35
FIGURA 9. ENSAYOS DE RETENCIÓN ELECTROFORÉTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN MOLAR ÓPTIMA PEGFP-N1: QUITOSÁN DE 20.6 Y 57.5 KDA.	36
FIGURA 10. MICROGRAFÍA EN SEM DE NANOPARTÍCULAS PREPARADAS CON QUITOSÁN DE 20.6 KDA.	37
FIGURA 11. MICROGRAFÍA EN SEM DE NANOPARTÍCULAS PREPARADAS CON QUITOSÁN DE 57.5 KDA.	37
FIGURA 12. MICROGRAFÍA EN SEM DE QUITOSÁN DE 20.6 KDA.....	39
FIGURA 13. MICROGRAFÍA EN SEM DE NANOPARTÍCULAS PREPARADAS CON QUITOSÁN DE 57.5 KDA.	39
FIGURA 14. ENSAYO DE RETENCIÓN ELECTROFORÉTICA DEL ENSAMBLAJE DE NANOPARTÍCULAS POR EL MÉTODO DE COACERVACIÓN.....	40
FIGURA 15. ENSAYO DE PROTECCIÓN CONTRA DNASA I.	41
FIGURA 16. MICROGRAFÍA EN SEM DE NANOPARTÍCULAS QUITOSÁN (20.6 KDA)-PDNA.....	42
FIGURA 17. MICROGRAFÍA EN SEM DE NANOPARTÍCULAS QUITOSÁN (20.6 KDA)-PDNA.....	42
FIGURA 18. MICROGRAFÍA EN SEM DE NANOPARTÍCULAS QUITOSÁN (57.5 KDA)-PDNA.....	43
FIGURA 19. MICROGRAFÍA EN SEM DE NANOPARTÍCULAS QUITOSÁN (57.5. KDA)-PDNA.	43
FIGURA 20. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS PREPARADAS CON QUITOSÁN DE 20.6 (A) Y 57.5 KDA (B).....	47
FIGURA 21. GRÁFICO DE DISTRIBUCIÓN DEL POTENCIAL Z.	48
FIGURA 22. HISTOGRAMA COMPARATIVO DEL TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS CON SUS INTERVALOS DE CONFIANZA.....	48
FIGURA 23. HISTOGRAMA COMPARATIVO DEL POTENCIAL Z DE LAS NANOPARTÍCULAS CON SUS INTERVALOS DE CONFIANZA.	48
FIGURA 24. HISTOGRAMA COMPARATIVO DEL ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CON SUS INTERVALOS DE CONFIANZA.....	49
FIGURA 25. HISTOGRAMA COMPARATIVO DEL POTENCIAL Z DE LAS NANOPARTÍCULAS RECÍEN PREPARADAS Y CON 30 DÍAS DE ALMACENAMIENTO.....	50
FIGURA 26. TRANSFECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA LÍNEA CELULAR HELA.	51

4. RESUMEN

La terapia génica se define como la transferencia de material genético a una célula, tejido u órgano de un individuo, dando como principal resultado un efecto terapéutico por medio de la expresión de dicho material genético. Para esto, se utilizan vectores que funcionan como vehículos que transportan el material genético a una amplia variedad de células, tejidos o incluso órganos enteros. Los vectores son clasificados en vectores virales y vectores no virales. El quitosán, cuya seguridad ha sido ampliamente demostrada, se ha utilizado en el desarrollo de vectores no virales para terapia génica por ser un biopolímero catiónico de aminopolisacáridos con capacidad de interactuar electrostáticamente con el DNA plasmídico dando lugar a nanopartículas. Se ha reportado que el tamaño y carga de superficie de estas nanopartículas está en función del peso molecular y la concentración del quitosán y el plásmido utilizado, lo cual tiene una repercusión directa en la eficiencia de transfección. A la fecha se han utilizado quitosanes con pesos moleculares ≥ 100 kDa para el ensamblaje de este tipo de nanopartículas. En el presente trabajo se evaluó la morfología (por microscopía electrónica de barrido), el tamaño (por dispersión dinámica de luz), el potencial zeta (por velocitometría acoplada a láser Doppler) y la funcionalidad biológica (ensayos de transfección *in vitro*) de nanopartículas obtenidas a partir de distintas concentraciones de plásmido y de quitosán de dos pesos moleculares diferentes de quitosán (20.6 y 57.5 kDa) empleando dos metodologías para su ensamblaje. Uno de los métodos utilizados fue el de gelación ionotrópica, mediante el cual no fue posible la obtención de nanopartículas esféricas como se esperaba; en su lugar se observó una película atribuida a exceso de quitosán. Por el contrario, el método de coacervación compleja permitió la formación de las nanopartículas en un tamaño dentro del rango esperado bajo ciertas concentraciones de plásmido/quitosán. En la evaluación de estas nanopartículas se encontró que hay un efecto significativo en el tamaño y potencial zeta en función del peso molecular del quitosán, no así en la morfología, ya que en ambos casos se observaron nanopartículas esféricas. Se observó una tendencia a la disminución del tamaño y potencial zeta en las nanopartículas ensambladas con el quitosán de menor peso molecular. Asimismo, se realizó la evaluación de estabilidad de las nanopartículas después de 30 días de almacenamiento a 4 °C. Los resultados arrojaron diferencias significativas entre las nanopartículas recién ensambladas vs 30 días después de su almacenamiento con el quitosán de alto peso molecular, en contraste con las nanopartículas ensambladas con el quitosán de bajo peso molecular, en las cuales no se encontró diferencia entre una condición y otra, lo que sugiere una mayor estabilidad. Para determinar el efecto del peso molecular del quitosán en la funcionalidad biológica de las nanopartículas, se realizaron ensayos de transfección *in vitro*, los cuales evidenciaron la capacidad de ambas nanopartículas de transfectar a células HeLa. Sin embargo, en el caso de las nanopartículas formuladas con quitosán de menor peso molecular se observó una mayor expresión de la proteína verde fluorescente, además de no encontrarse alguna señal de citotoxicidad. En conclusión, para el ensamblaje de nanopartículas con fines de uso en terapia génica resultó favorable la aplicación del método de coacervación compleja, ya que el método de gelación iónica presentó mayores dificultades con resultados inadecuados para los fines buscados

en el presente trabajo. Asimismo, el método de coacervación compleja a relaciones molares óptimas de plásmido/quitosán permitió la comparación del efecto del peso molecular del quitosán en las características de las nanopartículas y en su capacidad de transfección. Se encontró que el uso de quitosán de peso molecular más bajo confiere una mayor estabilidad y mejores características físicas en las nanopartículas, lo cual se ve reflejado en la capacidad de transfección

5. INTRODUCCIÓN

5.1 Terapia Génica

Se puede definir como la transferencia de material genético a una célula, tejido u órgano de un individuo, dando como principal resultado un efecto terapéutico con el fin de curar, corregir o mejorar la calidad de vida del paciente por medio de la expresión de dicho material genético (Roy, K. *et al.* 1999; Reyes y Zarain, 2009; Duarte, 2013).

El Proyecto del Genoma Humano ha conseguido logros importantes, como la identificación de las numerosas mutaciones que causan las enfermedades hereditarias, dando lugar a un mayor entendimiento tanto a los defectos causados por un solo gen como a los multifactoriales. La terapia génica usa la ingeniería genética y/o a la tecnología del DNA recombinante para introducir, eliminar o silenciar genes específicos (Rodríguez, 2003). La adición génica consiste en la introducción del gen funcional, mientras que en la corrección génica se modifica la secuencia sustituyéndola por la correcta. Generalmente se trata de mutaciones puntuales, por lo que se requiere intercambiar un nucleótido específico. Por otro lado, la supresión génica consiste en reducir la expresión de un determinado gen, lo cual se logra mediante el uso de RNA de interferencia (siRNA) que induce la degradación o el silenciamiento del RNA mensajero (mRNA) (Gutiérrez-Vargas & Cardona-Gómez, 2017).

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, *Food and Drugs Administration* por sus siglas en inglés) emitió la aprobación del uso de terapia génica, introduciéndolo como un nuevo enfoque para el tratamiento de cáncer y de algunas otras enfermedades potencialmente mortales o graves. Uno de los tratamientos basados en terapia génica que está actualmente aprobado por la FDA es Kymriah (tisagenlecleucel), indicado para pacientes pediátricos y adultos con Leucemia Linfoblástica aguda (LLA). Otro de los tratamientos aprobados es Luxturna, indicado para una forma hereditaria de la pérdida de visión con posible ceguera y que está asociada a la mutación de un gen específico en pacientes pediátricos y adultos (FDA, 2019).

5.2 Aplicaciones

Las aplicaciones y efectos de la terapia génica dependen de la célula diana que tiene como objetivo su uso. Por ejemplo, en células diana germinales (espermatozoides u óvulos), esta terapia origina un cambio permanente en el individuo, así como en los descendientes; sin embargo, esta aplicación es de gran controversia ética. En contraste, el uso de la terapia génica en células somáticas sólo afecta al individuo y no a su descendencia. Para la elección de la célula blanco se debe tener en cuenta la finalidad del tratamiento; desde la corrección de un defecto en una población celular, como en el caso de la talasemia (anemia causada por el cambio del sexto aminoácido en la cadena de la hemoglobina) hasta la producción, a partir de las células transfectadas, de una proteína de secreción para la corrección de un defecto sistémico; por ejemplo, en las hemofilias. Entre las células más utilizadas se encuentran los fibroblastos de la piel y los linfocitos (FDA, 2019). La terapia génica supone una de las vías más esperanzadoras de éxito en las enfermedades monogénicas causadas por la afección de un solo gen, logrando la curación del gen defectuoso en el tejido (Rozalén *et al*, 2003).

5.3 Vectores

Los vectores son utilizados en la terapia génica, como vehículos que transportan el material genético a una amplia variedad de células, tejidos o incluso órganos enteros. El vector óptimo depende de la célula blanco y sus características como la duración de la expresión y del tamaño del material genético que es incorporado al vector. Los vectores son clasificados en vectores virales y vectores no virales, aunque también existe la inserción de DNA desnudo directamente a la célula, órganos o tejidos (Ramamoorth, & Narvekar, 2015). Sin embargo, la inserción del DNA desnudo muestra un nivel de expresión génica muy por debajo del nivel que se muestra con los vectores virales y no virales, además de que no puede realizarse su administración sistémica por la presencia de las nucleasas y como resultado de esto, su uso se ha limitado a tejidos con fácil acceso a la inyección del DNA, como la piel y el músculo (Mansouri *et al*, 2004).

Los vectores virales son los que comúnmente se utilizan más por sus características; entre los virus más utilizados se encuentra los retrovirus, virus del herpes simplex, lentivirus, adenovirus y virus adeno-asociados. La ventaja de este tipo de vectores es que poseen una habilidad natural para entrar en la célula y tener por consecuencia una alta tasa de transfección; sin embargo, entre sus desventajas se encuentra el limitado tamaño de secuencia de DNA que se puede insertar en el genoma vírico y que pueden llegar a ser potencialmente tóxicos en algunos pacientes, ya que hay una activación latente de una respuesta inmune (Mansouri *et al.*, 2004).

Por otro lado, los vectores no virales son compuestos que, por sus características de cargas catiónicas permanentes, pueden generar un tipo de interacción electrostática con las cargas negativas que posee el DNA, generando complejos del compuesto con el DNA, siendo los plásmidos los más empleados debido a sus características. Por otro lado, en la terapia génica se puede dirigir a la supresión génica mediante el uso de RNA de interferencia (siRNA) encaminada al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Gutiérrez-Vargas & Cardona-Gómez, 2017). Los polímeros o fosfolípidos catiónicos son los 2 tipos más utilizados de vectores no virales. A estos complejos se les denomina poliplexes o lipoplexes, respectivamente. En general, los vectores no virales tienen como ventaja la baja activación de la respuesta inmune del organismo, aunque su desventaja principal es que la eficiencia de transfección es relativamente más baja con respecto a los vectores virales (Mansouri *et al*, 2004). Sin embargo, es posible utilizar estrategias para aumentar esta eficiencia de transfección. Por ejemplo, la incorporación de ligandos, péptidos cariofílicos, y otros.

En función del uso al que va dirigida, existen diferentes métodos para el desarrollo de vectores no virales para terapia génica, así como también diversos. En el presente trabajo se eligió el quitosán el cual es un polímero ideal para la formación de nanopartículas para este propósito. En el desarrollo de nanopartículas, es importante también su caracterización para el establecimiento de parámetros que permitan evaluar su eficacia; entre ellos se encuentran: tamaño de partícula, potencial zeta y forma física, los cuales están estrechamente relacionados con la eficiencia de transfección.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 Características y aplicaciones de los plásmidos para terapia génica

Los plásmidos son secuencias de DNA circular bicatenario y se encuentran separados del genoma bacteriano principal, en el citoplasma de la célula. Estos plásmidos se caracterizan por tener una replicación independiente del cromosoma y por no portar genes esenciales para el crecimiento y reproducción de la célula, pero pueden llevar genes que codifican para algunas proteínas o incluso toxinas (Harvey & Champe, 2008; Karp, 2011; Murray, *et al*, 2000; Prats, 2005).

Los plásmidos portan información genética que puede proporcionar ventajas selectivas a las bacterias. Por ejemplo, algunos plásmidos pueden conferir un nivel alto de resistencia a antibióticos, codificar a la producción de bacteriocinas, toxinas, factores de virulencia y algunos otros genes que otorgan cierta ventaja respecto a la metabolización de ciertos sustratos. Estas ventajas y/o características han sido importantes en la investigación

médica y alimentaria (Harvey & Champe, 2008; Karp, 2011; Murray et al., 2000; Prats, 2005).

El plásmido EGFP-N1 (pEGFP-N1, por sus siglas en inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein, and neomycin phosphotransferase genes*) está constituido de 4733 pares de bases (bp, por sus siglas en inglés *bases pairs*) (Figura 1). Codifica una variante silvestre de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*) y ha sido optimizado para una fluorescencia más brillante y con una mayor expresión en células de mamíferos (Addgene, n.d.; CLONETECH, 1999; NCBI, 2003).

El pEGFP-N1 retiene las propiedades fluorescentes de la proteína, lo que permite la localización de dicha proteína *in vivo* e *in vitro* y puede utilizarse como un marcador para determinar la eficiencia de transfección en cualquier línea celular de manera sencilla mediante microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo (Addgene, n.d.; CLONETECH, 1999; NCBI, 2003).

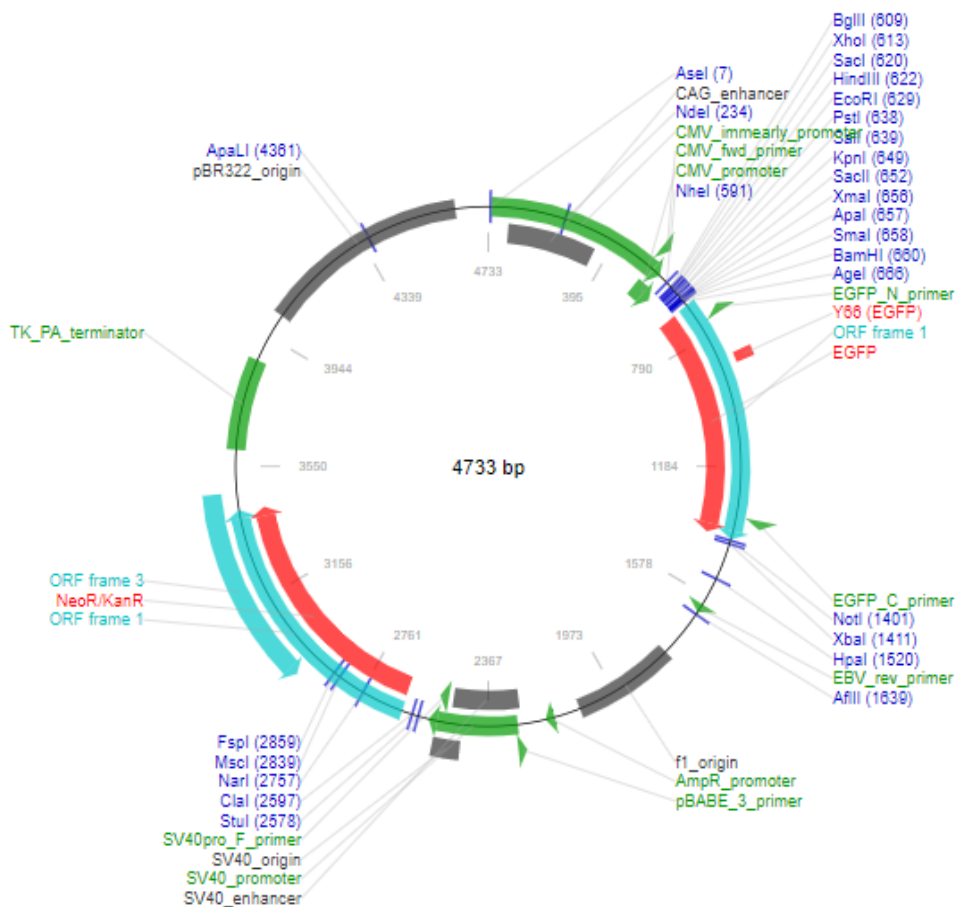


Figura 1. Mapa del plásmido pEGFP-N1 con los sitios de restricción. Imagen obtenida de Addgene

6.2 Materiales más utilizados en el desarrollo de vectores no virales

Dentro de los materiales más utilizados para el desarrollo de vectores no virales se encuentran la poli-L-lisina, la polietilenimina, dendrímeros y los poliaminoésteres, los cuales son polímeros sintéticos catiónicos, que, al interactuar con material genético forman complejos denominados poliplexes, como ya se mencionó anteriormente (Ramamoorth & Narvekar, 2015).

La poli-L-lisina (PLL) tiene la capacidad de formar un complejo junto con el DNA, por lo que esta es ampliamente utilizada. La poli-L-lisina posee grupos primarios E-amina, los cuales están protonados y pueden interactuar electrostáticamente con los grupos fosfatos con carga negativa del DNA y así, dar la formación de los complejos. Se ha demostrado que la PLL con un peso molecular bajo no puede formar complejos estables con el DNA por la baja cantidad de aminas en la cadena de la PLL, aunque, por otro lado, la PLL con un peso molecular alto presenta una elevada citotoxicidad y una tendencia agregativa y a precipitarse (Barrera Bautista, *et al.*, 2011; Choi et al., 1998). Para evitar o intentar disminuir la citotoxicidad y la eliminación del complejo por el torrente sanguíneo, se ha empleado el uso de polietilenglicol (PEG) para evitar la agregación de los complejos y así mejorar la estabilidad de los complejos en presencia de proteínas séricas (Barrera Bautista *et al.*, 2011).

La polietilenimina (PEI) es un polímero catiónico con grupos amino de alta densidad, los cuales aceptan protones, actuando como un protector del DNA cuando se encuentra dentro de los endosomas evitando la degradación lisosomal, por lo que es considerado como un *gold standard* para la transfección de genes *in vivo* o *in vitro* (Camacho *et al.*, 2006; Ramamoorth & Narvekar, 2015). Sin embargo, esta característica también confiere cierta citotoxicidad, relacionada con el peso molecular y la tasa de transfección de la célula. Para reducir la citotoxicidad, se ha utilizado al PEG, creando el complejo PEI-g-PEG, sin embargo, la eficiencia de la transfección es similar al complejo DNA-PEI (Barrera Bautista *et al.*, 2011). Por el contrario, los poliaminoésteres muestran una menor citotoxicidad, y al igual que la PEI muestran una interacción con pDNA. Estos poliaminoésteres son sintetizados a partir de la adición de aminas primarias y/o secundarias a ésteres diacrilatos (Barrera Bautista et al., 2011).

Por otro lado, los dendrímeros son polímeros ramificados que son simétricos en forma y en tamaño y que se constituyen de un *core* o núcleo, una zona intermedia de unidades repetitivas de ramificaciones y de un exterior multivalente, el cual puede ser diseñado para contener grupos funcionales neutros o con cargas aniónicas o catiónicas, lo que le otorga las características para la aplicación en la terapia génica (López, 2014; Ramamoorth & Narvekar, 2015).

