



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL
ACOPLAMIENTO DEL LIGANDO GRP A NANOPARTÍCULAS A
BASE DE QUITOSÁN PARA TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA
CONTRA CÉLULAS TUMORALES”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:
YARELI LIZBETH AGUILAR CASTAÑEDA**

ASESORA: Dra. MARÍA EUGENIA ARANDA BARRADAS

Cuatitlán Izcalli, Estado de México, 2023



**UNAM
CUAUTITLÁN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDEBRANA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

Desarrollo de una metodología para el acoplamiento del ligando GPR a nanopartículas a base de quitosán para terapia génica dirigida contra células tumorales.

Que presenta la pasante: **Yareli Lizbeth Aguilar Castañeda**

Con número de cuenta: 315598968 para obtener el título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Abril de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
VOCAL	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	Dra. Mariana Dolores Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

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

Dedicatoria

A mis padres, por ser mis guías, por buscar alternativas y nunca excusas, porque con su ejemplo me han dado las herramientas para lograr todo lo que me proponga. Gracias por darnos lo mejor de ustedes todos los días.

A mis hermanitas, porque no concibo ninguno de mis logros sin tenerlas a mi lado, por ser mis confidentes eternas y por endulzar cada momento que compartimos. Gracias porque en su valentía, persistencia, grandeza y autenticidad he encontrado la inspiración para mi propio camino.

A mis abuelitos, porque sé que me cuidan desde donde se encuentran, gracias por compartirme de su sabiduría.

A Huguito, por ir de la mano conmigo, por convertir las dificultades en oportunidades para crecer e impulsarme cuando los miedos están por frenarme. Gracias por ser mi compañero, es una fortuna compartir tanto contigo.

Gracias a todos por hacer de mis metas las suyas y motivarme todos los días a alcanzarlas.
Esto no hubiera sido posible sin ustedes, así que este logro es tan mío como suyo.

Los amo inmensamente.

Agradecimientos

En primer lugar, a la Dra. María Eugenia Aranda Barradas por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su paciencia, confianza, empatía y por todos sus consejos académicos, profesionales y personales. Gracias por compartirme e inspirar en mí el deseo y asombro por la ciencia. Tiene un lugar muy especial en mí.

A la Dra. Patricia Miranda por compartir su laboratorio para el desarrollo experimental del presente proyecto de investigación y su asesoría. Igualmente agradezco al técnico Francisco González Díaz por su apoyo en la realización de este trabajo de tesis y por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo.

A mis compañeros de proyecto, Héctor y Karen por brindarme su apoyo en el laboratorio y cuando estuve a distancia.

A mis amigos Chucho, Dayra, Mariana, Marilú, Leo y Azael por brindarme su amistad y la alegría de su compañía. Gracias por ser mi apoyo y mis compañeros cuando más me costaba encontrar motivación. Los quiero mucho y les deseo a todos el éxito que sé que merecen.

Tabla de contenido

Dedicatoria	3
Agradecimientos.....	4
Tabla de contenido.....	5
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas	8
Abreviaturas	9
Resumen.....	10
Introducción.....	12
Terapia génica	12
Vectores virales.....	12
Vectores no virales.....	13
Antecedentes	15
Retos para el desarrollo de vectores no virales	15
Estrategias para mejorar la eficiencia de transfección de vectores no virales	18
Quitósán como vector no viral en terapia génica	22
Acoplamiento de biomoléculas para direccionamiento de nanopartículas empleando entrecruzadores	24
Tiolación: introducción de grupos sulfhidrilo.....	24
Modificación de aminas con SPDP	26
Metodologías empleadas para la evaluación de nanopartículas.....	27
Determinación de tamaño de partícula por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	27
Determinación Potencial Zeta (PZ)	27
Determinación de forma física por Microscopía Electrónica de Barrido.....	28
Evaluación de funcionalidad biológica <i>in vitro</i>	28
Definición del problema y justificación.....	29
Hipótesis.....	30
Objetivos	30
Objetivo general	30
Objetivos particulares.....	30
Metodología.....	31
Preparación del quitósán como vehículo	31
Generación de células competentes	31
Transformación de plásmido pQBI25 en <i>Escherichia coli</i>	31

Propagación y aislamiento del plásmido.....	32
Ensayos de retardamiento entre pQBI25 y péptidos cariofílicos.....	33
Ensayos de retención entre pQBI25-péptidos cariofílicos y quitosán.....	34
Ensamblaje de CS-NP por coacervación compleja.....	34
Acoplamiento del ligando GRP a las nanopartículas mediante SPDP	34
Tiolación de GRP.....	34
Funcionalización del quitosán con SPDP.....	35
Acoplamiento de GRP-SH a CS-NP-SPDP.....	35
Evaluación fisicoquímica de CS-NPs y CS-NPs-GRP	35
Dispersión dinámica de luz (DLS).....	35
Movilidad electroforética acoplada a láser Doppler	36
Internalización de los poliplejos.....	36
Evaluación de la transfección de los complejos.....	36
Resultados	37
Integridad y concentración de pDNA.....	37
Ensayos de retardo pQBI25-péptidos cariofílicos.....	38
Figura 12. Gel de electroforesis del ensayo de retardo entre pQBI25 (100 ng/μL) con P2. Las concentraciones de péptido cariofílico son μM.....	39
Ensayos de retención	39
Determinación de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta	41
Ensayos de transfección <i>in vitro</i>	43
Desarrollo de la metodología de acoplamiento del ligando GRP a las nanopartículas	46
Caracterización fisicoquímica y morfológica de las nanopartículas dirigidas.....	50
Ensayos de internalización	52
Ensayos de transfección <i>in vitro</i> de CS-NPs GRP	53
Discusión.....	57
Caracterización fisicoquímica y morfológica de CS-NPs.....	57
Evaluación de la funcionalidad biológica de CS-NPs	60
Modificaciones a la metodología de acoplamiento del ligando a las nanopartículas ..	63
Caracterización fisicoquímica y morfológica de CS-NPs GRP	65
Ensayo de internalización de nanopartículas dirigidas.....	66
Evaluación de la funcionalidad biológica para CS-NPs GRP	66
Conclusiones.....	68
Perspectivas de la investigación	69