Además de los mencionados anteriormente, el quitosán se ha utilizado también en el desarrollo de vectores no virales para terapia génica. Este es un biopolímero catiónico de aminopolisacáridos que tiene la capacidad de interactuar con el DNA. Se ha reportado que el tamaño de las nanopartículas obtenidas mediante interacción electrostática de estos dos componentes está en función del peso molecular del quitosán utilizado, lo cual tiene una repercusión directa en la eficiencia de transfección.

6.3 Características y aplicaciones del quitosán

El quitosán es un polímero de N-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, el cual se puede encontrar naturalmente en la pared celular de algunos hongos (*Mucor rouxii*); sin embargo, a un nivel industrial es obtenido mediante la desacetilación de la quitina en medio alcalino a altas temperaturas, la cual es extraída principalmente del exoesqueleto de algunos crustáceos, tales como el cangrejo, langosta y camarón. Debido a la estructura química de la quitina, esta es completamente insoluble en agua o en medio ácido; por el contrario, el quitosán es la forma N-desacetilada de la quitina, siendo este un polisacárido catiónico lineal con grupos amino libres, lo cual permite su solubilidad en agua acidificada y permitiendo así que este producto sea utilizado en diversos materiales como en geles, hilos, películas, entre otras. En resumen, el quitosán es un polímero catiónico lineal, biodegradable, seguro, de fácil aplicación, fácil de obtener, ambientalmente amigable y se puede disolver fácilmente en ácidos orgánicos y ácidos minerales, a excepción del ácido sulfúrico (Hidalgo & Miranda, 2013a; Lárez, 2006; Mármol, *et al.*, 2011).

El quitosán tiene algunas aplicaciones en distintas áreas (Lárez, 2006; Mármol *et al.*, 2011), por ejemplo:

- a) En la industria de alimentos como espesantes, gelificantes y emulsificantes
- b) En la industria de bebidas como clarificadores sin afección de olor en agua, vino y algunos jugos.
- c) En la agricultura se utiliza para el recubrimiento de semillas y como agente bactericida y fungicida
- d) En tratamiento de aguas como coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alcalinidad, como floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceite de pescado, y en la captura de algunos metales pesados y pesticidas.
- e) En la industria cosmética como aditivo bactericida en jabones, cremas para la piel y cremas de afeitar.
- f) En la medicina como cremas bactericidas y para la producción de suturas y gasas.
- g) En el campo de la terapia génica no viral, utilizando una vía alterna de introducción física de material genético aprovechando sus propiedades fisicoquímicas.

6.4 Métodos de ensamblaje de nanopartículas

Existen numerosos métodos para la elaboración y síntesis de nanopartículas que permiten el encapsulamiento de moléculas hidrófobas e hidrófilas (por ejemplo, algunos fármacos). Los principales métodos son:

1. Evaporación/emulsión, la cual consiste en la emulsificación de dos fases, una acuosa con un agente emulsionante y la fase orgánica inmiscible en agua con un principio activo y un polímero. Mediante una sonda de ultrasonido o un sistema de agitación variable se genera energía para formar una fase dispersa homogénea y comienza la evaporación de la fase orgánica y así el polímero precipita encapsulado de los principios activos hidrófobos. Este método permite la síntesis de nanopartículas con una morfología y tamaño deseado (Urrejola *et al.*, 2018).
2. El método de doble o múltiple emulsión consiste en encapsular moléculas hidrófilas, las cuales se unen a un surfactante y se disuelven en agua. La emulsión se compone por la dispersión de la fase acuosa en una fase orgánica, que presenta un polímero disuelto. Este es un procedimiento tóxico, lo que afecta la estabilidad de alguno de los componentes empleados (Urrejola *et al.*, 2018).
3. El método de difusión de emulsificación utiliza un solvente no totalmente soluble como, por ejemplo, acetona, en el que se disuelven polímeros o compuestos bioactivos, después, se emulsionan en una fase acuosa que contiene un estabilizador que evita la agregación de las gotas en la emulsión para que se disuelva en un solvente y se precipitan las nanopartículas (Urrejola *et al.*, 2018).
4. El método de nanoprecipitación consiste en que moléculas bioactivas y el polímero se disuelven en acetona en una solución acuosa que contenga tensioactivos, la acetona es evaporada y las nanopartículas permanecen en la suspensión acuosa (Urrejola *et al.*, 2018).

Por otro lado, existen diferentes métodos para la preparación de nanopartículas basadas en polímeros catiónicos (específicamente el quitosán), que son compatibles con el ensamblaje de material genético para su uso en terapia génica, a saber:

1. El método de gelación ionotrópica, la cual se basa en la interacción electrostática entre los grupos amino del quitosán y de las cargas negativas de algún polianión como, por ejemplo, el tripolifosfato. En este método se realiza la adición del polianión a una solución de quitosán disuelto en ácido acético y en agitación mecánica (Nagpal, Singh, & Mishra, 2010), para posteriormente realizar la adición del pDNA con una concentración constante y en un buffer Tris.HCl bajo una intensa agitación en vórtex por 60 segundos (Gaspar, Sousa, Queiroz, & Correia, 2011).
2. El método de evaporación por solventes es un método poco usado para la formación de nanopartículas debido al uso de solventes orgánicos. En este método una solución de quitosán en etanol es añadido por inversión a una solución de poli-L-Lisina y

posteriormente se añade de manera rápida y bajo agitación magnética una solución buffer de pDNA-Tris. Finalmente se somete a una presión reducida para producir las nanopartículas y remover los solventes que aún se encuentren en el sistema. (Nagpal *et al.*, 2010).

3. El método de complejo polielectrolítico o método de coacervación compleja propone una interacción electrostática entre las cargas de un anión, como los grupos carboxilo, los grupos sulfato o una solución de DNA, y un catión como los grupos amino del quitosán y llevar a una neutralización de cargas entre los polímeros catiónicos y los grupos aniónicos, permitiendo el autoensamblaje de los componentes polielectrolíticos (Nagpal *et al.*, 2010). El ensamblaje óptimo de las nanopartículas por este método está en función de las concentraciones y relaciones molares que se empleen para ambos componentes, y esto también está relacionado con sus pesos moleculares. La forma y tamaño de las nanopartículas dependerán en gran medida de estos factores. Este método se realiza con la solución de quitosán a una concentración variable en función de las características finales deseadas y la relación molar óptima a un pH de 5.5 para terapia génica y una solución de pDNA en sulfato de sodio/dextran sulfato. La solución debe de ser precalentada a 50-55°C y mantenerla en agitación (vortex) durante 45 segundos para la formación de las nanopartículas (Bozkir & Saka, 2004; Corsi, Chellat, Yahia, & Fernandes, 2003; Mansouri *et al.*, 2006; Nagpal *et al.*, 2010).
4. El método de evaporación de solventes. En este método la emulsificación de un polímero en solución dentro de una fase acuosa seguida de la evaporación de un solvente lo que induce a la precipitación del polímero en nanoesferas. En este método, el quitosán que se encuentra en etanol se añade a una solución con poli-L-lisina y es mezclada por inversión. A esta solución, el pDNA-Tris buffer, es añadido con un goteo constante con etanol y en agitación magnética. Finalmente, el solvente es removido a una presión baja obteniéndose las nanopartículas (Nagpal *et al.*, 2010).

6.5 Caracterización de nanopartículas para terapia génica

La caracterización de las nanopartículas se basa en las mediciones de sus propiedades biofísicas como: afinidad de ensamblaje, morfología de la partícula, distribución del tamaño de partícula, potencial Z, capacidad de protección ante la exposición a DNAsa I, eficiencia de la transfección y citotoxicidad. El análisis de estas propiedades se realiza con el fin de conocer o predecir cómo pueden llegar a actuar las nanopartículas bajo diferentes condiciones y cuál es la mejor formulación para el fin en el que se quiere emplear las nanopartículas (Santos-Carballal, *et al.*, 2018).

6.5.1 Ensamblaje

Uno de los métodos más utilizados para la formación de nanopartículas para terapia génica es el de coacervación compleja, en donde las cargas negativas del pDNA y las positivas del polímero catiónico interactúan de manera electrostática; esta interacción se demuestra mediante el uso de geles de electroforesis o ensayos de retención electroforética, que consiste en la separación de macromoléculas por su tamaño y su carga. Las cargas de las moléculas migran en un campo eléctrico con una polaridad diferente a la que se tiene, por ejemplo, los ácidos nucleicos que tienen una carga negativa por los grupos fosfato presentes, migran hacia el campo eléctrico con polaridad positiva o ánodo, el tiempo en el que tarde la migración se debe al peso molecular o tamaño. La visualización del DNA es por medio del uso de bromuro de etidio, SYBR green o GelRed bajo la exposición a luz UV. La interacción del pDNA con las cargas positivas del polímero catiónico genera un retardamiento en el desplazamiento de las cargas negativas del pDNA o bien, cuando las concentraciones de ambos componentes son adecuadas, causa su total retención en el pozo del gel o incluso la incapacidad de observar el DNA debido su grado de compactación por la interacción. Esto permite también determinar la relación molar óptima la cual se encuentra en la relación 1:21 y 1:24 (Figura 2).

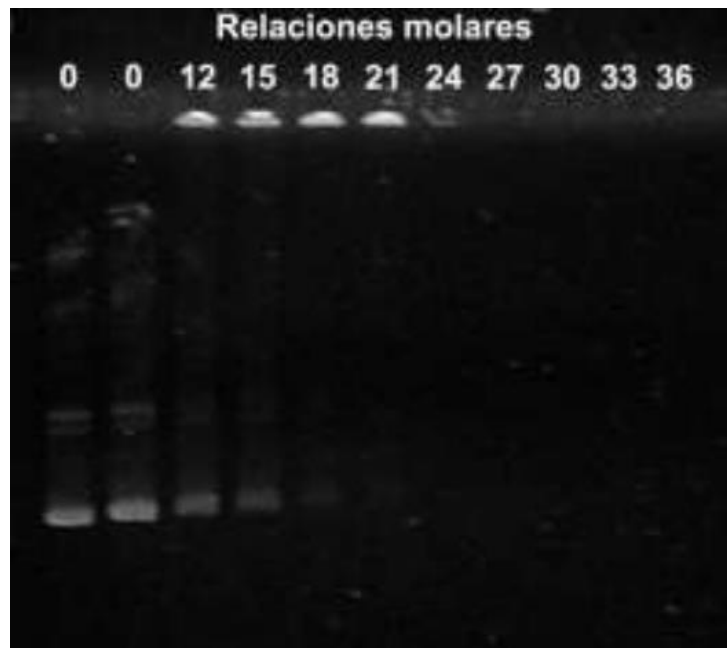


Figura 2. Imagen representativa de un gel de electroforesis para un ensayo de retención para determinar las relaciones molares de plásmido: polímero. 1er 0 carril) muestra plásmido; 2do 0 carril plásmido-péptido cariofílico (Aranda-Barradas *et al.*, 2018)

Además de los ensayos de retención electroforética, otra técnica que se puede utilizar para determinar directamente el ensamblaje de las nanopartículas es el potencial Z, debido a la tendencia a la neutralización de cargas que hay, por la interacción. Esto se

confirma con la comparación de los potenciales zeta de ambos componentes por separado con el de las nanopartículas ensambladas. Por otro lado, la dispersión dinámica de la luz (DLS), Microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), Microscopía de fuerza atómica y difracción circular son técnicas que permiten observar indirectamente el ensamblaje de las nanopartículas, aunque estos ensayos tienen otra finalidad (Santos-Carballal *et al.*, 2018).

6.5.2 Relación N/P (NP ratio)

El N/P ratio o la relación N/P hace referencia a la proporción entre las cargas positivas que tienen los grupos amino (NH_2) del quitosán y las cargas negativas de los grupos fosfato (PO_4) del pDNA. La carga general del complejo Quitosán-pDNA es determinada por el N/P ratio el cual influye en la capacidad del quitosán para condensar al pDNA, afectando directamente al diámetro de las nanopartículas. El N/P ratio es el cociente de la concentración del quitosán sobre la concentración del plásmido. También afecta directamente a la eficiencia de transfección; un estudio realizado por Tsuyoshi (Ishii, *et al.*, 2001) menciona que N/P ratio muy bajos (≤ 0.5) o muy altos (≥ 10) afectan negativamente a la eficiencia de transfección y valores de N/P ratio entre 3 y 5 afectan positivamente, teniendo en este rango la mayor eficiencia de transfección; aunque también debe considerarse el peso molecular tanto del plásmido como del quitosán con que se esté trabajando en la relación de este cociente con la eficiencia de transfección (Hallaj-Nezhadi *et al.*, 2011; Ishii *et al.*, 2001; Özgel & Akbuğa, 2006; Raftery, O'Brien, & Cryan, 2013).

6.5.3 Morfología

Para observar la morfología de las nanopartículas se utilizan las técnicas de microscopía, como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) que se basa en el uso de electrones emitidos por un filamento de tungsteno en una columna con vacío en donde son sometidos a un alto voltaje y aceleran a una velocidad casi similar a la velocidad de la luz, pero con una longitud de onda menor, lo que da una mejor resolución. En conclusión, el poder de resolución es directamente proporcional a la longitud de onda de irradiación, en donde, entre mayor aceleración tengan los electrones, las longitudes de onda serán más cortas ocasionando un mayor poder de resolución (Santos-Carballal *et al.*, 2018). El TEM es utilizado para determinar la morfología y el tamaño de las nanopartículas formadas a partir del complejo quitosán-DNA. Se han reportado en la literatura formas esféricas en nanopartículas de pDNA-quitosán (figura 3b) (Corsi *et al.*, 2003; Hallaj-Nezhadi *et al.*, 2011; Roy, Mao, Huang, & Leong, 1999) o formas toroides o en forma de dona en nanopartículas

de pDNA-poliamina (Figura 3a) (Chattoraj, Schellman, & Gosule, 1978; Erbacher, *et al.*, 1998; Tang & Szoka, 1997).

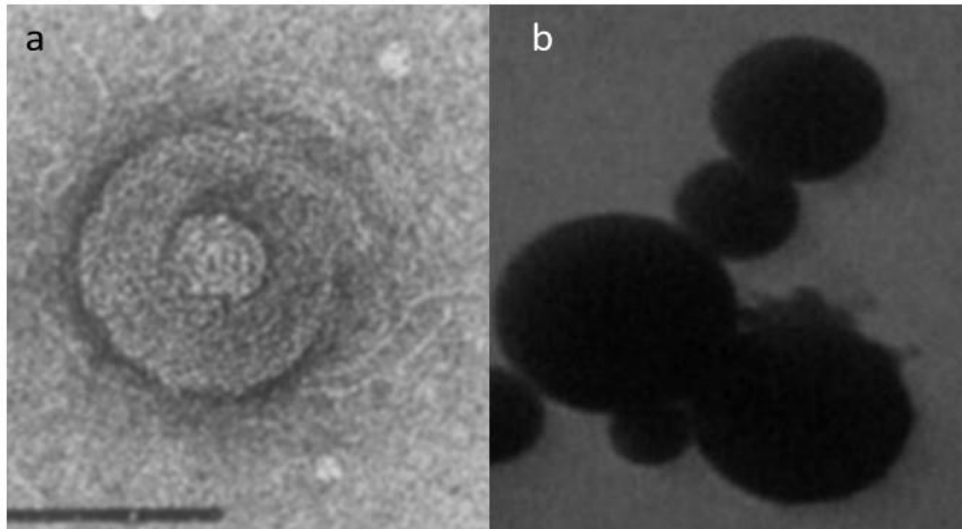


Figura 3. Micrografías de nanopartículas visualizadas en TEM. a) nanopartículas de DNA-poliamina en forma toroide (Chattoraj *et al.*, 1978); b) nanopartículas de pDNA-quitosan en forma esférica (Hallaj-Nezhadi *et al.*, 2011).

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es otro método para la determinación de la morfología y tamaño de las nanopartículas, la cual se basa en la incidencia de un haz de electrones sobre la muestra, la cual emite una señal captada mediante un tubo de rayos catódicos y posteriormente registrados en una pantalla (Naik Kardile, 1975). En SEM las nanopartículas pueden ser observadas en 3D con una morfología redonda u ovalada de acuerdo con la literatura (Figura 4) (Aranda-Barradas *et al.*, 2018)

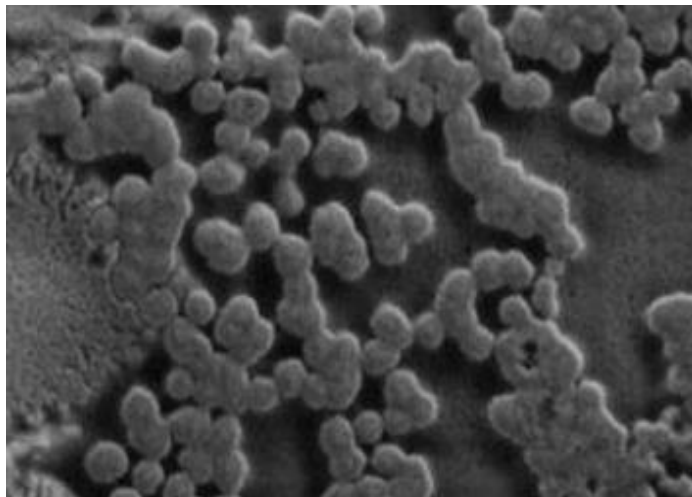


Figura 4. Micrografía de SEM de nanopartículas NTS-poliplex (neurotensina poliplex) en SEM en forma ovalada y esférica (Aranda-Barradas *et al.*, 2018)

Por otro lado, la microscopía de fuerza atómica (AFM) consiste en un sistema de resorte llamado “voladizo” para la detección de tamaños en el orden de Angstroms (Å), mientras una punta unida al voladizo se une a la muestra y se mueve a lo largo de la superficie, creando una desviación aplicando una fuerza electrostática, magnética o interacciones interatómicas entre la punta y la muestra. El AFM consta de 5 componentes: una punta de nitruro de silicio (Si_3N_4) de 10-20 nm, un detector de la desviación del voladizo, un sistema de retroalimentación para controlar la fuerza de interacción, un sistema de escaneo mecánico y un sistema de visualización que convierte los datos obtenidos en una imagen. La AFM es una técnica que permite la visualización de la morfología de los complejos de quitosán-pDNA (Figura 5a) y de quitosán-siRNA (Figura 5 b) (Liu *et al.*, 2007; Santos-Carballal *et al.*, 2018).

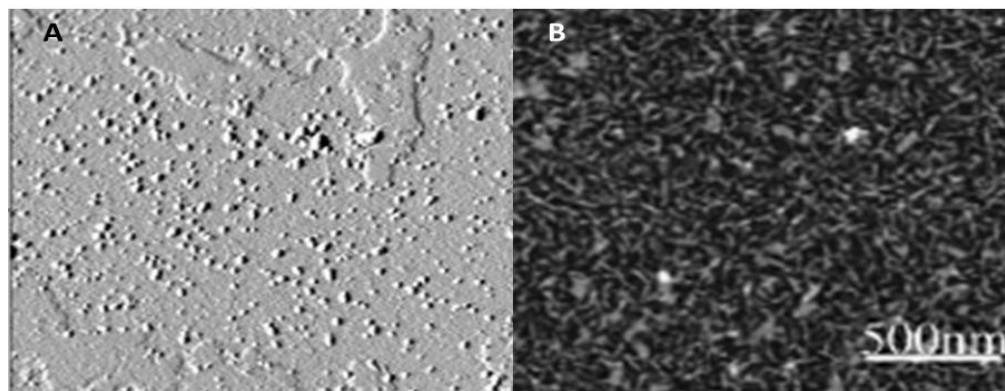


Figura 5. Micrografías de nanopartículas visualizadas en AFM. a) nanopartículas de complejo quitosán-DNA (Corsi *et al.*, 2003); b) nanopartículas de quitosán-siRNA (Liu *et al.*, 2007)

6.5.4 Tamaño de partícula y carga de superficie

La dispersión dinámica de la luz (DLS *por sus siglas en inglés, Dynamic Light Scattering*) es una técnica que se basa en el sondeo de las fluctuaciones temporales de macromoléculas dispersas en un disolvente, entonces son sometidas a un movimiento browniano y a un rayo de luz monocromático (HeNe) que causa un efecto Doppler de la luz. La propiedad de las macromoléculas para la difusión en una solución por las mediciones del DLS se determina por medio del coeficiente de difusión traslacional mutuo, de acuerdo con la primera ley de difusión de Fick, relaciona la concentración de un gradiente de soluto en un solvente a lo largo de un eje. Por el uso de la función de autocorrelación junto con el coeficiente de difusión, se puede calcular el radio hidrodinámico de una partícula, asumiendo que ésta tenga una geometría esférica, y la polidispersidad del tamaño de partícula. La ecuación de Stokes-Einstein relaciona la difusión de partículas esféricas en un

medio líquido y determina el radio hidrodinámico de la dispersión de las partículas en un medio con viscosidad conocida, a una temperatura específica y sometidas a un movimiento browniano (Santos-Carballal et al., 2018; Zetasizer User Manual, 2004).

La carga de superficie o potencial zeta se determina por la movilidad electroforética y la velocidad de las partículas por medio de un láser de velocimetría Doppler (LDV *por sus siglas en inglés Laser Doppler Velocimetry*). Para la determinación de la movilidad electroforética y una carga de partícula relativa, la solución es sometida a un campo eléctrico y cuando los electrodos aplican su voltaje, las partículas cargadas migran hacia el electrodo con una carga opuesta a la partícula y utilizando la ecuación de Henry, la movilidad electroforética es convertida a potencial zeta. El potencial zeta indica la estabilidad de las partículas; si las partículas poseen un potencial zeta elevado, estas tienden a repelerse entre sí. En contraste, si poseen un potencial zeta bajo, estas no se repelen con fuerza y tienden a precipitarse o aglomerarse, por lo que las partículas son inestables (Santos-Carballal et al., 2018; Zetasizer User Manual, 2004).

6.5.5 Estructura secundaria

El dicroísmo circular es una técnica de espectroscopía de absorción electrónica que evalúa la estructura secundaria y/o la interacción entre moléculas quirales con luz circular polarizada o moléculas ópticamente activas, es decir, que contengan grupos cromóforos que generen una desviación de la luz polarizada, lo que resulta en una variación en la absorción de los componentes izquierdo y derecho de la luz. Entonces, la señal del dicroísmo circular es la diferencia entre la absorbancia de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha. En este caso, se deben de considerar los espectros de los componentes de las nanopartículas para tener un punto de comparación y sea fácil apreciar los cambios que se dan debido a la interacción de los componentes (Ausar, Joshi, & Middaugh, 2008; Maestre & Wang, 1971; Patiño, 1990; Yilmaz & Chambers, 1984).

6.5.6 Funcionalidad biológica y eficiencia de transfección

Los vectores no virales basados en polímeros pueden ingresar a la célula mediante interacciones de cargas negativas de los proteoglicanos en las membranas de las células o pueden ingresar mediante endocitosis mediada por receptores. Por ejemplo, el receptor de transferrina puede ser ligado a los complejos de quitosán por enlaces disulfuro y así, la conjugación de transferrina a quitosán puede ingresar a la célula por la vía del receptor de transferrina e incrementar teóricamente la eficiencia de transfección (Raftery *et al.*, 2013; Santos-Carballal *et al.*, 2018).

La funcionalidad biológica y la eficiencia de transfección son parámetros que pueden ser determinados *in vitro* y/o *in vivo* con el fin de evaluar la capacidad de las nanopartículas para llegar a las células diana (cuando hay ligandos específicos) y llevar a cabo el proceso de internalización.

En los ensayos *in vitro* se requiere del uso de líneas celulares específicas aprovechando ciertas capacidades de las células, por ejemplo, la replicación celular acelerada de algunas células cancerosas. Para la observación más fácil de la transfección se utiliza un gen reportero; el más utilizado es el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (en este caso el plásmido pEGFP-N1) el cual se ve evidenciado con la expresión de la proteína en las células con ayuda de un microscopio confocal o de epifluorescencia o citometría de flujo (Aranda-Barradas et al., 2018).

En los ensayos *in vivo* se requiere del uso de animales de experimentación, los cuales deben tener las células diana a la que llegarán las nanopartículas, por ejemplo, un xenoinjerto de células tumorales humanas; en este punto se debe decidir una vía de administración eficaz para la llegada de las nanopartículas para una adecuada expresión del gen terapéutico. Para la observación de la funcionalidad biológica en estos modelos de estudio, se deben registrar las características físicas del modelo antes, durante y después del ensayo midiendo, peso, conducta, formación o disminución de tumores y vida, en conjunto con cortes histológicos de los tejidos donde se evalúa la funcionalidad o incluso pruebas de biología molecular como por ejemplo PCR, ELISA o Western Blot (Aranda-Barradas et al., 2018).

La microscopia de fluorescencia confocal es una de las técnicas más utilizadas en las investigaciones de biología y medicina, utilizada para el estudio de la internalización celular de las nanopartículas durante los estudios de transfección. Este microscopio utiliza un rayo láser para escanear en 3 dimensiones a las células o tejidos cargados con fluorocromos específicos (Samaniego, 2009; Santos-Carballal et al., 2018).

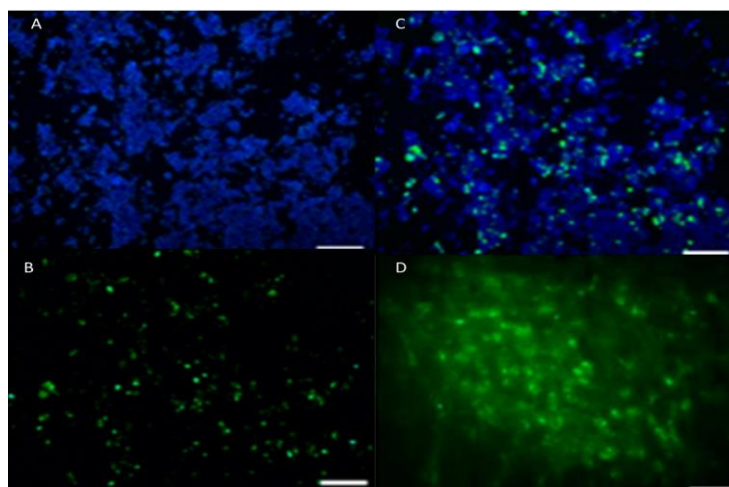


Figura 6. Micrografía confocal de una transfección con NTS-poliplex con pEGFP-N1; A, B y C en un ensayo *in vitro* y D en un ensayo *in vivo* (Aranda-Barradas et al., 2018).

6.5.7 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica automatizada y sensible que permite los análisis multiparamétricos del componente celular en suspensión de una célula individual, a través de las características fisicoquímicas de las células e incluso la expresión de proteínas celulares. Esta técnica emplea anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos, los cuales son detectados por un sistema de detección en el equipo, sin embargo, en el caso de las nanopartículas, no se requiere de anticuerpos debido a que se utiliza la proteína verde fluorescente (pEGFP-N1) como un marcador aprovechando la expresión de esta proteína, determinando el porcentaje de las células transfectadas, o bien la intensidad de la fluorescencia emitida por las células que expresan la proteína de una población total, obteniendo así la eficiencia de transfección (Aranda-Barradas et al., 2018; Suárez, *et al.*, 2015).

7. JUSTIFICACIÓN

La terapia génica es una estrategia innovadora y adaptable para resolver diversos problemas de salud a nivel nacional e internacional de manera eficaz disminuyendo los efectos adversos que ocasionan algunos tratamientos convencionales.

A la fecha, la *Food and Drug Agency* (FDA) ha aprobado tres tratamientos relacionados con terapia génica y diversos prototipos que emplean vectores virales y no virales se encuentran en protocolos clínicos. Es de vital importancia continuar desarrollando nanopartículas para terapia génica basadas en vectores no virales con el objetivo de aumentar la eficiencia de transfección y realizar un envío dirigido de genes terapéuticos (incluyendo aquellos seleccionados para la producción de vacunas), superando así las desventajas que conlleva el uso de los vectores virales (Ginn et al. 2018).

Se ha demostrado que el quitosán puede utilizarse de manera segura y eficaz para el desarrollo de vectores no virales (Roy, K. *et al.*, 1999; Hallaj, *et al.*, 2011). En el presente trabajo se evaluarán las características físicas y funcionalidad biológica de nanopartículas ensambladas mediante diferentes metodologías con quitosán de diferentes pesos moleculares. Estos resultados serán el punto de partida para el desarrollo posterior de nanopartículas que permitan dirigir el efecto terapéutico a tipos celulares determinados mediante ligandos específicos y empleando diversos genes terapéuticos en función de la patología a tratar.

8. HIPÓTESIS

Si se obtienen las características físicas de las nanopartículas de pEGFP-N1: quitosán utilizando diferentes metodologías de ensamblaje y quitosán de diferentes pesos moleculares, entonces se podrá realizar una correlación entre estos parámetros y la funcionalidad biológica de dichas nanopartículas

9. OBJETIVOS

9.1 Objetivo general

Desarrollar y caracterizar física y biológicamente nanopartículas ensambladas por coacervación compleja y gelación ionotrópica empleando quitosán de dos diferentes pesos moleculares y plásmido pEGFP-N1 con el fin de determinar el mejor método de ensamblaje y el efecto del peso molecular del quitosán en las características y funcionalidad de las nanopartículas

9.2 Objetivos específicos

- a) Aislar, cuantificar y confirmar la integridad e identidad del plásmido pEGFP-N1
- b) Determinar la relación molar óptima pEGFP-N1: quitosán para el ensamblaje de nanopartículas por coacervación compleja usando quitosán de dos diferentes pesos moleculares
- c) Estandarizar las condiciones para la síntesis de nanopartículas por gelación ionotrópica
- d) Determinar la forma física de las nanopartículas de pEGFP-N1-quitosán
- e) Determinar el tamaño y carga de superficie de las nanopartículas
- f) Determinar el efecto del peso molecular del quitosán en la funcionalidad biológica de las nanopartículas

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Propagación y aislamiento del plásmido pEGFP-N1

Se inoculó una colonia bacteriana que contiene el plásmido con 500 mL de medio LB con kanamicina 100 µg/mL y con una agitación constante de 300 ciclos por minuto durante 12 horas a una temperatura de 37°C (preparación de soluciones empleadas ver Anexo 1).

10.1.1 Aislamiento y purificación de pEGFP-N1 por la técnica de miniprep

Para el aislamiento del plásmido se tomó 1.5 mL de cultivo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 minutos a una temperatura de 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 100 µL de solución de lisis I (Glucosa 50 mM, TRIS-HCl 0.25 M y EDTA 10 mM) y se agitó mediante el uso de un vortex (científica senna, México). Posteriormente se agregaron 200 µL de solución de lisis II (NaOH 0.2 M y SDS 1%) y 150 µL de la solución de lisis III (Acetato de amonio 8M), realizando una agitación suave después de cada adición y cuidando de no tardar más de 5 minutos en la adición de las soluciones y conservando en hielo en todo momento los reactivos. Al terminar de agregar la solución de lisis III se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C. Al sobrenadante se le añadió 1 mL de etanol al 100% frío, esta se dejó incubando de 30 a 60 minutos a una temperatura de -40 °C. Terminando el tiempo de incubación se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C. La pastilla obtenida se lavó con 350 µL de etanol frío al 70% y se centrifugó bajo las mismas condiciones (2 veces). Al finalizar los lavados se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla en una incubadora Luzeren (Prolab, México) a 37 °C de 5 a 10 minutos. El plásmido se resuspendió en 30 µL de agua inyectable y se le añadió 1 µL de RNAasa y se incubó a 37 °C por 30 minutos para activar la enzima, y para inactivarla se realizó una segunda incubación a 72 °C por 20 minutos (Domínguez, 2016).

10.1.2 Aislamiento y purificación de pEGFP-N1 por la técnica de maxiprep

Se inoculó la bacteria en 500 mL de LB a una temperatura de 37 °C con 30 µL de kanamicina a 100 mg/ µL y se incubó a 37 °C durante 12–16 horas en agitación constante. Para la cosecha, se centrifugó el caldo de cultivo a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C en una centrífuga (Heraeus Primo R, Thermo Fisher Scientific) y con tubos Falcon de 50 mL. El sobrenadante obtenido se decantó y por inversión se dejó secar la pastilla para resuspenderla en 100 mL para un volumen de 10mL para cada tubo de una solución de STE (0.1 M NaCl, 10mM Tris•HCl, 1 mM EDTA) y se llevó a centrifugación a 4000 rpm por

15 minutos a 4 °C para desechar una vez más el sobrenadante y secar la pastilla obtenida. Se procedió a la parte de lisis alcalina para lo cual se resuspendió la pastilla en 1.8 mL (18 mL para volumen total) de solución de lisis I (50 mM Glucosa, 25 mM Tris•HCl, 10 mM EDTA) con agitación en vortex, y posteriormente se añadió 4 mL (40 mL para el volumen total) de la solución de lisis II (0.2 N NaOH y 1% SDS) con una agitación por inversión suave y después de un tiempo de 5-10 minutos a temperatura ambiente se añadieron 2 mL (20 mL para un volumen total) a cada tubo, de la solución de lisis III (5M Acetato de potasio, ácido acético glacial) se mezcló por inversión suave y se dejó reposar por 10 minutos. Se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C y se filtró el sobrenadante con papel filtro Whatman para añadir al sobrenadante 0.6 volumen de isopropanol y centrifugar nuevamente a 5000 rpm por 15 minutos a 25 °C y decantar el sobrenadante. Se lavó con etanol al 70% y se dejó secar a 40 °C en una incubadora Luzeren (Prolab, Jalisco, México) para después resuspender la pastilla en 1.5 mL de agua libre de nucleasas.

Para la purificación del plásmido se añadió 1.5 ml de una solución 5 M LiCl y se centrifugo a 8000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Falcon de 50 mL con un mismo volumen de isopropanol y se centrifugo a 8000 rpm por 15 minutos a 25 °C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70 % para secarla en una incubadora Luzeren (Prolab, Jalisco, México). Una vez seca la pastilla, se procedió a resuspenderla en 250 µL de agua libre de nucleasas que contenía RNAsa (20 µg/mL) y se dejó reposar durante 30 minutos, se pasó la solución a un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL y se le añadieron 250 µL de una solución 1.6 M NaCl/PEG 6000 al 3% y se centrifugó a 12,000 g por 5 minutos a 4 °C en una centrifuga (Velab USA.). Se decantó el sobrenadante y se disolvió la pastilla en 400 µL de agua libre de nucleasas con un volumen igual de fenol-cloroformo para realizar la extracción con fenol-cloroformo, de esta extracción, la fase acuosa se extrajo a un tubo nuevo para microcentrifuga de 1.5 mL, a esta fase acuosa se le añadió 100 µL de acetato de potasio y el doble de volumen de etanol y se dejó reposar durante 12 horas a 4 °C. Al día siguiente se centrifugó a 12,000 g por 5 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante para añadir 200 µL de etanol al 70 % frío. Se centrifugó una última vez a 12,000 g por 2 minutos a 4 °C, el sobrenadante se decantó y se dejó secar la pastilla en una incubadora a 40 °C para que finalmente una vez seca la pastilla, se resuspendió en 500 µL de agua libre de nucleasas y se pudiera proceder a la cuantificación de la concentración (Alejos, Aragon, & Cornejo, 1995; Caballero, Moyano, & Muñoz, 2007; Sambrook. J.; Fritsch, E. 1989; Orfao & Pinto, 2015; Pere Coll, *et al.*, 2005).

10.2 Cuantificación y confirmación de integridad del pDNA

La cuantificación del plásmido obtenido se realizó con un espectrofotómetro Epoch (BioTek, Vermont U.S.A) y el sistema informático Take3 que permite detectar la pureza por

medio del índice 260/280 y la concentración de pDNA (DNA plasmídico) en ng/ μL a una longitud de onda de 260 nm.

La integridad del plásmido se observó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % sobre TAE 1X, y el DNA se evidenció con el colorante GelRed tras la exposición a luz UV en el fotodocumentador (Major Science, USA).

10.3 Confirmación de la identidad del pEGFP-N1 mediante digestión enzimática

La digestión del plásmido se realizó con 3 μg de pDNA, con 0.4 μL de la enzima de restricción y 1 μL del buffer para las enzimas de restricción llevando a un aforo final de 10 μL con agua inyectable y posteriormente se incubó durante 1 hora a 37 °C (Domínguez *et al.*, 2016).

El plásmido utilizado es pEGFP-N1 y la enzima de restricción utilizada es *HindIII* de dos diferentes marcas comerciales. El análisis bioinformático se realizó en la página de BioLabs inc. Nebbcutter (BioLabs, n.d.)

10.4 Determinación del peso molecular de dos lotes de quitosán

Los quitosanos fueron provistos por la Dra. Patricia Miranda Castro. Para la determinación del peso molecular promedio de los dos lotes de quitosán se utilizó el método reportado (Kassai 2007). El peso molecular de cada uno de ellos es de 20.6 y 57.5 KDa y el porcentaje de desacetilación es >85%

10.5 Solubilización del quitosán

El quitosán, por sus propiedades fisicoquímicas, es insoluble en agua y soluble en un medio ácido, por lo que se emplearon 100 mL de una solución de ácido acético al 1%, por cada 1 g de quitosán de 20.6 y 57.5 kDa. Esta mezcla se dejó en agitación continua durante una noche. Al día siguiente se filtró para eliminar residuos del quitosán que no se llegó a disolver y se ajustó el pH a 5.5 en agitación constante, empleando NaOH al 40% para ajustar, y un aforo final de 150 mL con agua destilada.

10.6 Ensamblaje de nanopartículas

Para el ensamblaje de nanopartículas, se realizaron 2 métodos diferentes bajo ciertas condiciones; el primer método es el de coacervación de complejo, en el cual se realizó con y sin contraíón (Na_2SO_4); el segundo método es el de gelación ionotrópica.

10.6.1 Método de coacervación

Para el ensamblaje de las nanopartículas por el método de coacervación y sin un contraíón, primeramente, se prepararon soluciones de 150 μL que contiene plásmido a una concentración de 6nM y quitosán al 0.1%, las cuales se dejaron en agitación durante 30 minutos para que se lleve a cabo la interacción electrostática.

El ensamblaje por el método de coacervación con el uso de un contraíón se realizó preparando soluciones de quitosán al 0.08 % y otra solución de Na_2SO_4 25 mM con pDNA a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ las cuales se calentaron por separado en un termoblock (Lab-Line U.S.) a 55 $^\circ\text{C}$ por 30 minutos, después se añadieron en volumen 1:1 quitosán: Na_2SO_4 -pDNA para un volumen final de 500 μL .

10.6.2 Método de gelación ionotrópica

Los siguientes ensayos se realizaron para la formación de nanopartículas por el método de gelación ionotrópica utilizando quitosán al 1% y 0.08% de los dos diferentes pesos moleculares, previamente procesado en un sonicador (Labconco, USA) durante 1 hora y a un pH ajustado de 5.5. Posteriormente el quitosán fue agregado por goteo a un volumen de tripolifosfato (TPP), el cual es un contraíón, a una concentración de 0.08 y 0.04 % esto en una relación de volumen 4:1 de quitosán:TPP en condiciones de agitación con ayuda de un ultraturrax (Ika, China) con un tiempo aproximado de 1 hora en promedio hasta que terminó el agregado de quitosán al TPP a 14,000 rpm. Finalmente, la solución obtenida fue filtrada con filtros de poro de 1 y 0.45 micras. Se realizaron más ensayos en donde se extrajo la solución ácida y se centrifugaron las nanopartículas en una centrífuga (ScienceMed, Finlandia) para luego resuspender la pastilla en una solución de PBS (solución buffer de fosfatos) a un pH ajustado de 5.5 y donde se les colocó Tween 20 y Tween 80.

10.7 Ensayos de retención electroforética

Las nanopartículas ensambladas utilizando diferentes concentraciones de quitosán de ambos pesos moleculares (20.6 y 57.5 kDa) se corrieron en un gel de agarosa al 1% sobre TAE 1X, y el DNA se evidenció con el colorante GelRed (Biotium, USA) tras la exposición a luz UV en el fotodocumentador (Major Science, USA).