Referencias	70
-------------------	----

Índice de figuras

Figura 1. Barreras intracelulares y extracelulares de la terapia génica.	17
Figura 2. CS-ligandos para terapia génica dirigida de DNA/RNA/fármaco a diversos sitios blanco.	19
Figura 3. Mecanismos de internalización que puede seguir el vector no viral en terapia génica.	20
Figura 4. Estructura de la quitina y quitosán.	22
Figura 5. Resumen de estrategias empleadas para la tiolación de los grupos amino del CS mediante el empleo de reactivos con grupos tiol.	24
Figura 6. El 2-iminotiolano interactúa con la amina primaria para crear un grupo sulfhidrilo.	25
Figura 7. El grupo tiol terminal puede reciclarse para crear otro derivado del iminotiolano	26
Figura 8. a) Reacción entre el SPDP y el grupo amino del quitosán para la formación de puentes de disulfuro y la liberación de la piridin-2-tiona. b) Reacción de reducción entre el quitosán modificado por SPDP y el DTT para la formación de grupos sulfhidrilo libres.	26
Figura 9. Mapa del plásmido pQBI25.	32
Figura 10. Gel de electroforesis tras extracción de pDNA mediante kit QIAGEN Mega Prep.	38
Figura 11. Gel de electroforesis del ensayo de retardo entre pQBI25 (100 ng/μL) con P1.	39
Figura 12. Gel de electroforesis del ensayo de retardo entre pQBI25 (100 ng/μL) con P2.	39
Figura 13. Gel de electroforesis del ensayo de retención CS 20.6 kDa con pQBI25 (100 ng/μL) +P1 [0.35] μM	40
Figura 14. Ensayo de retención CS 20.6 kDa con pQBI25 (100 ng/μL) +P2 [0.52] μM.	40
Figura 15. Ensayo de retención CS 52.7 kDa con pQBI25 (100 ng/μL).	41
Figura 16. Caracterización fisicoquímica de poliplejos con diferentes MW de quitosán. A) tamaño de partícula, B) PZ.	41
Figura 17. Caracterización fisicoquímica de diferentes CS-NPs. A) tamaño de partícula, B) PZ.	42
Figura 18. Imágenes SEM de LMW-CS-NPs P2 a 10,000 (A), 15,000 (B), 50,000 (C) y 85,000 (D).	43
Figura 19. Reacciones ocurridas para el acoplamiento del ligando a CS-NPs P2.	46

Figura 20. Barrido espectral para la determinación de la concentración de GRP-SH mediante ensayo de Ellmans.	48
Figura 21. Barrido espectral para la determinación de la piridin-2-tiona de acuerdo con la metodología B.	50
Figura 22. Caracterización fisicoquímica de diferentes CS-NPs. A) tamaño de partícula, B) PZ.....	50
Figura 23. Imágenes SEM de CS-NP-GRP con P2 y CS 20.6 kDa a 15,000 (A), 35,000 (B), 45,000 (C) y 75,000 (D).....	51
Figura 24. Ensayos de internalización en las líneas celulares HeLa y SiHa a 30 minutos.....	52

Índice de tablas

Tabla 1. Cuadro comparativo de ventajas y desventajas principales de los vectores no virales más comunes	14
Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de los péptidos cariofílicos empleados.....	33
Tabla 3. Resultados de concentraciones (ng/μL) y relaciones 260/280 obtenidas después de la extracción de pDNA.	38
Tabla 4. Resultados del tamaño de partícula, potencial ζ e índice de polidispersión de las diferentes CS-NPs.....	42
Tabla 5. Valores de significancia para tamaño de partícula, potencial ζ e índice de polidispersión para las distintas comparaciones entre CS-NPs. <i>p</i> : valor p de t de Student <i>n</i> =3	42
Tabla 6. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los ensayos de transfección <i>in vitro</i> realizados en las líneas celulares SiHa y HeLa con 10% FBS en el medio.	44
Tabla 6 (continuación). Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los ensayos de transfección <i>in vitro</i> realizados en las líneas celulares SiHa y HeLa con 10% FBS en el medio.	45
Tabla 7. Concentración (mg/mL) del péptido GRP-SH.....	48
Tabla 8. Eficiencia de reacción de acoplamiento del ligando GRP-SH a CS-NPs-SPDP.....	49
Tabla 9. Resultados del tamaño de partícula, potencial ζ e índice de polidispersión de CS-NPs GRP	51
Tabla 10. Valores de significancia para tamaño de partícula, potencial ζ e índice de polidispersión para las distintas comparaciones entre CS-NPs. <i>p</i> : valor p de t de Student <i>n</i> =3	51

Tabla 11. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los ensayos de transfección in vitro realizados en las líneas celulares SiHa y HeLa con los poliplejos CS-NPs-GRP 53

Tabla 11 (continuación). Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los ensayos de transfección in vitro realizados en las líneas celulares SiHa y HeLa con los poliplejos CS-NPs-GRP 55

Abreviaturas

ATMPS	Advanced Therapy Medicinal Products
BBN	Bombesina
CavME	Endocitosis mediada por Caveolas
CCT	Cancer Gene Therapy
CME	Endocitosis mediada por Clatrina
CS	Quitosán
CS-NPs	Nanopartículas a base de quitosán
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DS	Grado de desacetilación
EE. UU	Estados Unidos
EMA	European Medicine Agency
FDA	Food and Drug Administration
GAGs	Glucosaminoglicanos
GRPR	Receptor para el Péptido liberador de gastrina
HSS	U.S. Department of Health & Human Services
IND	Investigational New Drug
LDV	Velocimetría por Láser Doppler
MW	Peso molecular
NLS	Señales de Localización Nuclear
NMBR	Neuromedina B
NPCs	Complejos de Poro Nuclear
OBA	Office of Biotechnology Activities
OCTGT	Office of Cellular Tissue and Gene Therapies
PEI	Polietilenimina
PId	Índice de polidispersión
PLL	Poli-L-lisina
PZ	Potencial Zeta
Radio N/P	Radio Nitrógeno/Fósforo
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SPDP	N-succinimidil 3-(2-piridilditio)
TPP	Tripolifosfato

Resumen

La terapia génica es aquella en la que ocurre transferencia de material genético a una célula eucariota, su efecto terapéutico depende de la expresión del transgén y para lograrlo se emplean vectores que protegen al material genético y lo transportan a la célula o células blanco.

Los vectores pueden clasificarse en dos grandes tipos: virales y no virales. Aunque los vectores virales han sido empleados con mayor frecuencia debido a que naturalmente transfectan a la célula, su empleo ha traído ciertas preocupaciones de salud, tales como la inmunogenicidad o la posibilidad de reversibilidad de la patogenicidad y el riesgo de que ocurra mutagénesis insercional. Como solución al problema, se ha apostado por el empleo de vectores no virales.

Existen diversos tipos de vectores no virales, aunque destacan los polímeros catiónicos, ya que, por su carga, interactúan electrostáticamente con la carga negativa de los ácidos nucleicos para formar poliplejos. Un tipo de polímero catiónico es el quitosán (CS) cuyas ventajas han sido demostradas y aprovechadas para el ensamblaje de nanopartículas con material genético a partir de diferentes métodos.

Para el ensamblaje de los poliplejos deben considerarse ciertos parámetros como el peso molecular (MW) y el grado de desacetilación (DS) del CS, así como el radio N/P (Nitrógeno/Fósforo) (proporción entre el quitosán y el material genético). Dichos parámetros tienen una influencia en el tamaño de partícula, potencial zeta, índice de polidispersión y morfología; que, a su vez, tienen un efecto comprobado en la transfección en ensayos *in vitro*.

Se han desarrollado diversas estrategias cuyo fin principal es el aumento de transfección para nanopartículas de vectores no-virales, entre ellas se encuentra el acoplamiento de un ligando que mejore la interacción entre el poliplejo y la membrana de la célula para aumentar la endocitosis y, además, dirigir la terapia génica. Por otro lado, una estrategia para mejorar la expresión del transgén es mediante la adición de péptidos cariofílicos para que el DNA atraviese el poro nuclear con mayor probabilidad.

En el presente trabajo se ensamblaron nanopartículas a base de quitosán (MW 20.6 kDa y 52.7 kDa y DS $\geq 85\%$) con el pDNA pQBI25, que codifica para la proteína verde fluorescente, mediante coacervación compleja incluyendo dos péptidos cariofílicos diferentes (P1 y P2), utilizando relaciones N/P de 16 y 14 para los poliplejos ensamblados con P1 y con P2, respectivamente.

Se determinaron los tamaños de partícula e índice de polidispersión (PId) mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y el Potencial Zeta (PZ) a partir de la Velocimetría por Láser Doppler (LDV), se caracterizaron morfológicamente por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y se evaluó la funcionalidad biológica a partir de ensayos de transfección *in vitro* en las líneas celulares SiHa y HeLa mediante la observación de las preparaciones con el microscopio de fluorescencia.

A partir de los resultados de la caracterización fisicoquímica y morfológica, así como la funcionalidad biológica; se seleccionó el MW bajo del CS y el P2.

Como segunda parte del trabajo, se realizó la estandarización del acoplamiento del ligando GRP a las nanopartículas CS-NPs P2 mediante el entrecruzador SPDP empleando una metodología modificada a partir de las reportadas por Hermanson, G. (2008) y Mao et. al (2001). La eficiencia de transfección obtenida con la metodología modificada tuvo una media de 66.55% y la eficiencia de transfección reportada por Mao et al. (2001) fue de 32.7%; por lo que, además de obtener una eficiencia de reacción mayor, las modificaciones a la metodología ahorraron tiempo y recursos con respecto a la original.

Tras el acoplamiento del ligando GRP a los poliplejos (CS-NPs GRP) se realizó la caracterización fisicoquímica y se determinó que el tamaño de partícula (269.23 ± 40.49 mV), PZ (24.96 ± 1.11 mV) y PId (0.2 ± 0.05) tuvieron valores significativamente menores que la muestra control (sin péptidos cariofílicos ni ligando). Mientras que, en comparación con CS-NPs-P2 hubo una diferencia significativa solo para PZ y PId. La caracterización morfológica evidenció que las nanopartículas son esféricas.

Finalmente, la evaluación de la funcionalidad biológica mostró que el ligando GRP aumentó la fluorescencia observada para las líneas celulares HeLa y SiHa, ambas de cáncer cervicouterino, en comparación con la muestra control y con las nanopartículas ensambladas con P1 y P2.