10.8 Ensayo del efecto de protección del quitosán sobre el pDNA

El ensayo se realizó con las nanopartículas formuladas con el método de coacervación con un contraión, el control fue elaborado con pDNA 100 ng/ μ L, una solución 25 mM de Na₂SO₄ y ácido acético 0.1% como sustituto del quitosán en donde fueron incubadas con DNAsa I 40 μ g/mL a una temperatura de 37 °C por 25 minutos, y para detener la actividad enzimática se utilizó una solución *stop* (5 mM GTC y 25 mM Tris•HCl con etanol). Las muestras se trataron con el colorante GelRed y buffer de carga para que se pudieran correr en un gel de agarosa al 1% sobre TAE 1X por 20 minutos a una corriente de 110 V para poder verlo por la exposición de luz UV en un fotodocumentador (Major Science, USA).

10.9 Microscopía electrónica de barrido

Se prepararon las muestras de nanopartículas de pDNA-quitosán y se colocaron en un dispositivo portamuestra (hierro-aluminio), el cual se trató con cinta adhesiva de ambos lados (#5085 SPI-AB-Cu). Las muestras se secaron en una estufa de cultivo Luzeren (Prolab, México) y se preparó con un baño ionizante con oro (Denton DeskV: Denton Vacuum, Moorestown, NJ USA) por 300 segundos. Las micrografías se tomaron en el Laboratorio de microscopía electrónica de barrido ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 (UNAM) utilizando un microscopio electrónico de emisión de campo de barrido (JSM-6010LA: JEOL, Tokio Japón), y principalmente en colaboración con el laboratorio ENES ubicado en Juriquilla utilizando un microscopio electrónico de emisión de campo de barrido (JSM-6060 JEOL, Tokio Japón).

10.10 Dispersión dinámica de luz

Se realizó en un Zetasizer PRO (Malvern Panalytical, Reino Unido) con 3 lecturas por muestra y cada muestra con un tiempo de exposición de 180 segundos, las muestras fueron colocadas en una celda de plástico de 1 cm³ considerando una buena calidad dada

por un rango del índice de polidispersión de 0.1 a 0.5 y con un tamaño promedio por debajo de los 300 nm.

10.11 Determinación de potencial zeta por movilidad electroforética

Se realizó en un ZetasizerPro (Malvern Panalytical, Reino Unido) con 3 lecturas por muestra y cada muestra con un tiempo de exposición de 180 segundos, las muestras fueron colocadas en una celda capilar plegada desechable (DTS1070). Se utilizó el programa Originlab 8.6 para exportar los datos que arrojó el ZetasizerPro y obtener los gráficos correspondientes.

10.12 Ensayos de transfección *in vitro*

Los ensayos de transfección *in vitro* se realizaron en colaboración con el laboratorio 4 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la FES Cuautitlán Campo 4, a cargo del Dr. Carlos Gerardo García Tovar. La línea celular HeLa (ATCC CRM-CCL-2^a) se cultivó en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina/esptreptomicina (5000 IU/mL y 5 µg/mL, respectivamente). Se sembraron 100,000 células por pozo (colocando previamente un cubreobjetos redondo y estéril) en una placa de 24 pozos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora humidificada con una mezcla de 95:5 aire:CO₂ a 37 °C hasta que las células alcanzaron el 50 % de confluencia. Se retiró el medio y se adicionaron 300 µL de la suspensión correspondiente de nanopartículas (20.6NPs y 57.5NPs, respectivamente), con una concentración final de 50 mg/µL de pDNA. También se incluyó un control negativo de plásmido desnudo a la misma concentración. Se adicionaron 2 mL de medio DMEM suplementado con SFB y antibiótico y se incubó por 16 h. Se les cambió el medio con NPs a las células por DMEM suplementado fresco y se incubaron otras 48 h. Se realizó la fijación retirando el medio y adicionando 1 mL de paraformaldehído frío al 4 % en PBS (Solución Buffer de Fosfatos). Se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5 % en PBS por 5 min. Para evaluar los filamentos de actina, las células se incubaron con faloidina marcada con tetrametil rodamina-isotiocianato (TRITC) (Sigma-Aldrich) y se diluyó 1:100 en PBS por 20 min en una cámara húmeda en condiciones de oscuridad. Después, las células se lavaron dos veces con PBS. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando medio de montaje con 4'6-diamino-2-fenilindol (DAPI), para visualizar los núcleos (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Los portaobjetos se observaron en el microscopio Zeiss Axio scope 40 Fluorescence. La sobreposición de las imágenes se realizó utilizando en programa Adobe Photoshop 2021.

10.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Excel utilizando la prueba *t* para dos muestras suponiendo varianzas desiguales y la prueba *t* para medias de dos muestras emparejadas (ver Anexo 2).

11. RESULTADOS

11.1 Extracción, cuantificación y mapeo del plásmido pEGFP-N1

La extracción de plásmido se realizó a pequeña escala (miniprep) y a gran escala (maxiprep), ambas por lisis alcalina. En la tabla 1 y 2 se presentan las concentraciones obtenidas, donde se aprecia a pequeña escala, al partir de un volumen de 1.5 mL de cultivo, se obtiene una gran concentración, pero en menor volumen (30 μL), en contraste con el método a gran escala partiendo de 1L de cultivo, donde se obtiene una concentración menor, pero un mayor volumen (500 μL). Sin embargo, se demuestra que la masa total de plásmido obtenido es mucho mayor que el obtenido por el de la técnica de miniprep. Debido a que la preparación de las nanopartículas requiere de una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y por lo tanto una mayor cantidad de plásmido, se optó por realizar la extracción a mayor escala; el plásmido obtenido de la técnica del miniprep se utilizó para su mapeo.

TABLA 1. Concentración de la extracción de plásmido pEGFP-N1 por miniprep

Muestra	Concentración (ng/ μL)	Muestra	Concentración (ng/ μL)	Volumen total (μL)	Masa total (μg)
1	477.392	7	3,342.74	30	838.084
2	942.101	8	3,150.92		
3	598.55	9	2,933.88		
4	1,840.02	10	3,241.61		
5	3,122.09	11	3,395.84		
6	2,822.05	12	3,370.57		

TABLA 2. Concentración de la extracción de plásmido pEGFP-N1 por maxiprep.

Muestra	Concentración (ng/ μL)	Muestra	Concentración (ng/ μL)	Volumen total (μL)	Masa total (μg)
1	128.16	6	137.99	500	1,506.046
2	421.49	7	130.6		
3	361.0445	8	360.0		

4	65.0425	9	1222.95		
5	73.367	10	436.394		

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 7). En el primer carril se colocó un marcador de peso molecular lambda (Biotools, Madrid, España). En el segundo carril se colocó el plásmido pEGFP-N1 que muestra una banda a un nivel de 5 kbp respecto al marcador de peso molecular. En los carriles 3 y 4 se colocó la digestión del plásmido con las enzimas *HpaI* y con *HindIII* (de diferentes marcas comerciales), en estos carriles se muestran 2 bandas, una de aprox. 3 kbp y otra de aprox. 900 pb (Figura 8a), lo cual coincide con la representación gráfica del gel correspondiente predicho por Nebcutter (Figura 8b).

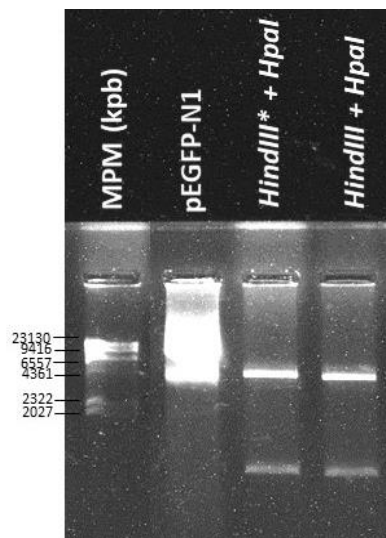


Figura 7. Mapeo de pEGFP-N1. Carril 1: marcador de peso molecular (MPM); Carriles control del plásmido empleado pEGFP-N1, en los carriles 3 y 4 se encuentra la digestión del plásmido pEGFP-N1 con las enzimas *HindIII* y *HpaI* (diferentes marcas de *HindIII*). Electroforesis en gel de agarosa al 1%

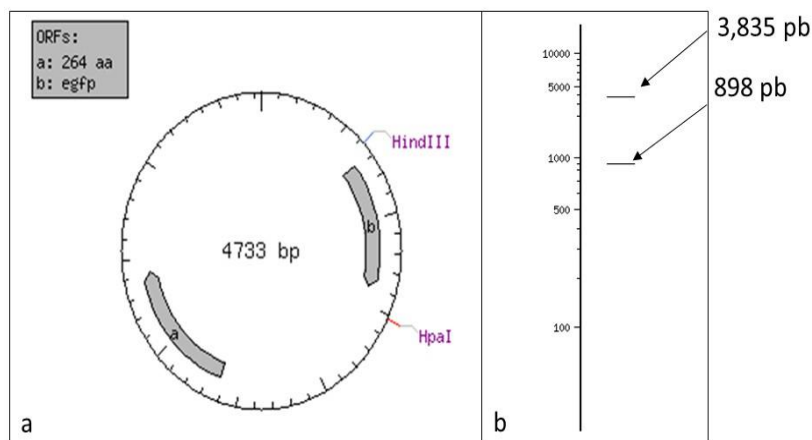


Figura 8. a) Mapa de sitios de corte del plásmido pEGFP-N1 para las enzimas de restricción *HindIII* y *HpaI*. b) Electroforesis teórica obtenida de NEBcutter. Representación gráfica de un gel de agarosa al 1%, que muestra los cortes obtenidos y la cantidad de pares de bases, por la digestión de las enzimas de restricción *HindIII* y *HpaI*.

11.2 Métodos de ensamblaje de nanopartículas

11.2.1 Método de coacervación

11.2.1.1 Determinación de relaciones molares óptimas plásmido: quitosán

El método de ensamblaje de nanopartículas por coacervación se basa en la interacción electrostática entre las cargas positivas del quitosán con las cargas negativas del pDNA; sin embargo, se realizan estudios de retención electroforética para determinar las concentraciones y las relaciones molares óptimas, que permitan la mayor interacción entre el pDNA y el quitosán y las nanopartículas tengan las características de forma, tamaño y carga de superficie adecuadas para ser funcionales. Para el primer ensayo (Figura 9a) se optó por probar relaciones molares crecientes plásmido:quitosán de 1:12 a 1:36 para los dos quitosanes de 20.6 y 57.5 kDa, en donde se incluyó como control pDNA (6nM). Se observa una banda característica como se esperaba; sin embargo, en el resto de los carriles se evidencia que la migración del plásmido permanece constante, por lo que las relaciones molares probadas no son las óptimas para que exista una interacción total del pDNA con el quitosán, ya que se esperaba un retardo en la migración o incluso una retención de los complejos en los pozos tras la neutralización de cargas por la interacción. Se realizó otro ensayo de retención (Figura 9b) aumentando la cantidad de quitosán para obtener relaciones molares de 1:27 a 1:51; sin embargo, la migración del plásmido aún es comparable con la del carril control. Se aumentó una vez más la relación molar con ambos quitosanes (1:39 a 1:63), con resultados similares a los casos anteriores (Figura 9c), por lo que se decidió aumentar la concentración del quitosán en los sistemas y manejarla en porcentajes totales de quitosán por muestra (Figura 9d-f). Se evidenció la retención del plásmido en los pozos en las figuras 10d-f, y con ello, la concentración óptima para el ensamblaje de las nanopartículas (0.1%), ya que a esta concentración se aprecia el inicio de la desaparición de la banda en los pozos, lo que indica que hay una interacción total del pDNA con el quitosán que forma estructuras tan compactas que no permiten la entrada del colorante para su interacción con el DNA. Cabe aclarar que los ensayos se realizaron con concentraciones crecientes de quitosán (en ambos casos), mientras que la concentración de plásmido permaneció constante en 6nM.

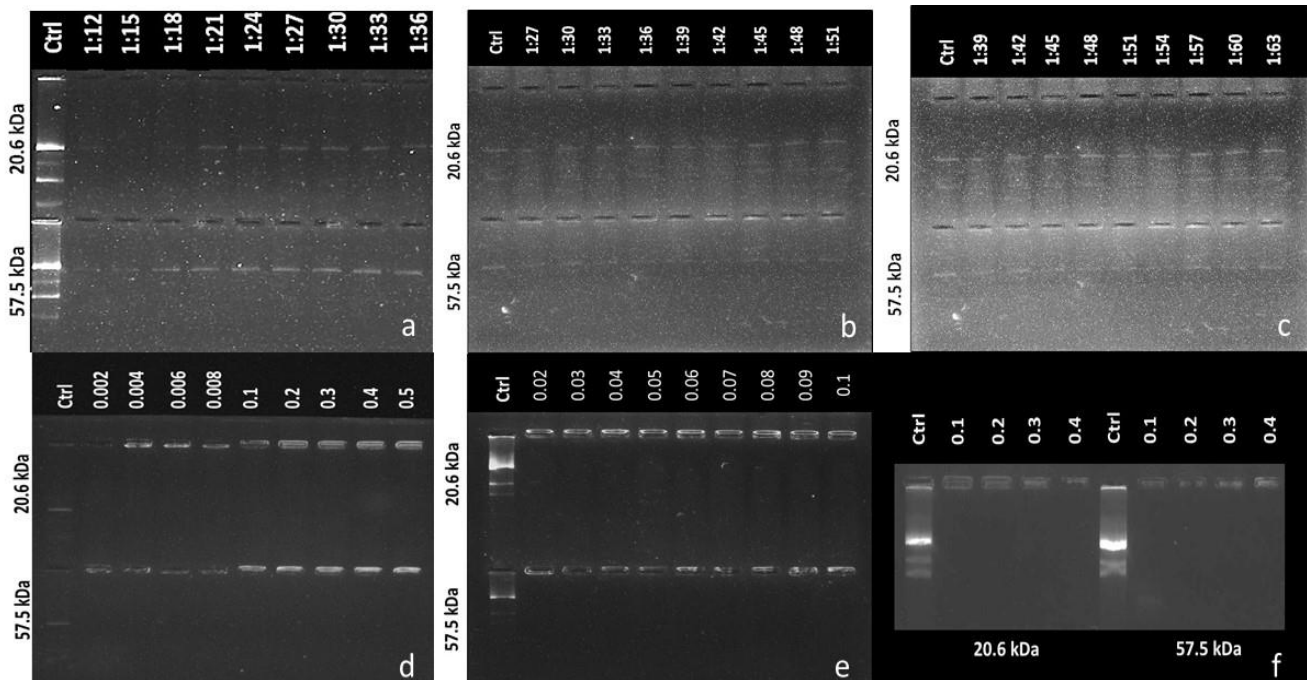


Figura 9. Ensayos de retención electroforética para la determinación de la relación molar óptima pEGFP-N1: quitosán de 20.6 y 57.5 kDa revelado en gel de agarosa al 1%. a) en relación molar de 1:12-1:36. b) en relación molar de 1:27-1:51. c) en relación molar de 1:39-1:63. d) en concentración de 0.002-0.5 %. e) En concentración de 0.02-0.1 %. f) en concentración de 0.2-1.8 %. g) nanopartículas en concentraciones de 0.1-0.4 %; con una concentración 6 mM de plásmido

11.2.1.2 SEM de nanopartículas por el método de complejo de coacervación

Una vez determinada la relación molar óptima de plásmido:quitosán, que fue a una concentración de 0.1% para ambos pesos moleculares del quitosán empleando pDNA 6nM, las muestras se analizaron por SEM para conocer la forma física. Se observó la formación de una placa que se atribuye a quitosán libre que impide ver las nanopartículas en ambas muestras de ambos pesos moleculares de quitosán (Figura 10 y 11), incluso cambiando de campo o incrementando el aumento. Sin embargo, en la figura 11c, se alcanzan a observar ligeras estructuras redondeadas y al medirlas muestran un tamaño promedio aproximado de 451 nm (Figura 11d).

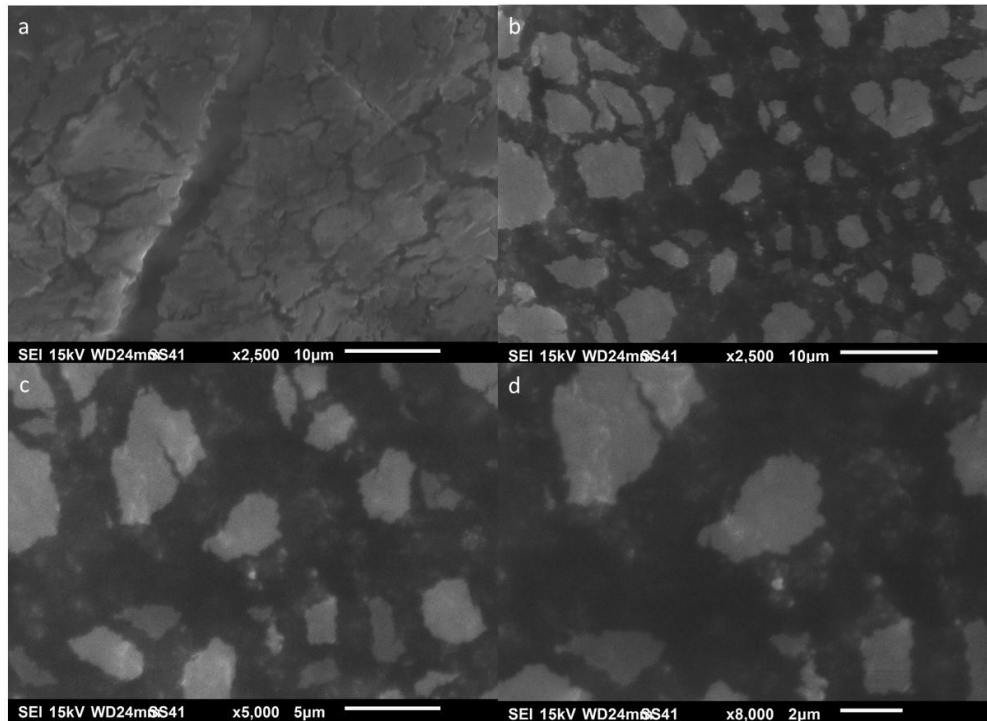


Figura 10. Micrografía en SEM de nanopartículas preparadas con quitosán de 20.6 kDa a) a una concentración de 0.1% a un aumento de 2500x. b) en un segundo campo. c) a un aumento de 5000x. d) a un aumento de 8000x.

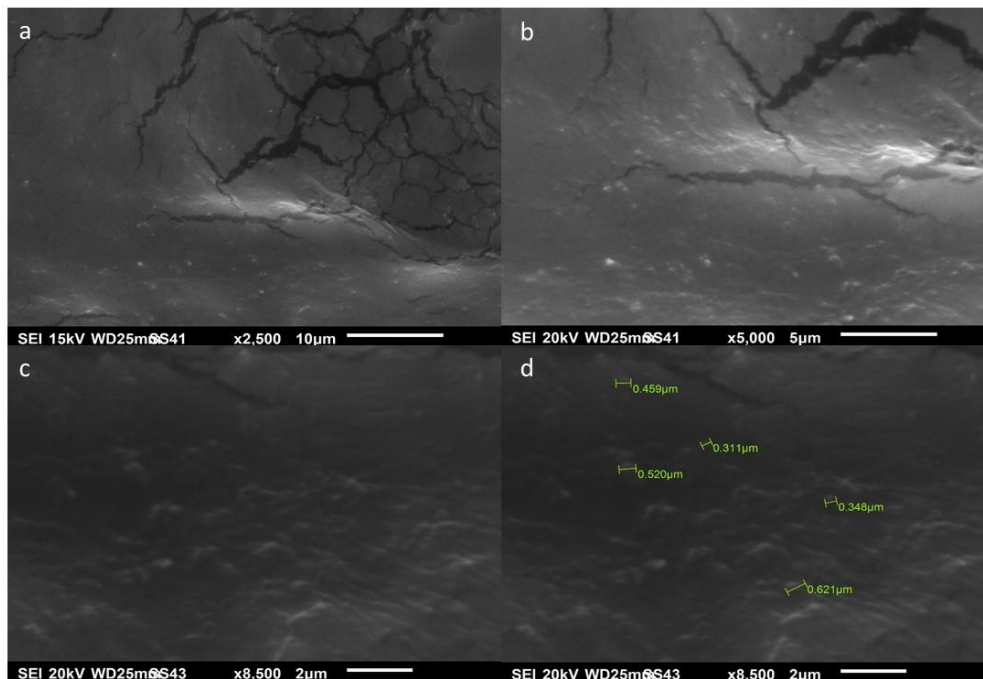


Figura 11. Micrografía en SEM de nanopartículas preparadas con quitosán de 57.5 kDa a) a una concentración de 0.1% a un aumento de 2500x. b) a un aumento de 5000x. c) a un aumento de 8500x. d) a un aumento de 8500x. Con aparentes nanopartículas de diferente tamaño.