Con los anteriores resultados, se concluyó que la presencia de péptidos cariofílicos aumentan la expresión del transgén y, en el caso de P2, aumenta la compactación del material genético. Además, las modificaciones realizadas a la metodología de acoplamiento del ligando a las nanopartículas aumentaron la eficiencia de reacción y las propiedades fisicoquímicas se vieron mejoradas, así como la transfección *in vitro*. Por otro lado, se hipotetiza por primera vez la sobreexpresión del receptor para GRP en la línea celular SiHa cuya confirmación precisa de PCR de punto final como perspectiva. Lo anterior contribuye a las estrategias de aumento de transfección por parte de vectores no virales y abre el panorama a alternativas terapéuticas dirigidas y más seguras.

Introducción

Terapia génica

La terapia génica se define como el tratamiento de una enfermedad mediante la transferencia de material genético, DNA o RNA, a las células del paciente. El material genético transferido actúa mediante alguna de las siguientes vías: a) permitiendo la expresión del gen transferido, b) inhibiendo la expresión del gen blanco o mediante c) modificación del gen blanco (Tang, & Xu, 2020).

La terapia génica es una opción terapéutica para enfermedades genéticas o adquiridas y actualmente se ha apostado como una alternativa en el tratamiento contra artritis, enfermedades neurodegenerativas y cáncer; de acuerdo con Wileys & Sons (2021) el 67.4% de los ensayos clínicos de terapia génica están enfocados en el tratamiento contra distintos tipos de cáncer.

Se emplean diferentes estrategias según la meta terapéutica y son clasificadas en tres principales categorías: la entrega *ex vivo*, *in situ* e *in vivo*. La primera involucra la colección de las células del paciente para que sean cultivadas, modificadas y trasplantadas de nuevo al paciente; mientras que cuando se emplea una aproximación *in situ* se administra el material genético directamente a la célula o tejido blanco por lo que no es una aproximación ideal para desórdenes sistémicos; finalmente, la entrega *in vivo* emplea vectores virales o no virales para que el material genético actúe sobre la célula o tejido blanco (Goswami, et al., 2019).

Además, de acuerdo con el blanco celular o tisular, la terapia génica puede clasificarse en terapia de línea germinal o somática. La terapia génica de línea germinal involucra la manipulación de las células reproductivas para que los cambios puedan ser heredables, mientras que en la terapia génica para células somáticas los cambios realizados a las células no son heredables y, por lo tanto, se considera más segura (Goswami, et al., 2019).

Vectores virales

Fueron los primeros vectores empleados en terapia génica, se incluyen principalmente a los adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus y lentivirus; la ventaja más importante que presentan es la habilidad para invadir células e insertar su material genético en ellas, además permiten la manipulación de su genoma y la eliminación de genes virulentos sin que se pierda la habilidad de infectar células del hospedero (Goswami, et al., 2019); sin embargo, ésta última también puede ser considerada como una desventaja ya que, de acuerdo con Lukashov, et al. (2016), la eliminación completa de la información

genética de los adenovirus da lugar a los virus *gutless* que, aunque pierden su capacidad de infectar, necesitan de líneas celulares específicas para su producción lo que eleva su costo; además, los vectores virales recombinantes necesitan una purificación y cuantificación realizada tras la separación de los componentes celulares por centrifugación por gradiente de densidad que, a nivel industrial, es costoso y difícil de realizar (Thomas, et al., 2003). Otras de sus desventajas incluyen la respuesta inmune del hospedero, mutaciones insercionales u oncogénesis por integración de DNA viral al genoma del hospedero, cantidad limitada de DNA para ser empacado, citotoxicidad, tropismo propio del virus y la probabilidad de que ocurra reversión en la patogenicidad del vector (Santos-Carballal, et al., 2018).

Debido a los riesgos que implica el uso de vectores virales, se han empleado vectores no virales que poseen una mayor bioseguridad y una capacidad de empaquetamiento del material genético aumentada y se están desarrollando estrategias que aumenten su eficiencia de transfección, lo cual agrega una ventaja a este tipo de vectores (Santos-Carballal, et al., 2018).

Vectores no virales

Comparados con los vectores virales, los vectores no virales presentan una menor citotoxicidad, inmunogenicidad, y mutagénesis; además presentan una mayor capacidad de empaquetamiento del material genético y su producción es más económica y escalable. Por otro lado, su principal desventaja radica en que su eficiencia de transfección depende del material utilizado y las características fisicoquímicas del complejo formado, y generalmente la eficiencia de transfección es superada por aquella alcanzada con vectores virales; otra de sus desventajas es la problemática frente a la falta de estandarización debido a la heterogeneidad de los vectores, caracterización fisicoquímica de los complejos, metodologías para la evaluación de la transfección, entre otras (Helal, et al., 2017).

Existen dos tipos de vectores no-virales: físicos y químicos. En términos generales, los métodos físicos emplean una fuerza física para incrementar la permeabilidad de la membrana celular para lograr la entrega del material genético; mientras que los métodos químicos emplean vehículos naturales o sintéticos para llevar a cabo la misma tarea. Como ejemplo de los métodos físicos se incluyen la electroporación, microinyección, sonoporación y pistola de genes (Oliveira, et al., 2017), mientras que, como ejemplo de los métodos químicos se encuentran los lípidos, péptidos, polímeros catiónicos, partículas inorgánicas y combinaciones entre éstos (Tabla 1).

Tabla 1. Cuadro comparativo de ventajas y desventajas principales de los vectores no virales más comunes.

Elaboración propia a partir de Zu, et al. (2021), Helal, et al. (2017), Santos-Carballal et al. (2018) y Al-Dosari, & Xiang (2009).