Como una medida para evitar la formación de la placa de quitosán formada por el excedente de este, se optó por utilizar el método de gelación ionotrópica con el uso del contraión Tripolifostato (TPP) para la formación de nanopartículas y su posterior acoplamiento con el plásmido (Gaspar et al., 2011).

11.2.2 Formación de nanopartículas de quitosán-TPP por el método de gelación ionotrópica

Al observarse la placa de quitosán en las muestras realizadas por el método de coacervación (Figuras 10 y 11), se optó por el uso de un contraión, en específico el tripolifosfato (TPP) para obtener en primer lugar nanopartículas de quitosán-TPP y posteriormente acoplar el plásmido a las mismas. Para esto se realizaron diversos ensayos para estandarizar las condiciones óptimas de trabajo en cuanto a concentraciones, agitación y volúmenes con las que se puedan formar dichas nanopartículas y cuyo tamaño sea de entre 100 y 300 nm. Los parámetros de quitosán y de TPP se presentan en la tabla 3, y aplicaron para el quitosán de 20.6 y 57.5 kDa.

TABLA 3. Parámetros establecidos para los ensayos de gelación ionotrópica

Sistema	Quitosán 1%	TPP %	Relación Q:TPP
1	0.1	0.08	4:1
2	0.08	0.04	4:1

*Q:TPP.- relación de quitosán con tripolifosfato en volumen-volumen.

Parámetros para ambos pesos moleculares de quitosán (20.6 y 57.5 kDa).

Los primeros ensayos consistieron en agregar el TPP al quitosán en agitación magnética, en estas muestras el sistema se precipitó aun en agitación continua. La segunda experimentación consistió en agregar por goteo el quitosán al TPP en agitación magnética y, aunque se observó una suspensión homogénea por más tiempo, el sistema se precipitó, por lo que se empleó el ultraturrax a una velocidad de 14,000 rpm y una sonicación de 10 ciclos de 180 segundos cada ciclo; sin embargo, las nanopartículas se precipitaron después de un día en refrigeración. Cabe aclarar, que la temperatura en la formación de las nanopartículas en los diferentes ensayos se mantuvo constante a 25 °C; de igual manera el pH de 5.5

11.2.2.1. SEM de nanopartículas de quitosán-TPP por el método de gelación ionotrópica.

En la Figura 12 se muestra la micrografía de nanopartículas preparadas con quitosán de bajo peso molecular (20.6 kDa) en donde se aprecia aún una capa de quitosán y se observan algunas nanopartículas con un tamaño aproximado de 900 nm que parecieran cubiertas o incrustadas en la placa de quitosán (Figura 12a).

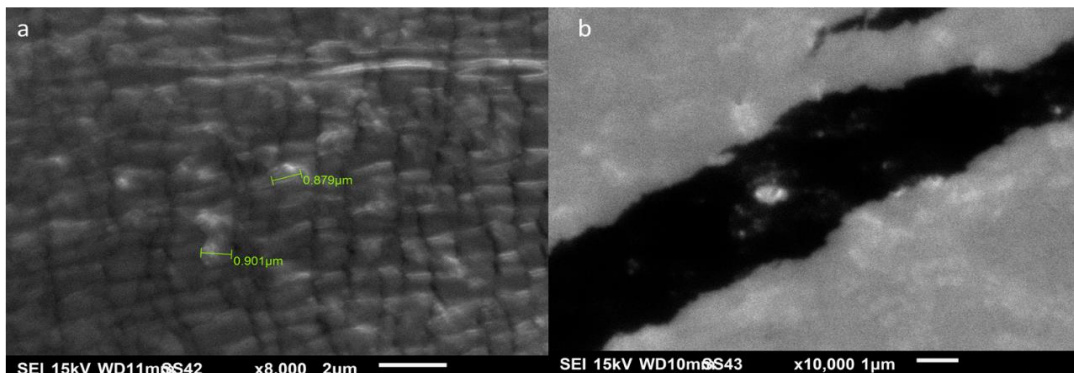


Figura 12. Micrografía en SEM de quitosán de 20.6 kDa. a) concentraciones de 0.08%:0.04% Q:TPP en donde se muestran nanopartículas de 900 nm de diámetro en un aumento de 8,000X. b) un aumento de 10,000X

En la figura 13 se muestran las nanopartículas preparadas con el quitosán de alto peso molecular (57.5 kDa) con y sin el uso del detergente Tween 80 como estrategia para mantener el sistema en suspensión con la posible disgregación de la placa de quitosán; sin embargo, en ambos casos se sigue observando, lo que impide la visualización directa de las nanopartículas.

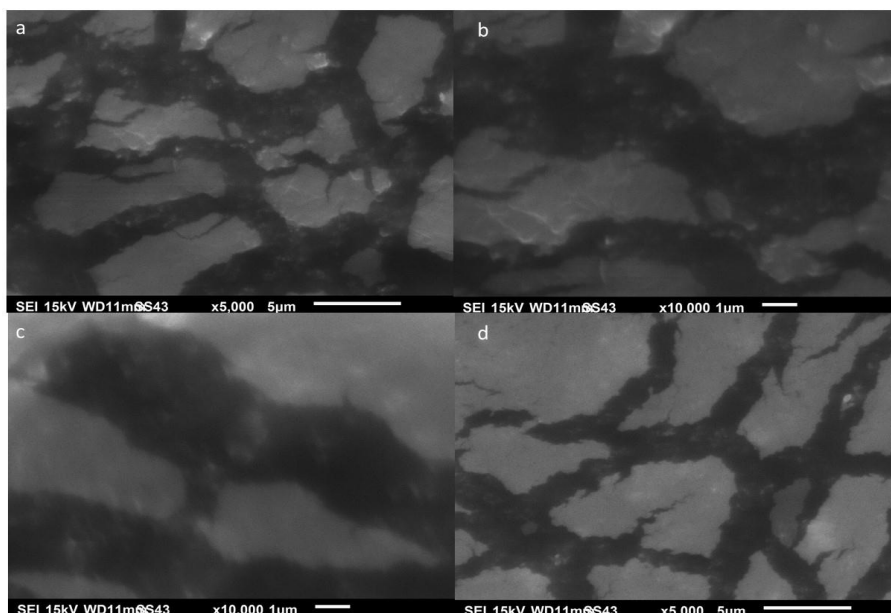


Figura 13. Micrografía en SEM de nanopartículas preparadas con quitosán de 57.5 kDa. a) concentraciones 0.08%:0.04% Q:TPP a un aumento de 5,000x. b) a un aumento de 10,000x. c) a un aumento de 10,000x con Tween 80. d) a un aumento de 5,000x con Tween 80.

11.2.3 Ensamblaje de nanopartículas por el método de coacervación incrementando la fuerza iónica

Como ya se mencionó, siempre hay una interacción entre las cargas del quitosán con las cargas del pDNA. Sin embargo, puede que exista un exceso de quitosán y este quitosán libre sea el causante de la formación de la placa que se observa en el SEM en las figuras 10 a la 13. Una manera de superar esto, es aumentando la concentración de plásmido disuelto a su vez en una solución que proporcione también la fuerza iónica suficiente con el fin de lograr una mayor cantidad de nanopartículas en suspensión evitando así la formación de placas de quitosán excedente. Asimismo, se evaluó la filtración para descartar moléculas grandes de quitosán libre o de nanopartículas agregadas. Para esto, se realizaron ensayos utilizando Na_2SO_4 como proveedor adicional de iones con el fin de incrementar la fuerza iónica para la formación de las nanopartículas con quitosán de 57.5 y 20.6 kDa a una concentración de 0.08%, y pDNA a 64 nM disuelto en 25 mM de Na_2SO_4 , bajo dos condiciones: sin filtrar y filtrado con un poro de 0.45 μm . La interacción se evaluó mediante un ensayo de retención electroforética, en el cual se evidencia la retención del plásmido en los pozos de los carriles del 2 al 5 (tanto en nanopartículas filtradas y sin filtrar) en comparación con el carril 1 control en donde se observa el plásmido libre, lo que confirma la interacción de ambos componentes con estas condiciones (Figura 14).

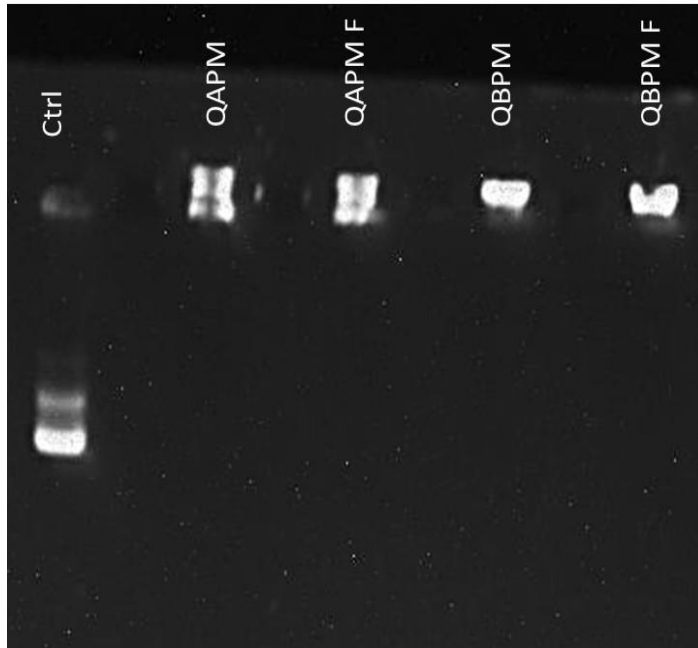


Figura 14. Ensayo de retención electroforética del ensamblaje de nanopartículas por el método de coacervación. QAPM; quitosán de alto peso molecular, QAPM F; quitosán de alto peso molecular filtrado, QBPM; quitosán de bajo peso molecular, QBPM F; quitosán de bajo peso molecular filtrado.

11.2.3.1 Ensayo del efecto de protección del quitosán sobre el pDNA

En la figura 15 se observa la degradación del pDNA desnudo por acción de la DNAsa I. En contraste, las muestras correspondientes a las nanopartículas quitosán-pDNA se observaron íntegras tras la exposición a esta enzima, lo que confirma la interacción entre el quitosán y el pDNA y la formación de una estructura estable donde el pDNA queda protegido en ambos casos (quitosán de 20.6 y de 57.5 kDa).

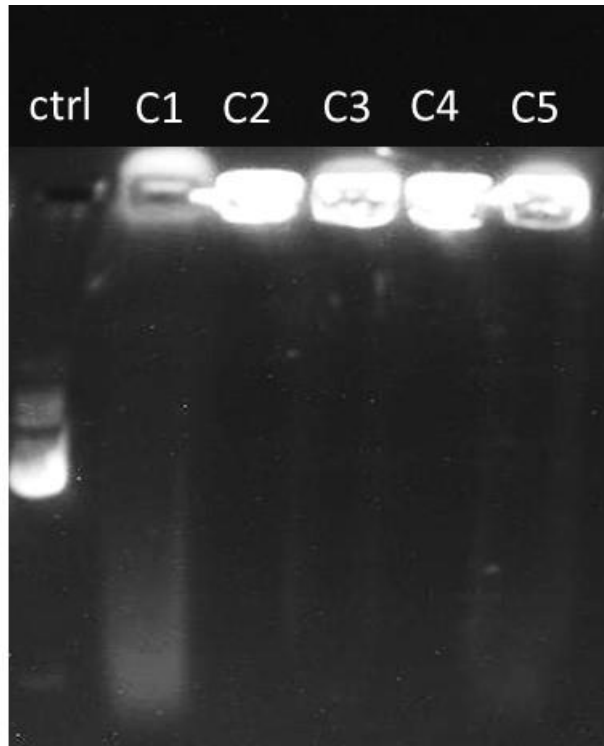


Figura 15. Gel de agarosa al 1%. Ctrl: pDNA, Na₂SO₄ y ácido acético; C1 pDNA, Na₂SO₄, ácido acético y DNAsa I ; C2: nanopartículas con quitosán de 57.5 kDa; C3: C2 con DNAsa I; C4: nanopartículas con quitosán de 20.6 kDa; C5: C4 con DNAsa I

11.2.3.2 SEM de nanopartículas ensambladas por el método de coacervación compleja aumentando la fuerza iónica

Las nanopartículas formadas con el método de coacervación compleja elevando la concentración de plásmido y la fuerza iónica parecen mostrar un mejor comportamiento y formación de éstas, ya que, con el quitosán de 20.6 kDa (NPs 1) (Figuras 16 y 17) muestran un tamaño promedio de 98 nm. Éstas formaron estructuras semejantes a racimos (Figura 17c).

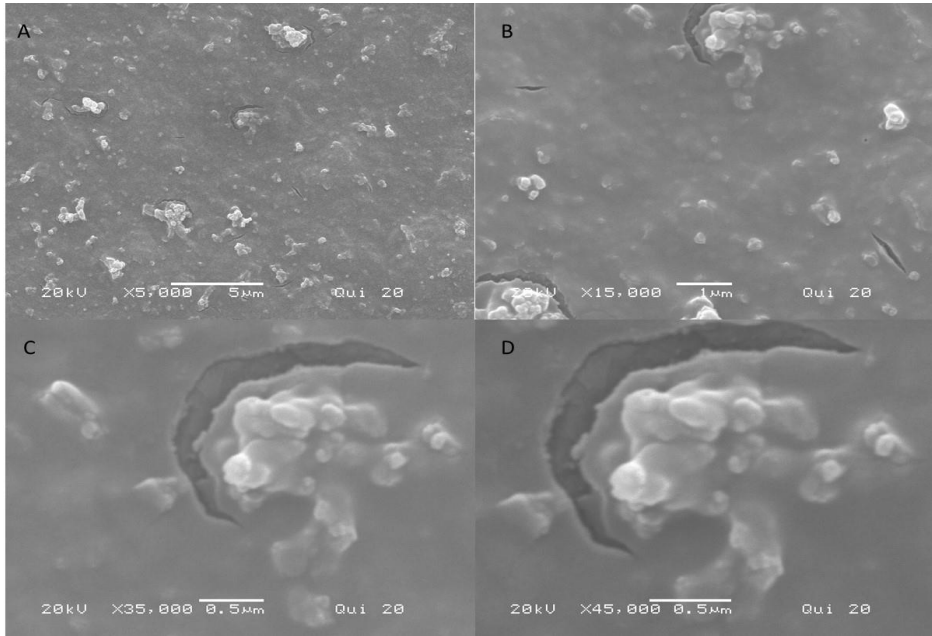


Figura 16. Micrografía en SEM de nanopartículas quitosán (20.6 kDa)-pDNA. a) a un aumento de 5,000x. b) a un aumento de 15,000x. c) a un aumento de 35,000x. d) a un aumento de 45,000x en donde se muestra el mismo campo con nanopartículas agrupadas

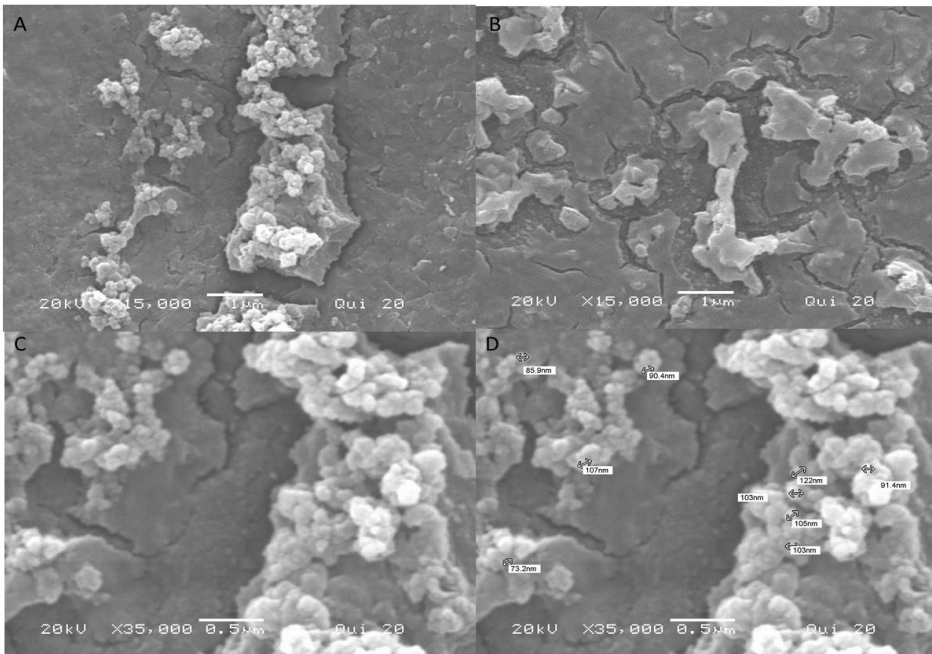


Figura 17. Micrografía en SEM de nanopartículas quitosán (20.6 kDa)-pDNA. a) a un aumento de 15,000x. b) a un aumento de 15,000x. en un segundo campo c) a un aumento de 35,000x. d) misma imagen que inciso “c)” pero con medidas de las nanopartículas presentes con un tamaño promedio de 98nm.

En el caso de las nanopartículas formadas con el quitosán de 57.5 kDa (NPs 2) (Figuras 18 y 19) se observan tamaños de entre 160 (Figura 19b) y 200 nm (Figura 19d), y

de igual manera se observan agrupaciones de las nanopartículas, pero con un contorno más delimitado.

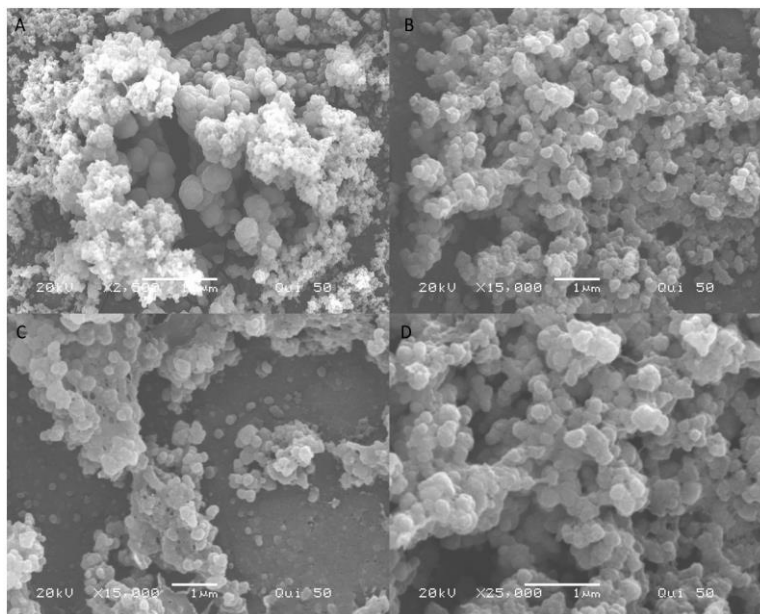


Figura 18. Micrografía en SEM de nanopartículas quitosán (57.5 kDa)-pDNA. a) a un aumento de 2,500x. b) a un aumento de 15,000x. c) a un aumento de 15,000x. d) a un aumento de 25,000x. En donde se muestra el mismo campo con nanopartículas agrupadas.

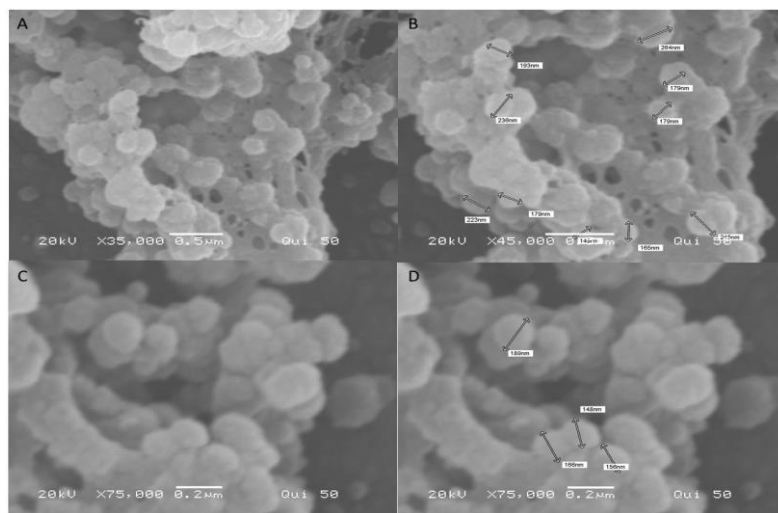


Figura 19. Micrografía en SEM de nanopartículas quitosán (57.5. kDa)-pDNA. a) a un aumento de 35,000x. b) micrografía de inciso “a)” con medidas de las nanopartículas presentes con un tamaño promedio de 200 nm. c) a un aumento de 75,000x. d) micrografía de inciso “c)” con medidas de las nanopartículas presentes con un tamaño promedio de 164 nm.

11.3 Determinación de tamaño de partícula y carga de superficie

11.3.1 Nanopartículas por el método de gelación ionotrópica

Al determinar el tamaño de las nanopartículas (Tabla 4) se encontró que la calidad de la lectura no era confiable; el índice de polidispersión estaba arriba de 1.0 y el tamaño promedio era de 1000 nm. Al tener estos resultados, los siguientes ensayos se prepararon con los mismos parámetros de la tabla 3, las mismas condiciones de sonicación y de agitación en ultraturrax, pero a diferencia del ensayo anterior se filtró con poros de 1 y 0.45 μm con el fin de descartar los agregados. En este caso, los resultados de la determinación de tamaño de partícula (Tabla 4) arrojaron una calidad de lectura confiable, con un índice de polidispersión menor a 0.339 y un tamaño de 392.3 nm en el caso del quitosán de 57.5 kDa filtrado con poro de 0.45 y con una concentración Quitosán:Tripolifosfato (Q:TPP) de 0.08:0.04 % (sistema 2 de la tabla 3). En el caso del quitosán de 20.6 kDa con las mismas condiciones del sistema 2 (Tabla 3), se obtuvo un resultado confiable en la calidad de lectura, un índice de polidispersión de 0.179 y un tamaño promedio de 265.3 nm, por lo que es un resultado aceptable en ambos casos. Anticipando el uso de las nanopartículas para el estudio *in vitro*, se cambió el medio en el que estaban suspendidas, por un medio de PBS con fin de no dañar las células con un medio muy ácido. La lectura en Zetasizer de estas muestras arrojó que el medio altera la polidispersión en la suspensión, pero no altera significativamente el tamaño de las nanopartículas, y la forma física de acuerdo con el análisis en SEM (Figura 12 y 13). Para evitar la aglomeración se realizaron ensayos con detergentes como el Tween 20 y 80, que se encargan de romper agregados que se encuentren en el sistema; sin embargo, en la determinación de tamaño de partícula (tabla 4), el índice de polidispersión en estas muestras está por encima de 0.5, por lo que el tamaño de las nanopartículas está muy polidisperso, lo que sugiere la presencia de agregados de tamaños elevados y genera una deficiencia en el ajuste a la función de correlación y a su vez una mala calidad de lectura.

TABLA 4. Resultados obtenidos en el Zetasizer a las diferentes condiciones de trabajo con las nanopartículas de quitosán-tripolifosfato.

		Condiciones de las nanopartículas								
		Quitosán 57.5 kDa				Quitosán 20.6 kDa				
		0.1:0.08		0.08:0.04		0.1:0.08		0.08:0.04		
		Concentración de Q:TPP (%)	0.45	1	0.45	1	0.45	1	0.45	1
Resultados de Zetasizer	Medio ácido	Calidad de medición	MALA	BUENA	BUENA	MALA	MALA	MALA	BUENA	BUENA
		l _{pd}	0.3	0.33	0.33	0.53	1	0.67	0.17	0.4
		Tamaño (nm)	945	901.7	392.3	697	330	665.5	265.3	511.8
	PBS	Calidad de medición	ND	ND	MALA	ND	ND	ND	MALA	ND
		l _{pd}	ND	ND	0.82	ND	ND	ND	0.77	ND
		Tamaño (nm)	ND	ND	353.26	ND	ND	ND	229.73	ND
	PBS / Tween 20	Calidad de medición	ND	ND	MALA	ND	ND	ND	MALA	ND
		l _{pd}	ND	ND	1	ND	ND	ND	0.52	ND
		Tamaño (nm)	ND	ND	2481	ND	ND	ND	477.6	ND
	PBS / Tween 80	Calidad de medición	ND	ND	MALA	ND	ND	ND	MALA	ND
		l _{pd}	ND	ND	0.78	ND	ND	ND	0.48	ND
		Tamaño (nm)	ND	ND	230.7	ND	ND	ND	457.3	ND

*Relación Q:TPP, relación quitosán:tripolifosfato. * *l_{pd}*: índice de polidispersión. *ND: no determinado. *Calidad de medición mala: se refiere a que la distribución de las nanopartículas en la población de estas es muy polidispersa y no se obtuvo una función de correlación correctamente ajustada. Calidad de medición buena: se refiere a que la distribución de las nanopartículas en la población de estas más uniforme.

11.3.2 Determinación de tamaño de partícula y carga de superficie de las nanopartículas por el método de coacervación

La determinación de tamaño y carga de superficie de las nanopartículas formuladas con el método de coacervación denominadas “NPs Na₂SO₄”, con un pH de 5.5, arrojó buenos resultados en potencial Z, tamaño promedio de las nanopartículas y en el índice de polidispersión (Tabla 5). Se realizó un análisis estadístico para confirmar la reproducibilidad. En la tabla 6 se muestran los promedios de los parámetros con sus respectivos intervalos de confianza. Los resultados arrojados del tamaño promedio de las nanopartículas indican una diferencia de 100 nm entre las NPs 1 (nanopartículas preparadas con quitosán de 20.6 kDa) y las NPs 2 (nanopartículas preparadas con quitosán de 57.5 kDa), ambas sin superar los 300 nm (Figura 20) y con un índice de polidispersión menor a 0.5, indicando que la población de las nanopartículas es homogénea respecto al tamaño. En la figura 21 se muestran los gráficos de distribución arrojados por el potencial Z de las NPs 1 y 2, y los componentes de las nanopartículas (quitosán y el plásmido), en donde se observa la

alteración en el potencial Z de ambos componentes tras su interacción; la carga neta positiva del quitosán y la carga neta negativa del pDNA tienden a neutralizarse en las nanopartículas ensambladas, con lo que también se confirma por este medio la interacción entre ambos componentes.

En la tabla 6 se introduce el valor de p para dos colas arrojados de la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales, en donde un valor de p menor a 0.05 ($P < 0.05$) indica una diferencia significativa entre las nanopartículas preparadas con distintos pesos moleculares, estos valores de p son menores a 0.1 ($p < 0.01$) por lo que indican que hay una mayor diferencia entre ambas nanopartículas. En las figuras 22, 23 y 24 se muestran histogramas comparativos entre las NPs 1 y 2, con los valores arrojados de la tabla 7, respecto al tamaño, índice de polidispersión y el potencial Z.

TABLA 5. Resultados obtenidos en el Zetasizer Pro para las nanopartículas realizadas con Na₂SO₄-pDNA/quitosán

Nanopartículas de quitosán 20.6 kDa				Nanopartículas de quitosán de 57.5 kDa			
	"Z" (mV)	Tamaño (nm)	Ipd		"Z"	Tamaño (nm)	Ipd
NPs 1	16.73	100	0.2967	NPs 1	26.36	216.8	0.2861
NPs 1	17.77	109.5	0.2613	NPs 1	23.94	156.7	0.5594
NPs 1	18.06	112.7	0.2764	NPs 1	26.21	231.4	0.4077
NPs 2	16.29	87.62	0.2406	NPs 2	25.02	179.8	0.4047
NPs 2	15.82	100.9	0.2559	NPs 2	25.21	185.8	0.5686
NPs 2	17.22	104.8	0.2389	NPs 2	25.84	207.4	0.4326
NPs 3	20.81	120.9	0.3159	NPs 3	26.37	132.4	0.5103
NPs 3	20.41	117.2	0.3027	NPs 3	25.79	169.6	0.5443
NPs 3	15.74	127.2	0.3893	NPs 3	27.07	175	0.5368
NPs 4	12.8	121.9	0.206	NPs 4	20.42	165.2	0.4337
NPs 4	17.18	ND	ND	NPs 4	20.07	ND	ND
NPs 4	15.86	ND	ND	NPs 4	19.6	ND	ND
NPs 5	16.39	214.2	0.047	NPs 5	26.13	484.1	0.344
NPs 5	16.76	ND	ND	NPs 5	12.97	ND	ND
NPs 5	16.04	ND	ND	NPs 5	14.05	ND	ND

*NPs: nanopartículas, * Ipd: índice de polidispersión, *ND: Prueba no determinada,
 **"Z": potencial Z, *NPs 1-3: nanopartículas recién preparadas *NPs 4 y 5:
 nanopartículas con 30 días de anaquel a 4°C.

TABLA 6. Promedios de los resultados obtenidos en la tabla 5 con su respectivo valor de p

	Tamaño (nm)	P(T<=t) dos colas	Potencial "Z" (mV)	P(T<=t) dos colas	l _{pd}	P(T<=t) dos colas
NPs 1	119 ± 20	0.011	17 ± 0.9	5.848E-05	0.257 ± 0.050	5.687E-14
NPs 2	209 ± 56		23 ± 2.3		0.457 ± 0.055	

*l_{pd}: índice de polidispersión, *NPs 1: nanopartículas preparadas con quitosán de 20.6 kDa, *NPs 2: nanopartículas preparadas con quitosán de 57.5 kDa.

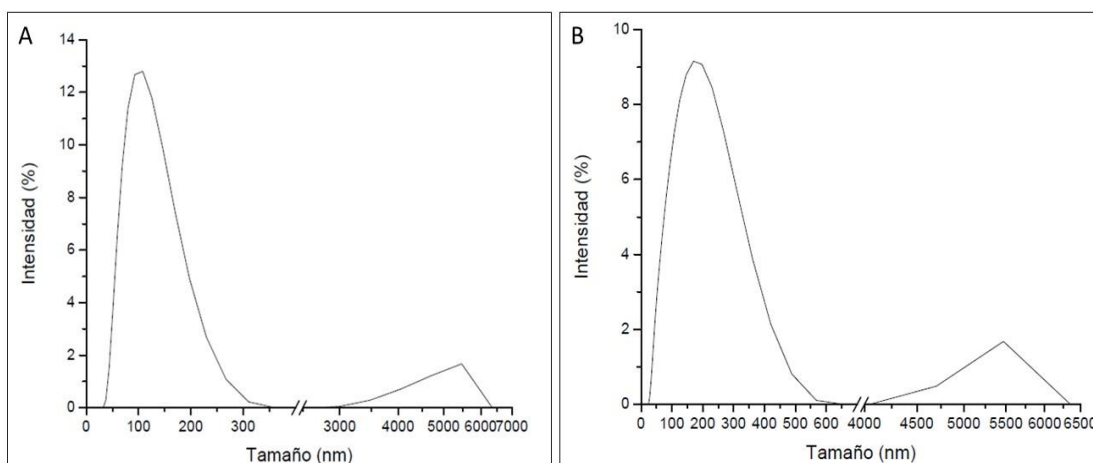


Figura 20. Gráficos representativos de distribución de tamaño de las nanopartículas preparadas con quitosán de 20.6 (A) y 57.5 kDa (B).

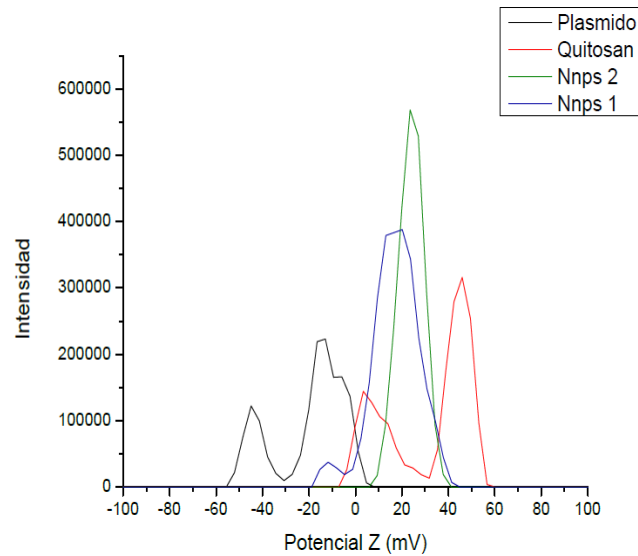


Figura 21. Gráfico de distribución del potencial Z. *NPs 1: Nanopartículas preparadas con quitosán de 20.6 kDa; *NPs 2: nanopartículas preparadas con quitosán de 57.5 kDa.

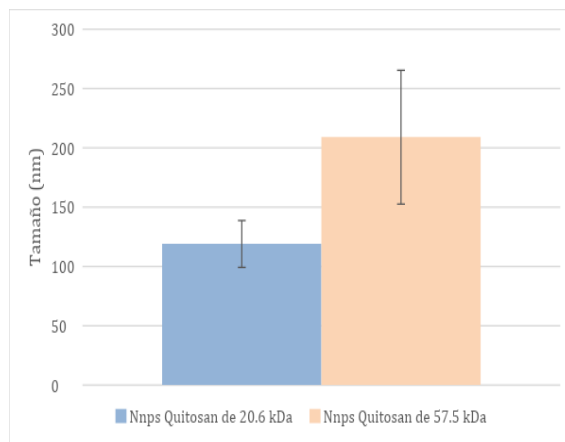


Figura 22. Histograma comparativo del tamaño de las nanopartículas con sus intervalos de confianza. *Hay una diferencia significativa entre ambas nanopartículas ($p < 0.05$)*

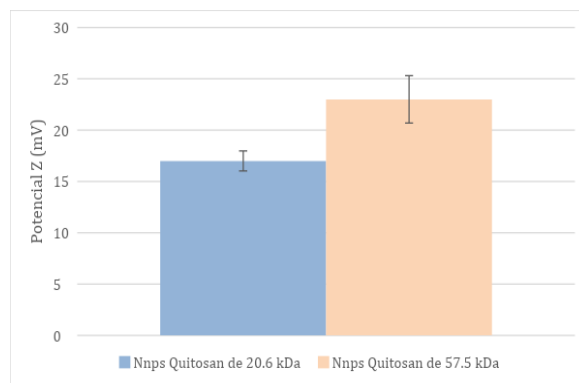


Figura 23. Histograma comparativo del potencial Z de las nanopartículas con sus intervalos de confianza. *Hay una diferencia significativa entre ambas nanopartículas ($p < 0.05$)*

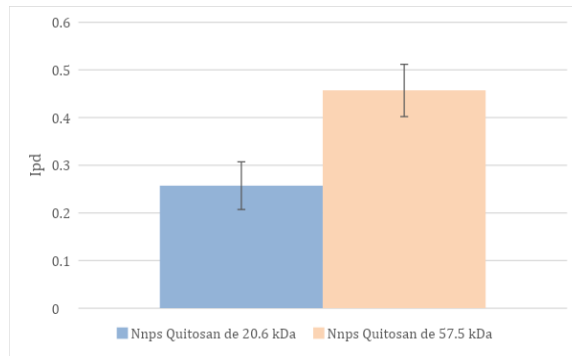


Figura 24. Histograma comparativo del índice de polidispersión de las nanopartículas con sus intervalos de confianza. *Hay una diferencia significativa entre ambas nanopartículas ($p < 0.05$)*

En la tabla 7 y en la figura 25 se muestra la comparación del potencial Z de nanopartículas recién preparadas (tiempo 0) y después de 30 días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C con el objetivo de determinar su estabilidad con el paso del tiempo. Se encontró que entre las NPs 1 no se encuentra una diferencia significativa, ya que el valor de p es mayor a 0.05 ($0.4 > 0.05$), mientras que en las NPs 2 sí se encuentra una diferencia significativa, por lo tanto, en estas nanopartículas, el tiempo y condiciones de almacenamiento repercuten en sus características, incrementando su potencial Z (Figura 25).

TABLA 7. Prueba de dos colas para el potencial Z para nanopartículas recién preparadas y con 30 días de almacenamiento.

	Potencial "Z" (mV)	P(T<=t) dos colas	Interpretación
NPs 1 recién preparadas	17.65 ± 1.21	0.405	No hay diferencia significativa
NPs 1 (30 días de anaquel)	15.83 ± 1.25		
NPs 2 recién preparadas	25.75 ± 0.60	0.031	Si hay diferencia significativa
NPs 2 (30 días de anaquel)	18.87 ± 3.83		

*NPs 1: nanopartículas preparadas con quitosán de 20.6 kDa, *NPs 2: nanopartículas preparadas con quitosán de 57.5 kDa

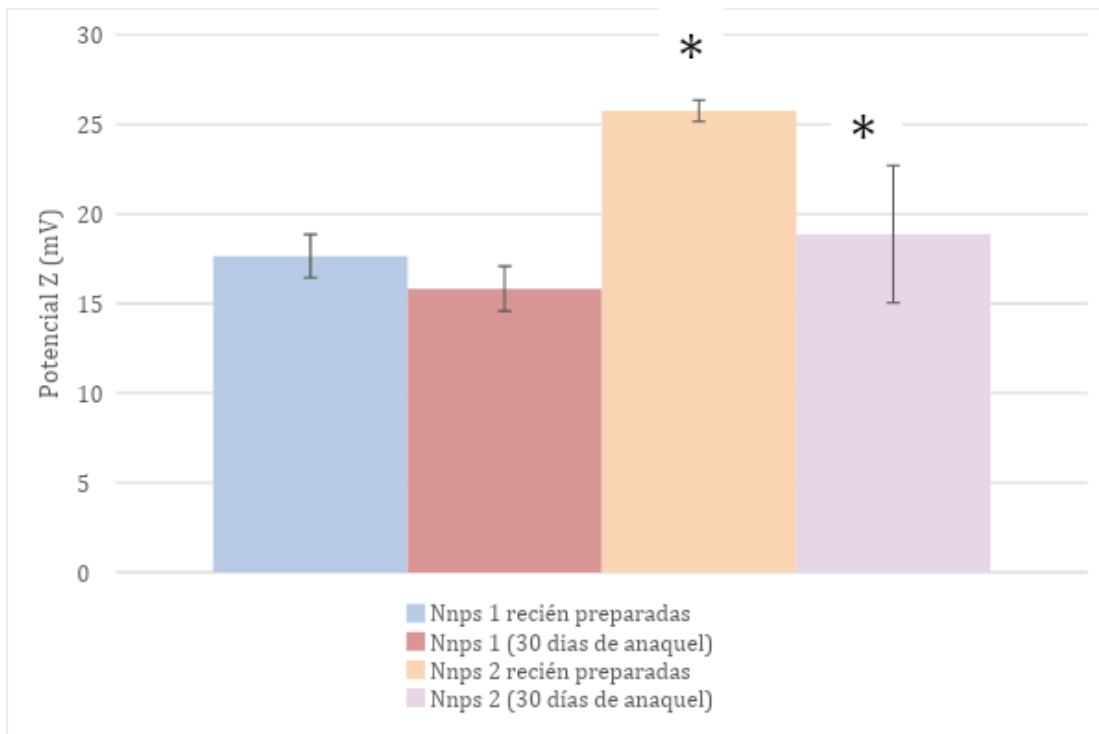


Figura 25. Histograma comparativo del potencial Z de las nanopartículas recién preparadas y con 30 días de almacenamiento. * $P < 0.1$ hay una diferencia significativa entre ambas nanopartículas*

11.4 Determinación de funcionalidad biológica

En la figura 26 se puede observar la eficiencia de transfección para las NPs 1 (20.6NPs) y las NPs 2 (57.5NPs) mediante ensayos de transfección *in vitro* utilizando la línea celular HeLa. A pesar de que se aprecia expresión de la proteína verde fluorescente con ambas nanopartículas, se evidencia que las NPs1 presentan una mayor expresión de esta proteína. Se observa que las señales de fluorescencia en color verde co-localizan con las tinciones de actina (con faloidina rodaminada) y de los núcleos (con DAPI), por lo tanto, puede descartarse que la fluorescencia en verde corresponda a artefactos.