Tipo de vector no viral	Ejemplo	Ventajas	Desventajas
Polímeros catiónicos no biodegradables	Polietilenimina (PEI)	<ul style="list-style-type: none"> • Escape endosomal por efecto de esponja de protones • Elevada capacidad de buffer 	<ul style="list-style-type: none"> • Citotoxicidad por acumulación • Formación de agregados • Inducción de citocinas
Polímeros catiónicos biodegradables	Quitósán (CS)	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada biocompatibilidad • Biodegradable • No tóxico • Su superficie puede modificarse para potenciar el grado de transfección y dirigirla de manera específica • Tiene la habilidad de interrumpir las uniones estrechas intercelulares 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja transfección • Escape endosomal sujeto a peso molecular (MW) y grado de desacetilación (DA)
Lípidos	Lípidos catiónicos	<ul style="list-style-type: none"> • Biodegradables • Producción no es costosa • Pueden convertirse específicos de sitio fácilmente 	<ul style="list-style-type: none"> • Poca estabilidad • Generación de respuesta inflamatoria • Citotoxicidad • Reducción de vida media con lípidos catiónicos
Péptidos	Poli-L-lisina (PLL), protamina, entre otros	<ul style="list-style-type: none"> • Interacción específica con receptores de la membrana celular • Biocompatibles • Biodegradables • Aquellos catiónicos pueden condensar eficazmente al material genético 	<ul style="list-style-type: none"> • Citotoxicidad de acuerdo con el grado de polimerización en el caso de PLL • Baja eficiencia de transfección
Moléculas inorgánicas	Fosfato de calcio, sílice, oro, magnéticas	<ul style="list-style-type: none"> • Preparación y funcionalización sencilla, estables en condiciones de almacenamiento • Pueden atravesar fácilmente la membrana celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Interacción con proteínas séricas disminuye la transfección • Citotoxicidad y seguridad sujeta a la molécula empleada

Regulación de la terapia génica

En Estados Unidos (E.E.U.U.) la terapia génica está sujeta a la vigilancia de dos agencias federales dentro del Departamento de Salud y Servicios Humanos (HSS, por sus siglas en inglés): Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Oficina de Actividades Biotecnológicas (OBA). La FDA tiene la autoridad legal

para regular la terapia génica bajo la aplicación del programa Investigational New Drug (IND), los productos de terapia génica contra cáncer (CGT) son evaluados por la OCTGT (Oficina de Terapia Celular, tisular o Génica). Los objetivos de la FDA se basan en la revisión de la seguridad, calidad y efectividad de los CGT. Por su parte, el Foro Regulatorio Internacional de la Terapia Celular Humana promueve la compaginación de los requisitos en materia de regulación de la terapia génica (Husain, et al., 2015).

Los productos medicinales terapéuticos avanzados (ATMPS, por sus siglas en inglés) incluyen a los productos de terapia génica, cuya eficacia y seguridad deben probarse en el o los modelos animales que más mimetice la respuesta del ser humano después de la investigación básica en el laboratorio. Una vez probadas estas características, los procesos de manufactura deben apegarse a lo establecido por las normas relacionadas con las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) (Gastelurrutia, et al., 2021). La vigilancia post-comercialización es obligatoria; además, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) demanda la realización de Plan de Manejo de Riesgo para todos los ATMPS como requisito de post-comercialización (Burrow, 2017).

En México, la NOM-257-SSA1-2014 “En materia de medicamentos biotecnológicos” establece los lineamientos para la evaluación de la información técnica y científica de medicamentos biotecnológicos, criterios de regulación, especificaciones de la fabricación de dichos medicamentos y el procedimiento para la autorización de protocolos de ensayos clínicos de los medicamentos biotecnológicos (Diario Oficial de la Federación, 2014).

Antecedentes

Retos para el desarrollo de vectores no virales

Las barreras que deben ser superadas para lograr exitosamente la entrega del material genético pueden clasificarse en 4 niveles cuando se trata de DNA. El primero es la sangre debido a que la presencia de nucleasas séricas puede degradar los ácidos nucleicos si carecen de la protección de un vector; por otro lado, las proteínas séricas pueden formar complejos con el vector no viral para ser fagocitados. La siguiente barrera ocurre por la interacción a nivel tisular no específica que puede verse influida por el tamaño de la partícula (Helal, et al., 2017).

En tercer lugar, se encuentra el nivel celular que en un principio favorece a los vectores catiónicos debido a la interacción electrostática con la membrana celular. Cuando la nanopartícula carece de ligandos específicos, interacciona con los glucosaminoglicanos

(GAGs) presentes en la membrana plasmática que desencadenan la activación de otros receptores para comenzar con la señalización responsable de la internalización del complejo; sin embargo, nanopartículas catiónicas pueden sufrir procesos de opsonización para ser eliminados de la circulación sistémica y, al carecer de ligando, puede ocurrir internalización en otros tipos celulares además del deseado (Pérez Ruiz de Garibaray, 2016).

Una vez que el vector ha interactuado con la célula, el siguiente paso es la internalización que se lleva a cabo mediante endocitosis e involucra la invaginación de la membrana celular y la formación de vesículas; dicho proceso puede clasificarse como macropinocitosis, fagocitosis y endocitosis mediada por receptor que, a su vez, se clasifica en dependiente e independiente de clatrina. La fagocitosis ocurre en células inmunes especializadas como los monocitos, macrófagos y neutrófilos; mientras que la macropinocitosis se caracteriza por interacciones electrostáticas con el proteoglicano presente en la membrana celular. Sin embargo, la vía de internalización de los complejos más común es la endocitosis y la vía depende de la estructura, composición, tamaño del vector, así como el tipo celular (Silva, 2017).

En tercer lugar, debe ocurrir el escape endosomal para que la nanopartícula pueda continuar hacia su destino, ya sea el citoplasma o el núcleo. La hipótesis del efecto esponja de protones se basa en que, a pH fisiológico, solo algunos átomos de nitrógeno de las aminas presentes en el polímero son protonadas. En el endosoma, el pH desciende y la cantidad de aminas protonadas aumenta, lo que provoca un gradiente de carga que desencadena un flujo de iones Cl⁻; la concentración de iones Cl⁻ incrementa lo que induce un flujo de agua que eventualmente provocará la lisis del endosoma (Silva, 2017).