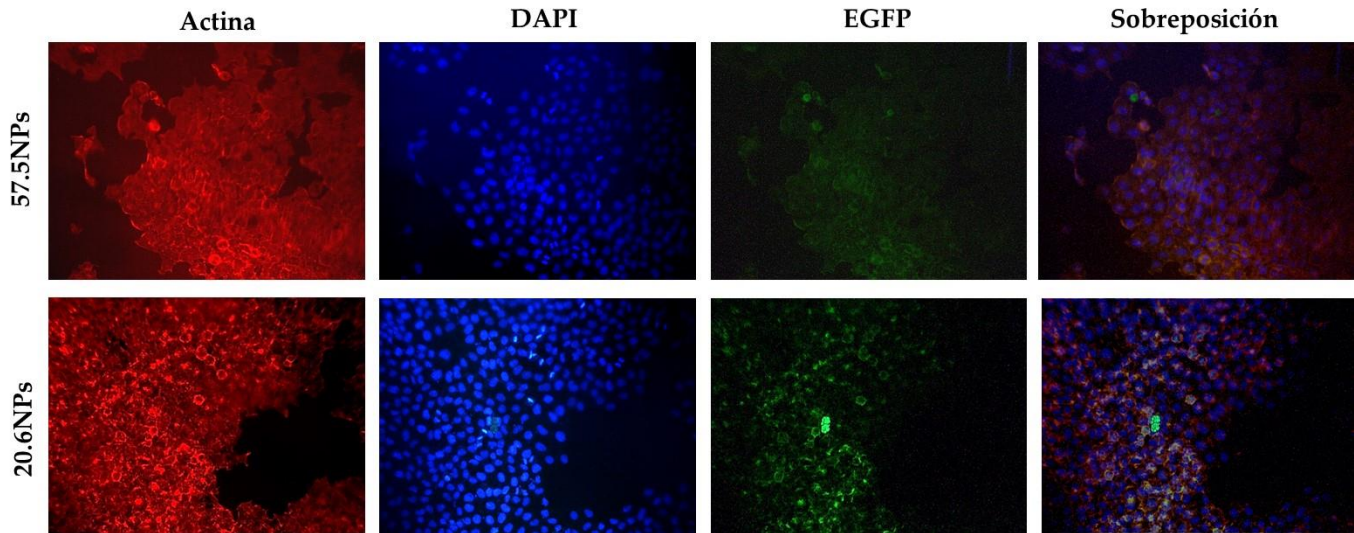


Figura 26. Transfección *in vitro* de la línea celular HeLa. *DAPI*: (4',6-diamidino-2-fenilindol); *EGFP*: *Enhanced Green Fluorescent Protein*. Tinción de actina con faloidina rodamina y de los núcleos con DAPI. Aumento: 20X

12. DISCUSIÓN

Se han desarrollado diversos vectores virales para el tratamiento de algunas enfermedades e incluso actualmente hay 3 medicamentos basados en terapia génica aprobados por la FDA (FDA, 2019; Ginn S., 2018). Por otro lado, algunas de las vacunas contra el Covid-19 funcionan a base de vectores virales y otras a base de vectores no virales, utilizando el principio de la terapia génica. Sin embargo, como se ha mencionado, existen diversas desventajas en el uso de este tipo de vectores, por lo que el desarrollo de vectores no virales es fundamental y ha ido en incremento. El quitosán de mediano a alto peso molecular se ha utilizado por algunos grupos para el desarrollo de nanopartículas como vectores no virales (Hallaj-Nezhadi et al., 2011; Mansouri et al., 2004; Mao et al., 2001), cuya eficiencia de transfección depende de varios factores como el tamaño de partícula, la forma física y la carga de superficie, los cuales a su vez dependen del peso molecular y la concentración del quitosán y del plásmido. En el presente trabajo se han reportado los resultados del desarrollo de nanopartículas por dos metodologías diferentes utilizando dos quitosanes de bajo peso molecular y el plásmido pEGFP-N1 que codifica para la proteína verde fluorescente utilizando para su evaluación microscopía electrónica de barrido, dispersión dinámica de luz y movilidad electroforética.

12.1 Nanopartículas ensambladas por el método de coacervación compleja

Con el fin de encontrar la mejor formulación (N/P ratio y concentraciones óptimas) de las nanopartículas se realizó su caracterización comenzando con el análisis del ensamblaje de sus componentes. En los ensayos de retención electroforética de las nanopartículas formadas por el método de coacervación se evidencia la interacción de las cargas positivas de los grupos amino del quitosán con las cargas negativas de los grupos fosfato del plásmido (cuya concentración de 6nM se mantuvo constante) (Figura 9). En la Figura 9 (a-f) se muestra en el carril 1 el plásmido desnudo, el cual funge como control, teniendo una migración normal del plásmido hacia el ánodo (polo positivo). En la figura 9a, b, y c se observa una migración electroforética comparable al control, lo que indica que la concentración del quitosán es muy baja dejando una gran proporción de plásmido libre y permitiendo su migración. Por ello, se evaluó una mayor concentración de quitosán, lo que ocasionó una mayor interacción electrostática entre el quitosán y el plásmido formando estructuras compactas y neutralizado la carga negativa del plásmido. Esto se vio reflejado en la ausencia de migración (Figura 9d, e y f) para ambos pesos moleculares de quitosán utilizando las mismas concentraciones, lo cual ha sido descrito previamente para otros complejos formados por polímeros catiónicos y pDNA (Hallaj-Nezhadi et al., 2011; Mansouri et al., 2006). En los resultados obtenidos hasta el momento no se aprecia una diferencia sustancial en el retardamiento de la migración en función del peso molecular del quitosán. El cambio de intensidad y la retención más evidente en el pozo de las bandas entre 0.08 y 0.1 % de quitosán sugiere que a estas concentraciones hay una mayor interacción entre los componentes de las nanopartículas (Figura 9d), por lo que estas muestras se emplearon para posteriores análisis. Estos resultados son semejantes a los reportados por otros autores utilizando distintos pesos moleculares de quitosán (Hallaj-Nezhadi et al., 2011; Mao et al., 2001).

Estas nanopartículas formuladas con el método de complejo de coacervación fueron sometidas a SEM (Figura 10 y 11) con el fin de observar la forma y el tamaño aproximado de las nanopartículas. Sin embargo, lo que se encontró fue la formación de una placa atribuida a quitosán libre debido a que este tiende a aglomerarse, impidiendo la visualización de las nanopartículas. Puesto que el quitosán aparentemente está en exceso, la manera de evitar la formación de esta placa es el aumento de la fuerza iónica y de la cantidad de los contraiones con carga negativa (ver apartado 10.3) fomentando así una neutralización de las cargas excesivas del quitosán y favoreciendo la forma esférica de las nanopartículas, ya que se ha demostrado que esta conformación le confiere otras propiedades a las nanopartículas, como la capacidad de internalización a la célula, además de la protección al material genético ante nucleasas (Chou, Song, & Chan, 2016; Gaspar et al., 2011). La disminución de la concentración de quitosán se descartó por los resultados de los ensayos de retardamiento electroforético (Figura 9).

12.2 Nanopartículas formuladas por el método de gelación ionotrópica

El TPP es utilizado como un contraión para la formación de nanopartículas y puede ser empleado con fines médicos por su baja citotoxicidad (Nagpal et al., 2010). El método de gelación ionotrópica es empleado para la formulación de nanopartículas por medio de interacciones iónicas con un polianión para posteriormente encapsular sustancias o principios activos como fármacos, vitaminas, etc, o, como, en este caso, pDNA (Gaspar et al., 2011). Se ha reportado, además, que la adición de un contraión/polianión reduce el tamaño de las nanopartículas confiriéndoles una mayor estabilidad durante la inoculación a un sistema biológico (Santos-Carballal et al., 2018). El fundamento es similar al método de coacervación, en donde hay una interacción electrostática entre las cargas de los componentes. Sin embargo, en el método de coacervación el tamaño y carga de superficie de las nanopartículas resultantes está relacionado con el peso de los polímeros utilizados, mientras que, en el método de gelación ionotrópica, estos parámetros son mediados por el incremento o el decremento de la temperatura o el pH (Nagpal et al., 2010; Patil, Chavanke, & Wagh, 2012), así como de la velocidad de agitación durante la incorporación por goteo del contraión utilizado (en este caso, tripolifosfato de sodio (TPP)). Este goteo debe ser uniforme y estable para obtener un tamaño promedio/similar de partículas, además de que a pH de 4.5 el TPP genera una especie de coagulación y la agitación evita en gran medida este fenómeno (Ajun, *et al.*, 2009; Pati, Adhikari, & Dhara, 2011). Este método fue utilizado con la finalidad de eliminar la placa de quitosán, por lo que se hicieron ensayos para obtener nanopartículas de quitosán-TPP para posteriormente realizar la encapsulación del pDNA. Se probaron diferentes condiciones para observar el comportamiento de las nanopartículas y principalmente lograr la eliminación de la placa de quitosán. En el primer ensayo donde están las nanopartículas en un medio ácido pH 5.5 (por el ácido acético), se manejaron distintas variables, como concentración de quitosán-TPP (% para cada uno) y filtración con poro de 0.45 y de 1 μm para ambos quitosanes (57.5 y 20.6 kDa) con el fin de ver una mejoría en las micrografías y que las nanopartículas no presentaran la placa que hasta ahora se ha presentado, sin embargo, no se observaron cambios significativos en la placa del quitosán (Figura 12b). Por otro lado, estas soluciones fueron analizadas en un Zetasizer (Tabla 4), donde los mejores resultados obtenidos, en cuanto a tamaño menor a 400 nm y con un índice de polidispersión menor a 0.5, son las soluciones con una concentración de 0.08%:0.04% (Q:TPP) y filtrado con el poro de 0.45 micras de ambos pesos moleculares. Únicamente, en estos ensayos se obtuvo una buena calidad de reporte en contraste con los demás ensayos. Este reporte es arrojado por el equipo y se basa en una función de correlación entre la intensidad de la luz dispersada y el tiempo de demora de la intensidad. Con esta referencia se determina si la interpretación de la muestra es confiable (cuando la muestra presenta cierto grado de homogeneidad) o no (Zetasizer User Manual, 2004). El ajuste correcto a esta función de correlación también depende de la forma que presentan las partículas en suspensión. Partiendo de las formulaciones con mejores resultados, se

trabajó en los siguientes 3 ensayos, en donde se utilizó PBS para generar un medio amortiguado con pH 6.5, en donde se sigue observando una placa de quitosán, pero en menor cantidad, lo que permitió la observación de estructuras esféricas de 900 nm de diámetro (Figura 12a) no concordante con el resultado del Zetasizer de 353 y 229 nm para el quitosán de 57.5 y 20.6 kDa respectivamente. Sin embargo, el equipo también arrojó índices de polidispersión por arriba de 0.5, lo que indica que hay tamaños muy variados en los sistemas. Para el último ensayo, se utilizó Tween 20 y 80 como emulsificantes con el fin de que exista una mejor interacción entre los componentes, disminuir la cantidad de quitosán libre y de esta manera evitar la formación de la placa, pero, por el contrario, la placa de quitosán se siguió observando y esta vez sin la visualización de ninguna estructura circular (Figura 13) y con valores del índice de polidispersión mayores a 0.5. Se han reportado síntesis de nanopartículas de quitosán por esta metodología utilizando quitosán de mayor peso molecular (>300 kDa) (Koukaras, 2012); sin embargo, es probable que al utilizar pesos moleculares tan bajos sea necesario alterar de manera significativa las proporciones Q:TPP. Con base en los resultados obtenidos del SEM y el Zetasizer, se descarta el uso de este método para la formulación de las nanopartículas, además de la necesidad de volúmenes grandes de pDNA para su posterior formulación y acoplamiento.

12.3 Nanopartículas formuladas por el método de coacervación incrementando la fuerza iónica

Siguiendo el fundamento del uso de un contraión para que este interactúe con las cargas libres del quitosán, pero empleando ahora el método de coacervación, se formularon nuevas nanopartículas utilizando una solución 25 mM de Na₂SO₄ con una concentración mayor de pDNA (100 µg/mL) y una concentración de 0.08 % de quitosán (para ambos pesos moleculares) (Hallaj-Nezhadi et al., 2011; Mao et al., 2001).

En la figura 11 se evidencia y confirma la interacción entre los componentes, ya que se logra apreciar el DNA (100 ng/µL) retenido en el pozo (Figura 15 carriles C2-C5). Se muestra también la interacción entre el quitosán y el pDNA, provocando una protección ante la enzima DNAsa I (Figura 15 carriles C3 y -C5) en comparación con el pDNA desnudo (Figura 15 carril ctrl (1)y C1). Esto confirma que las concentraciones utilizadas son las mejores, ya que el efecto protector no se daría en concentraciones bajas de quitosán al haber plásmido libre o complejos no tan estables. Además, la protección ante la DNAsa I mantiene la biodisponibilidad del plásmido y puede proveer características farmacocinéticas adecuadas incrementando el potencial terapéutico de las nanopartículas.

Por otro lado, aparentemente no hay cantidades excesivas de quitosán, ya que esto impediría la visualización de las bandas en el gel de agarosa. Cabe mencionar que no se observó una diferencia entre las NPs formuladas con ambos quitosanes de diferentes pesos

moleculares (Mao et al., 2001). Además de confirmar la protección debida a una concentración adecuada de quitosán, estos resultados sugieren que los complejos quitosán-DNA cuentan con una estructura tal que es posible dicha protección. Golan, *et al.*, (1999) reportaron que cuando hay una interacción electrostática entre pDNA y un polímero catiónico se forman complejos con distintas conformaciones en función del nivel de compactación del DNA ocasionado por la densidad catiónica, dada a su vez por la relación pDNA:quitosán. Estas conformaciones pueden consistir en bastoncillos, toroides o esferas. La protección al DNA puede explicarse fácilmente si los complejos forman esferas, ya que en las otras dos conformaciones hay más probabilidad de exposición del DNA a la DNAsa (Danielsen, Maurstad, & Stokke, 2005). La forma esférica de los complejos se confirmó mediante SEM.

La interacción electrostática entre los componentes de las nanopartículas puede describirse también mediante el análisis del potencial Z de las nanopartículas en comparación con el de los componentes por separado (Figura 21). Partiendo de esto, se realizó su determinación, obteniendo valores de -20 mV para el plásmido (concordante con las cargas negativas de los grupos fosfato) y de 50 mV para el quitosán (concordante con las cargas positivas de los grupos amino). En la figura 21 se muestra cómo las nanopartículas tienen valores entre 10 y 30 mV, debido a que las cargas de los componentes interaccionan entre sí, tendiendo a la neutralización de cargas para el producto (las nanopartículas) (Santos-Carbballal et al., 2018; Zetasizer User Manual, 2004).

Las NPs 1 (Nanopartículas formuladas con quitosán de 20.6 kDa) (Figura 16 y 17) muestran por SEM un tamaño promedio de 98 nm en la figura 17d, el cual correlaciona con el resultado obtenido por el ZetasizerPro (Tabla 6) de 119 ± 20 (Figura 20a). El Ipd es de 0.257 y tienen un reporte de calidad bueno y confiable, dejando claro que el sistema no es muy polidisperso. De igual manera, las NPs 2 (Nanopartículas formuladas con quitosán de 57.5 kDa) en el SEM muestran tamaños promedio de entre 164 y 200 nm (Figura 19c y d) y es congruente con los valores de DDL establecidos en la tabla 6 con 209 ± 56 nm (Figura 20b). Sin embargo, el Ipd fue de 0.457, y aunque el sistema no se encuentra tan homogéneo, entra en el rango de confiabilidad (<0.5) (Sawtarie, *et al.*, 2017). Al analizar la figura 18 y 19 se evidencia una fuerte aglomeración de las nanopartículas; sin embargo, la preparación de la muestra para su visualización por SEM puede influir de manera importante para la formación de estos agregados (Ghromrasni, 2020).

Esto también ocurre con las NPs 1 y se puede correlacionar con su carga de superficie, en donde potenciales cercanos a la neutralidad tienden a aglomerarse (Hallaj-Nezhadi *et al.*, 2011), lo que explica las formas de racimos en las figuras 17, 18 y 19 y el valor cercano a 0.5 de las NPs 2. La tendencia a la neutralización de carga no solo confirma la interacción entre los componentes de las nanopartículas, sino que también tiene algunas ventajas y desventajas; por ejemplo, una de sus principales desventajas es que las nanopartículas son inestables y se tienden a formar agrupaciones, pero estas pueden

disgregarse con metodologías como la liofilización. Sin embargo, una ventaja importante es que evita la interacción con proteínas presentes en el torrente sanguíneo en estudios *in vivo* (Aranda-Barradas et al., 2018). Por otro lado, uno de los fines de este trabajo es demostrar la diferencia entre las nanopartículas formuladas con quitosanes de diferente peso molecular. En la tabla 6 se muestran los valores para l_{pd} , tamaño y potencial Z de p para dos colas de la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales, en donde los resultados obtenidos muestran que hay una diferencia significativa entre ambas nanopartículas con respecto a las variables arrojadas por el Zetasizer, que se atribuye al método utilizado en la preparación de las nanopartículas (complejo de coacervación) (Chou et al., 2016), en donde el tamaño de la nanopartícula se ve directamente afectado por el peso y tamaño de los componentes (Nagpal et al., 2010).

Por otro lado, con el fin de analizar la estabilidad de las nanopartículas con el paso del tiempo, se realizó el análisis del potencial Z entre nanopartículas recién preparadas y con 30 días de anaquel (Tabla 7) encontrando que no hay una diferencia significativa en el caso de las NPs 1, aunque si la hay para el caso de las NPs 2. Esto posiblemente se atribuye a que durante este tiempo hay aun interacción entre los componentes libres en el sistema ya que las cargas positivas del quitosán pueden seguir encontrando sitios de unión con las cargas negativas del plásmido provocando más interacciones, esto es respaldado por la disminución del valor del potencial Z entre las NPs 2 recién preparadas y las que tienen 30 días de anaquel. Esto también ocurre con las NPs 1; sin embargo, no hay una diferencia significativa ya que al tener menor tamaño hay menos sitios de unión libres (Figura 25). Por lo que podemos decir que las NPs 1 tienen una mejor estabilidad y una mayor vida de anaquel, sin embargo, se ha reportado que la vida de anaquel de los poliplexes puede ser extendido si las soluciones son liofilizadas (Aranda-Barradas et al., 2018).

Para finalizar, tanto la carga de superficie como el tamaño óptimo de las nanopartículas son necesarios para la transfección en cultivo celular, ya que se ha demostrado que el tamaño óptimo para la transfección celular es entre 100 y 250 nm (Grosse et al., 2005), además de que el uso del quitosán en específico, tiene una muy baja citotoxicidad, por lo que lo hace un buen candidato a su uso en pacientes.

12.4 Efecto del peso molecular del quitosán en la funcionalidad biológica de las nanopartículas

En la figura 26 se observa que ambas nanopartículas tuvieron la capacidad de transfectar células HeLa; sin embargo, en el panel correspondiente a las NPs 1 se evidencia una mayor cantidad e intensidad de expresión de la proteína verde fluorescente que en el correspondiente a las NPs 2. Esto correlaciona con los análisis de las características físicas,

ya que de manera general las NPs¹ mostraron mejores índices de polidispersión, tamaño y estabilidad. Los resultados refuerzan la idea de que el peso molecular del quitosán tiene un efecto significativo no solo en las características físicas de las NPs, sino también en su funcionalidad biológica y, además, estos dos parámetros correlacionan de manera muy importante. Se ha reportado que los complejos esféricos con un diámetro entre 100 y 250 nm generalmente son internalizados a través de macropinocitosis o endocitosis mediada por clatrina y sigue la vía endosoma-lisosoma, lo que incrementa la probabilidad de alcanzar el núcleo. En contraste, complejos muy pequeños (≤ 100 nm) son internalizados mediante caveolinas, lo cual incrementa la posibilidad del transporte hacia el retículo endoplásmico en lugar del núcleo (Mansouri, *et al.*, 2006; Grosse, *etal.*, 2005). Aunado a esto, se ha encontrado que la transfección es dependiente de la línea celular, ya que la fisiología celular puede afectar o jugar un papel decisivo en la vía de internalización de los vectores no virales (Grosse, *et al.*, 2005). El hecho de que la transfección haya sido exitosa la línea celular tumoral HeLa crea el antecedente para crear nanopartículas acopladas a algún ligando cuyo receptor se encuentre sobreexpresado en células tumorales elevando aún más la eficiencia de transfección y haciéndola dirigida. Asimismo, se ha reportado que el tamaño de partícula cercano al tamaño obtenido para las NPs 1, promueve la internalización, la circulación prolongada en sangre, una penetración más alta de tejidos y el paso relativamente libre a través del sistema fagocítico mononuclear (Alameh et al, 2012). Por otro lado, en los ensayos de transfección *in vitro* no se observaron cambios en la morfología celular, tasa de división, o alteraciones en la actina del citoesqueleto, lo que indica ausencia de citotoxicidad. Todo esto sugiere que las NPs 1 también serían aptas para la transfección *in vivo*.