Una vez en el citoplasma, el RNA es liberado del vector, mientras que el DNA requiere ser transportado hacia el núcleo; en este paso, la afinidad del polímero con el pDNA puede ser una limitante para la disociación del complejo, por lo que debe optimizarse las características fisicoquímicas del complejo. El atravesamiento del pDNA puede ocurrir durante la mitosis por difusión pasiva o mediante el complejo de poro nuclear (NPC) por transporte activo (Pérez Ruiz de Garibaray, 2016) (Figura 1).

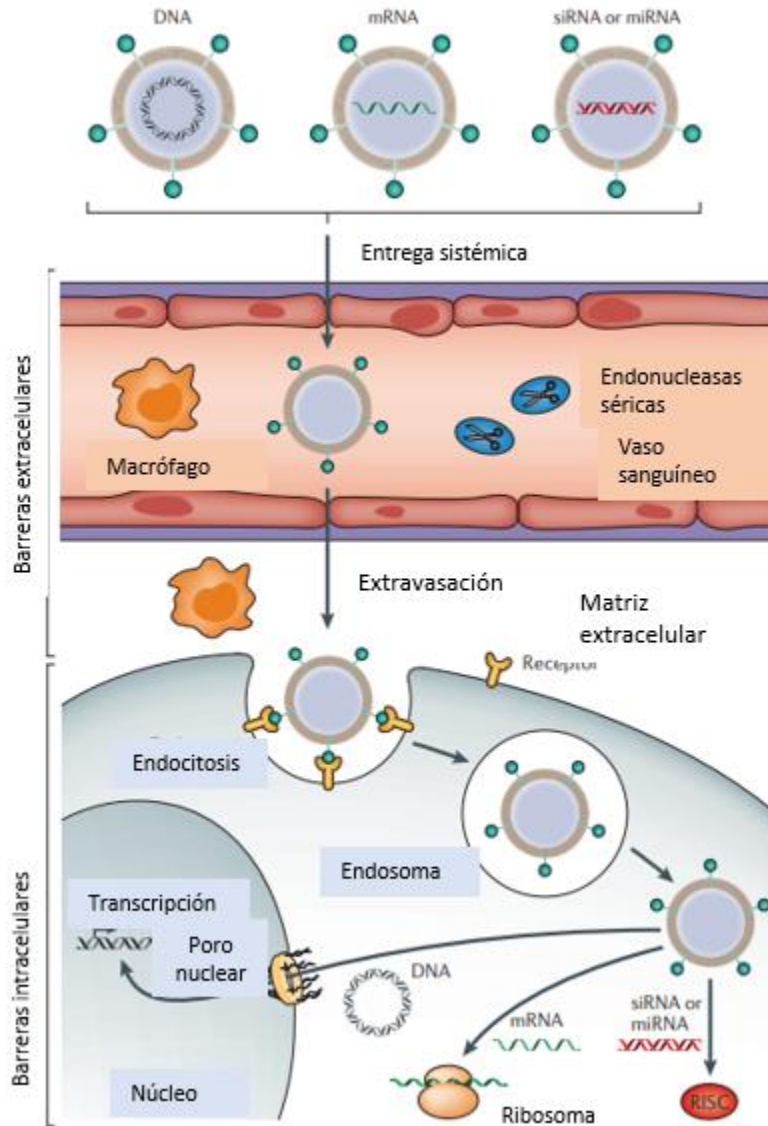


Figura 1. Barreras intracelulares y extracelulares de la terapia génica.

Imagen recuperada de Yin, et al., 2014.

La existencia de nucleasas séricas en el ambiente extracelular provoca la degradación del material genético administrado por vía intravenosa, mucosal o intramuscular; la entrada de ácidos nucleicos a la célula está restringido a la vía endocítica, la interacción electrostática es relevante ya que nanopartículas con carga positiva interactúan con las cargas negativas de la membrana celular, este tipo de interacción es no-específica pero también puede ocurrir la interacción ligando-receptor; una vez internalizado el material genético a la célula blanco, debe escapar de la vesícula endosomal para no ser degradado por enzimas; el DNA debe de ser difundido del citosol al núcleo, proceso que es dependiente de tamaño.

Además de las barreras mencionadas, se debe considerar también que la cantidad de material genético administrada sea suficiente para lograr su efecto terapéutico.

Debido a lo anterior, cuando se emplean vectores no virales, también se considera el desarrollo e implementación de estrategias que aumenten su eficiencia de transfección.

Estrategias para mejorar la eficiencia de transfección de vectores no virales

Péptidos cariofílicos

Los complejos de poro nuclear (NPCs) controlan el paso hacia afuera o hacia adentro del núcleo. El NPC interno permite el paso por difusión pasiva de moléculas de diámetro de hasta 9 nm, mientras que puede haber paso por transporte activo de moléculas de 24 nm de diámetro. Sin embargo, moléculas de mayor tamaño requieren de señales de localización nuclear (NLS) para que puedan llegar al núcleo (Opanasopit, et al., 2009).

Las señales de localización nuclear (NLS) también conocidos como péptidos cariofílicos consisten en máximo 12 aminoácidos, en su mayoría básicos, que actúan como un mediador en el transporte de proteínas del citoplasma hacia el núcleo celular, dicho proceso es facilitado por las importinas también conocidas como carioferinas (Lu, et al., 2021).