Por otro lado, se ha descrito que las nanopartículas esféricas muestran un 500% más eficiencia en la internalización que partículas en forma de bastón. Esto puede deberse a un tiempo mayor de invaginación de la membrana para envolver partículas elongadas y fuerzas termodinámicas mayores para la endocitosis. Se ha demostrado previamente que la morfología de las nanopartículas de pDNA/quitosán depende fuertemente en los radios de carga (amino:fosfato; quitosán:pDNA), y la variación en este parámetro resulta en la formación de nanopartículas tipo toroide, esféricas, de bastón, o globulares (Alameh et al, 2012). Por lo tanto, los resultados obtenidos para la funcionalidad biológica pueden explicarse por la morfología descrita por SEM.

13. CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió, en primer lugar, descartar el método de ensamblaje de nanopartículas por gelación iónica, ya que presentó mayores dificultades técnicas y no arrojó los resultados esperados para los pesos moleculares de quitosán utilizados. Asimismo, se obtuvieron los parámetros adecuados para realizar el ensamblaje de nanopartículas mediante la metodología de coacervación compleja. Se observó que, aumentando la fuerza iónica a través del incremento de la concentración de plásmido y su disolución en sulfato de sodio, se obtuvieron nanopartículas esféricas cuando se emplearon los dos diferentes quitosanos de ambos pesos moleculares, a juzgar por las imágenes obtenidas por SEM. Por otro lado, los valores de tamaño, índice de polidispersión y carga de superficie resultaron favorables y mostraron una correlación directa con la eficiencia de transfección.

Con base en los valores de tamaño, índice de polidispersión, carga de superficie de las NPs1 recién ensambladas, así como la carga de superficie de las NP1 después de 30 días de anaquel y una mayor eficiencia de la transfección, se puede inferir que las nanopartículas formuladas con un quitosán de bajo peso molecular (NPs1) son una mejor opción que las NPs2, no solo para ensayos de transfección en distintas líneas celulares, sino para ensayos posteriores que mejoren la capacidad de transfección.

14. PERSPECTIVAS

Desde este punto, el paso a seguir es la optimización de las nanopartículas mediante la inclusión de ligandos y péptidos cariofílicos para aumentar la especificidad y eficiencia de transfección e incluso el uso del gen terapéutico para la posterior aplicación y validación de la funcionalidad biológica en modelos animales

15. REFERENCIAS

- Addgene. (n.d.). No Title. Retrieved July 20, 2019, from <https://www.addgene.org/vector-database/2491/>
- Ajun, W., Yan, S., Li, G., & Huili, L. (2009). Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), 566–574. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.08.019>
- Alameh, M. et al. (2012). Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N:P ratio for nontoxic polynucleotide delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1399-1414. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S26571>
- Alejos, L., Aragon, M., & Cornejo, A. (1995). MI: independent living home pt. drowns: failure to follow nursing care plan. *The Regan Report on Nursing Law*, 36(4), 3.
- Aranda-Barradas, M. E., Márquez, M., Quintanar, L., Santoyo-Salazar, J., Espadas-Álvarez, A. J., Martínez-Fong, D., & García-García, E. (2018). Development of a parenteral formulation of NTS-polyplex nanoparticles for clinical purpose. *Pharmaceutics*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10010005>
- Ausar, S. F., Joshi, S. B., & Middaugh, C. R. (2008). Spectroscopic methods for the physical characterization and formulation of nonviral gene delivery systems. *Methods in Molecular Biology*, 434, 55–80. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-248-3_5
- Barrera Bautista, E., Bermúdez-Morales, V. H., & Hernández Baltazar, E. (2011). Materiales poliméricos de aplicación en terapia génica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12(1), 32–50. Retrieved from <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/ENE11/barrera.pdf>
- BioLabs. (n.d.). NebCutter. Retrieved from <http://nc2.neb.com/NEBcutter2>
- Bozkir, A., & Saka, O. M. (2004). Chitosan Nanoparticles for Plasmid DNA Delivery: Effect of Chitosan Molecular Structure on Formulation and Release Characteristics. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 11(2), 107–112. <https://doi.org/10.1080/10717540490280705>
- Caballero, J. L., Moyano, E., & Muñoz, J. (2007). Purificación de ADN plasmídico y electroforesis del mismo gel de agarosa. *Análisis de La Presencia de Organismos Genéticamente Modificados En Muestras de Alimentos*, 1–12.
- Camacho, F., Capo, M., Toledo, R., León, J. De, Talavera, A., Pérez, E. M., ... Habana, C. D. La. (2006). Transferencia de genes in vitro con polímeros catiónicos. *VacciMonitor*, 15(1), 1–5.
- Chattoraj, D., Schellman, A., & Gosule, L. (1978). DNA Condensation with Polyamines Institute of Molecular. *Molecular Biology*, 311–326.
- Choi, Y. H., Liu, F., Kim, J. S., Choi, Y. K., Park, J. S., & Kim, S. W. (1998). Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carder. *Journal of Controlled Release*, 54(1), 39–48. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00174-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00174-0)

- Chou, L. Y. T., Song, F., & Chan, W. C. W. (2016). Engineering the Structure and Properties of DNA-Nanoparticle Superstructures Using Polyvalent Counterions. *Journal of the American Chemical Society*, 138(13), 4565–4572. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b00751>
- CLONETECH. (1999). No Title. Retrieved July 20, 2019, from 19/ marzo/ 1999 website: <http://www.yrgene.com/documents/vector/pegfpn1.pdf>
- Corsi, K., Chellat, F., Yahia, L., & Fernandes, J. C. (2003). Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials*, 24(7), 1255–1264. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00507-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00507-0)
- Danielsen, S., Maurstad, G., & Stokke, B. T. (2005). DNA-polycation complexation polyplex stability in the presence of competing polyanions. *Biopolymers*, 77(2), 86–97. <https://doi.org/10.1002/bip.20170>
- Domínguez, M., González, N., & Gutiérrez, A. (2016). Manual de prácticas de genética molecular. UNAM. FESC.
- Duarte Silva, V. J. (2013). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles for gene delivery. *Tecnico Lisboa. Tesis Master*, (Noviembre 2013),
- Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A. M., & Remy, J. S. (1998). Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical characteristics and transfection ability. *Pharmaceutical Research*, Vol. 15, pp. 1332–1339. <https://doi.org/10.1023/A:1011981000671>
- FDA. (2019). U.S. Food & Drug administration. Retrieved from Productos Aprobados de terapia celular y genética website: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>
- Gaspar, V. M., Sousa, F., Queiroz, J. A., & Correia, I. J. (2011). Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy Applications. *Nanotechnology*, 22(1). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/1/015101>
- Ghromrasni, N.B. et al. Challenges in sample preparation for measuring nanoparticles size by scanning electron microscopy from suspensions, powder form and complex media. (2020). *Powder Technology*. 359, 226-237. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.10.022>
- Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M., & Abedi, M. R. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *Journal of Gene Medicine*, 20(5), 1–16. <https://doi.org/10.1002/jgm.3015>
- Golan, R., Pietrasanta, L. I., Hsieh, W., & Hansma, H. G. (1999). DNA toroids: Stages in condensation. *Biochemistry*, 38(42), 14069–14076. <https://doi.org/10.1021/bi990901o>
- Grosse, S. et al. Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. (2005). *Journal of Gene Medicine*, 7(10), 1275-1286 <https://doi.org/10.1002/jgm.772>
- Gutiérrez-Vargas, J., & Cardona-Gómez, G. P. P. (2017). Terapia génica en enfermedades

neurodegenerativas y demencia post infarto cerebral: perspectiva de traslación. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 41(158), 6. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.437>

Hallaj-Nezhadi, S., Valizadeh, H., Dastmalchi, S., Baradaran, B., Jalali, M. B., Dobakhti, F., & Lotfipoure, F. (2011). Preparation of chitosan-plasmid DNA nanoparticles encoding interleukin-12 and their expression in CT-26 colon carcinoma cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 181–195.

Harvey, R. A., & Champe, P. A. (2008). *Microbiología Harvey 2a Edición*. Wolkers Kluwer. USA.

Hidalgo, J. L., & Miranda, S. P. (2013). *Caracterización del Quitosán: Grado de Desacetilación y Peso Molecular*. México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Ishii, T., Okahata, Y., & Sato, T. (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1514(1), 51–64. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00362-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00362-5)

Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular*. McGraw Hill. 6ta ed. USA

Kasaai, M. R. (2007). Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 477–488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>

Koukaras, E. et al. (2012). Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate. *Molecular Pharmaceutics*, 9(10), 2856–2862. <https://doi.org/10.1021/mp300162j>

Lárez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances En Química*, 1(2), 15–21.

Liu, X., Howard, K. A., Dong, M., Andersen, M., Rahbek, U. L., Johnsen, M. G., ... Kjems, J. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, 28(6), 1280–1288. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.004>

López, L. (2014). *Síntesis de dendrímeros de primera y segunda generación tipo PAMAM con una molécula de porfirina como r e a*: UNAM- Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Tesis de QFB

Maestre, M. F., & Wang, J. C. (1971). Circular dichroism of superhelical DNA. *Biopolymers*, 10(6), 1021–1030. <https://doi.org/10.1002/bip.360100608>

Mansouri, S., Cuie, Y., Winnik, F., Shi, Q., Lavigne, P., Benderdour, M., ... Fernandes, J. C. (2006). Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Biomaterials*, 27(9), 2060–2065. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.020>

Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., & Fernandes, J. C. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: Strategies to

- improve transfection efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00155-3)
- Mao, H. Q., Roy, K., Troung-Le, V. L., Janes, K. A., Lin, K. Y., Wang, Y., ... Leong, K. W. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 70(3), 399–421. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00361-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00361-8)
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., & Aiello, C. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones Chitin and Chitosan friendly polymer . A review of their applications. *Revista Technoscientific URU*, 53–58. <https://doi.org/2244-775X>
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2000). *Microbiología médica*. 7ma ed. ELSEVIER, España. 1–984.
- Nagpal, K., Singh, S. K., & Mishra, D. N. (2010). Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(11), 1423–1430. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.1423>
- Naik Kardile, A. (1975). *Fundamentos del microscopia electrónico y su aplicación en la investigación textil*.
- NCBI. (2003). No Title. Retrieved from 22/ agosto/ 2003 website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U55762.1>
- Orfao, A., & Pinto, R. (2015). *Red Nacional de Biobancos*. Retrieved from www.redbiobancos.es
- Özgel, G., & Akbuğa, J. (2006). In vitro characterization and transfection of IL-2 gene complexes. *International Journal of Pharmaceutics*,. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.02.013>
- Pati, F., Adhikari, B., & Dhara, S. (2011). Development of chitosan-tripolyphosphate fibers through pH dependent ionotropic gelation. *Carbohydrate Research*, 346(16), 2582–2588. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.08.028>
- Patil, P., Chavanke, D., & Wagh, M. (2012). A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(SUPPL. 4), 27–32.
- Patiño, M. (1990). *Dicroísmo circular*. 2–5.
- Pere Coll, M. Teresa Coque, M. Angeles Domínguez, Julio Vázquez, J. V. (2005). Procedimientos en Microbiología Clínica. In *Seimc*.
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. Medica panamericana. 1ed. Madrid, España
- Raftery, R., O'Brien, F. J., & Cryan, S. A. (2013). Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications. *Molecules*, 18(5), 5611–5647. <https://doi.org/10.3390/molecules18055611>
- Ramamoorth, M., & Narvekar, A. (2015). Non viral vectors in gene therapy - An overview.

Journal of Clinical and Diagnostic Research, 9(1), GE01–GE06.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394>

- Reyes-Juárez, J. L., & Zarain-Herzberg, Á. (2009). Terapia génica en la insuficiencia cardiaca. *Archivos de Cardiología de México*, 79(2), 147–156. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402009000200013&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Rodríguez Yunta, E. (2003). TERAPIA GÉNICA Y PRINCIPIOS ÉTICOS. *Acta Bioethica*, 9(1), 69–79. <https://doi.org/10.4067/S1726-569X2003000100007>
- Roy, K., Mao, H. Q., Huang, S. K., & Leong, K. W. (1999). Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine*, 5(4), 387–391. <https://doi.org/10.1038/7385>
- Rozalén, J., Fernández, F., Ceña, V., & Jordan, J. (2003). Aplicaciones de la terapia génica. *OFRARM*, 10, 22. Retrieved from <https://previa.uclm.es/profesoradO/jjordan/pdf/review/12.pdf>
- Samaniego, R. (2009). Aplicaciones de la microscopia confocal. *Gastroenterología y Hepatología Continuada*, 8(2), 115–119. [https://doi.org/10.1016/S1578-1550\(09\)71093-9](https://doi.org/10.1016/S1578-1550(09)71093-9)
- Sambrook, J.; Fritsch, T. M. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Editio). NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos-Carballal, B., Fernández, E. F., & 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), 1–51. <https://doi.org/10.3390/polym10040444>
- Sawtarie, N., Cai, Y., & Lapitsky, Y. (2017). Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.055>
- Suárez, V. M., Delvallepérez, L. O., Domínguez, G. D., & Abraham, C. M. (2015). Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(3), 242–253.
- Tang, M. X., & Szoka, F. C. (1997). The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy*, 4(8), 823–832. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300454>
- Urrejola, M. C., Soto, L. V, Zumarán, C. C., Peñaloza, J. P., Álvarez, B., Fuentesvilla, I., & Haidar, Z. S. (2018). Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *International Journal of Morphology*, 36(4), 1463–1471. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022018000401463>
- Yilmaz, O., & Chambers, R. (1984). *Dicroísmo circular*. 49(10), 1664–1674.

Zetasizer User Manual, M. (2004). Zetasizer Nano Series User Manual. *Malvern Instruments Ltd*, (1.1), 213–224. [https://doi.org/10.1016/S0294-3506\(99\)80105-7](https://doi.org/10.1016/S0294-3506(99)80105-7)

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES EMPLEADAS.

STE

- Para 500 ml

$$500 \text{ ml} \left| \frac{0.1 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{58.44 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 2.92 \text{ g}$$

$$500 \text{ ml} \left| \frac{0.010 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{121.14 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.60 \text{ g}$$

$$500 \text{ ml} \left| \frac{0.001 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{292.24 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.14 \text{ g}$$

SOLUCIÓN LISIS I

- Para 100 ml

50 mM Glucosa

$$100 \text{ ml} \left| \frac{0.050 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{180.15 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.90 \text{ g}$$

25 mM Tris • HCl

$$100 \text{ ml} \left| \frac{0.025 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{121.14 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.30 \text{ g}$$

10 mM EDTA

$$100 \text{ ml} \left| \frac{0.010 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{292.24 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.29 \text{ g}$$

SOLUCIÓN DE LISIS II

- Para 250 ml

0.2 N NaOH

$$250 \text{ ml} \left| \frac{0.2 \text{ eq}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{1 \text{ mol NaOH}}{1 \text{ eq NaOH}} \left| \frac{39.997 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right| = 1.99 \text{ g}$$

1% SDS

SOLUCIÓN DE LISIS III

- Para 100 ml

5 M Acetato de potasio (65 ml)

$$65 \text{ ml} \left| \frac{5 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{98.15 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 31.89 \text{ g}$$

Ácido acético glacial (11.5 ml)

Agua (28.5 ml)

SOLUCIÓN DE LiCl

- Para 5 ml

5M LiCl

$$5 \text{ ml} \left| \frac{5 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{42.3 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 1.05 \text{ g}$$

- Para 10 ml

5 M LiCl

$$10 \text{ ml} \left| \frac{5 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{42.3 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 2.11 \text{ g}$$

SOLUCIÓN DE NaCl/PEG 6000

- Para 5 ml

1.6 M NaCl

$$5 \text{ ml} \left| \frac{1.6 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{58.44 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.467 \text{ g}$$

13 % PEG-6000

SOLUCIÓN DE ACETATO DE POTASIO

- Para 10 ml

10 M Acetato de potasio

$$10 \text{ ml} \left| \frac{10 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \frac{98.15 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 9.815 \text{ g}$$

SOLUCIÓN DE Na₂SO₄

- Para 50 ml

25 mM Na₂SO₄

$$50 \text{ ml} \left| \frac{250 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \right| \left| \frac{1 \times 10^{-3} \text{ mol}}{1 \text{ mmol}} \right| \left| \frac{142.04 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right| = 1.78 \text{ g}$$

SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATOS (PBS)

- Para 500 ml

8.1 mM Na₂HPO₄

$$500 \text{ ml} \left| \frac{0.0081 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \left| \frac{141.16 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right| = 0.57 \text{ g} \times 10 = 5.7 \text{ g}$$

1.2 mM KH₂PO₄

$$500 \text{ ml} \left| \frac{0.0012 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \left| \frac{136.09 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right| = 0.08 \text{ g} \times 10 = 0.8 \text{ g}$$

138 mM NaCl

$$500 \text{ ml} \left| \frac{0.138 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \left| \frac{58.49 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right| = 4.03 \text{ g} \times 10 = 40.3 \text{ g}$$

27 mM KCl

$$500 \text{ ml} \left| \frac{0.027 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right| \left| \frac{74.56 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right| = 0.10 \text{ g} \times 10 = 1 \text{ g}$$

ANEXO 2

TABLAS GENERADAS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

Para Tamaño de nns

	<i>QN bajo</i>	<i>QN alto</i>
Media	119.72	209.472727
Varianza	1114.4732	9086.32418
Observaciones	11	11
Diferencia hipotética de las medias	0.5	
Grados de libertad	12	
	-	
Estadístico t	2.96373669	
P(T<=t) una cola	0.00591908	
Valor crítico de t (una cola)	1.78228756	
P(T<=t) dos colas	0.01183817	
Valor crítico de t (dos colas)	2.17881283	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

Para Potencial Z

	<i>QN bajo</i>	<i>QN alto</i>
Media	16.9253333	23.0033333
Varianza	3.69326952	20.8939095
Observaciones	15	15
Diferencia hipotética de las medias	0.5	
Grados de libertad	19	
	-	
Estadístico t	5.13789408	
P(T<=t) una cola	2.9241E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1.72913281	
P(T<=t) dos colas	5.8482E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.09302405	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

para lpd

	<i>QN bajo</i>	<i>QN alto</i>
Media	0.25733636	0.45710909
Varianza	0.00723295	0.00880502
Observaciones	11	11
Diferencia hipotética de las medias	0.5	

Grados de libertad	20
	-
Estadístico t	18.3264623
P(T<=t) una cola	2.8437E-14
Valor crítico de t (una cola)	1.72471824
P(T<=t) dos colas	5.6873E-14
Valor crítico de t (dos colas)	2.08596345

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

Para PZ tiempo de nns de QN alto

	07/03/2020	05 02 20
Media	25.43	18.8733333
Varianza	0.8156	23.0250667
Observaciones	6	6
Coeficiente de correlación de Pearson	-0.1583892	
Diferencia hipotética de las medias	0.5	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	2.95456372	
P(T<=t) una cola	0.01585877	
Valor crítico de t (una cola)	2.01504837	
P(T<=t) dos colas	0.03171754	
Valor crítico de t (dos colas)	2.57058184	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

Para PZ tiempo de nns QN bajo

	07 03 20	05 02 20
Media	16.9816667	15.8383333
Varianza	0.74645667	2.44529667
Observaciones	6	6
Coeficiente de correlación de Pearson	0.06535954	
Diferencia hipotética de las medias	0.5	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	0.90752262	
P(T<=t) una cola	0.20287191	
Valor crítico de t (una cola)	2.01504837	
P(T<=t) dos colas	0.40574381	
Valor crítico de t (dos colas)	2.57058184	