El transporte de proteínas-NLS mediado por importinas se divide, a grandes rasgos, en 4 pasos: el ensamblaje del complejo importinas-proteína-NLS en el citoplasma, traslocación del complejo a través del NPCs, desensamble del complejo en el núcleo y la salida de las importinas hacia el citoplasma para su reciclaje. Primeramente, la proteína-NLS es reconocida por la importina subunidad α que, a su vez, es reconocida por la importina subunidad β ; el trímero formado (NLS-proteína-importina α -importina β) es dirigido hacia la nucleoporina por acción de la subunidad β para que la importina subunidad α pueda interactuar con la nucleoporina y entonces ocurra su transporte a través del NPC. Una vez en el núcleo, la proteína RAD-GRP se une a la importina α/β , lo que provoca que el complejo trimérico se disocie; posteriormente, RAD-GRP - importina α/β salen del núcleo y en el citoplasma ocurre la disociación de complejo para el reciclaje de importina α/β (Lu, et al., 2021).

Ahora bien, en terapia génica está reportado que la presencia de NLS influye en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas como el tamaño y carga de las nanopartículas, estabilidad intracelular y eficiencia de transfección. La investigación de Opanasopit, et al. (2009) reporta que hubo una disminución en el tamaño de partícula y una mejora en la eficiencia de transfección comparado con el control en células HeLa.

Terapias génicas dirigidas

Debido a la problemática que desencadena la falta de direccionamiento del poliplexo, se ha empleado el direccionamiento activo en el que se utilizan moléculas como carbohidratos, péptidos, aptámeros y anticuerpos como ligandos de alta afinidad para

modificar a los vectores no virales con el fin de mejorar la transfección y además convertir al complejo en tejido-específico (Figura 2); moléculas como el folato y la transferrina se han empleado en terapia génica contra cáncer debido a que los receptores de dichas moléculas se encuentran particularmente sobreexpresados en células cancerosas (Muhammad, et al., 2019).

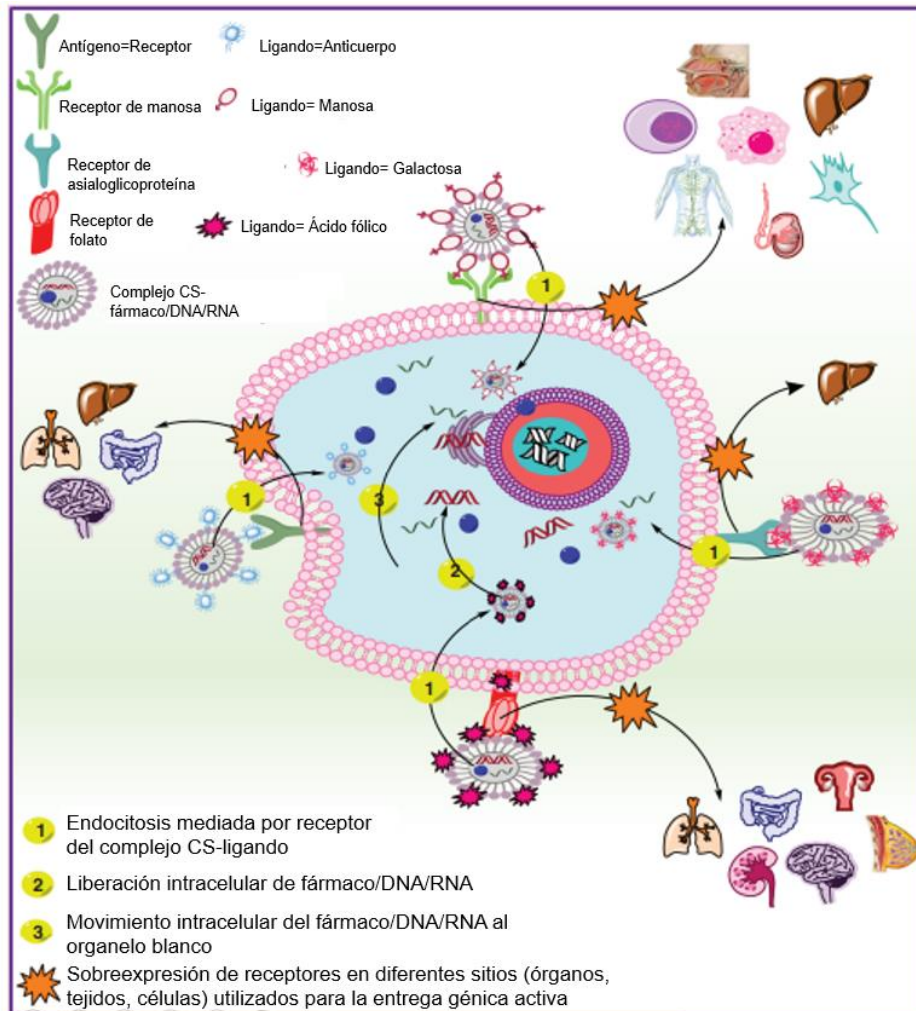


Figura 2. CS-ligandos para terapia génica dirigida de DNA/RNA/fármaco a diversos sitios blanco.
Recuperada de Qindeel, et al., 2019.

Endocitosis mediada por receptor

La endocitosis mediada por clatrina (CME) requiere de la formación y fisión de vesículas cubiertas de clatrina seguido de una acidificación de ésta dado que ocurre la integración con el endosoma tardío cuyo proceso de acidificación ya ha ocurrido para que pueda fusionarse con el lisosoma y así ocurra la degradación del contenido del mismo. Debido a lo anterior, esta vía debería evitarse o se debe de diseñar estrategias para evitar la fusión lisosomal, tal como el efecto de esponja de protones (Xiang, et al., 2011). Por otro lado, la

endocitosis mediada por caveolas (CavME) es una vía no digestiva dado que el pH interno es neutro y las invaginaciones presentes en la membrana plasmática para la entrega de las nanopartículas (Islam et al., 2014) (Figura 3).

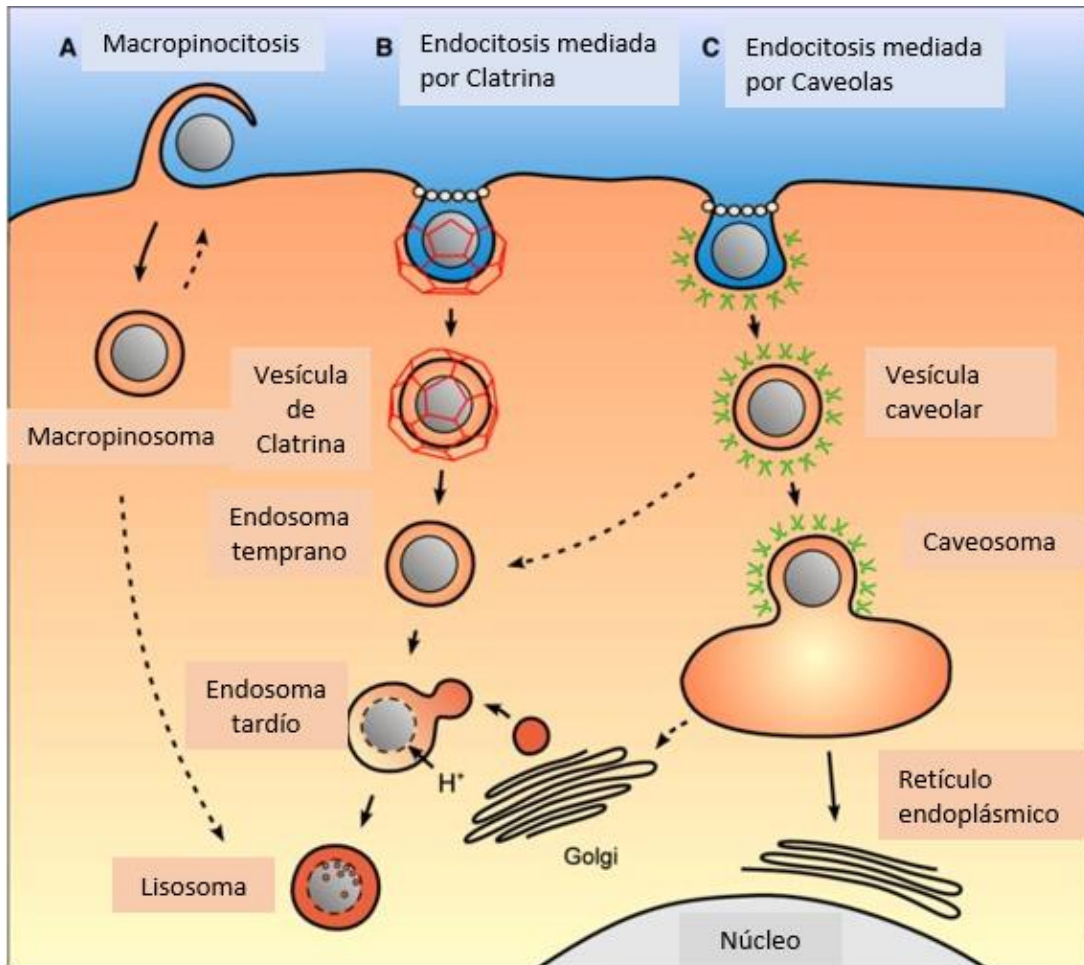


Figura 3. Mecanismos de internalización que puede seguir el vector no viral en terapia génica.

Recuperado de Couvreur, 2006

A. La micropinocitosis provoca la formación de macropinosoma que puede fusionarse con el lisosoma. B. CME provoca la maduración del endosoma para fusionarse con el lisosoma. C. CavME invaginación de la membrana plasmática con caveolina.

Un estudio realizado por Garaiova et al. (2012), analizó las vías de internalización de complejos de quitosán lineal y pDNA mediante el empleo de inhibidores de endocitosis. Los resultados indicaron que la internalización ocurre mediante vías dependientes e independientes de clatrina y que el mecanismo de internalización de poliplexos depende de la composición, tamaño, forma, carga de superficie, tipo celular y composición de la membrana celular (Garaiova, et al., 2012).

Ligando GRP

Uno de los receptores que se encuentran sobreexpresados en algunos tipos de cánceres es el receptor para el péptido liberador de gastrina (GRPR).

GRPR es una proteína G de la familia de los receptores de bombesina, los péptidos pertenecientes a esta familia actúan como factores de crecimiento para numerosos tipos de cánceres, incluyendo el de mama, colon, próstata y de pulmón. La bombesina fue primero aislada de la piel de la rana *Bombina bombina*, se han identificado 3 receptores BBN en mamíferos: GRPR, para neuromedina B (NMBR) y el receptor de bombesina subtipo 3 (BRS-3). Bombesina y su equivalente en mamífero (GRP) tienen similitudes estructurales y funcionales, comparten la secuencia homóloga de 7 aminoácidos (Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met- NH₂) que es importante para el reconocimiento por el receptor y la posterior internalización (Begum, et al., 2016).

GRP es un péptido de 27 aminoácidos (Val-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Gly-Gly-Thr- Val-Leu-Thr-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) y dentro de sus funciones fisiológicas, se encuentran la transmisión sensorial, contracción del músculo liso, regulación del ciclo circadiano, participa en algunas de las respuestas inmunológicas, termorregulación, secreción de hormonas pituitarias y gástricas, secreción pancreática y saciedad. También se ha descrito que actúa como un potente mitógeno para células cancerosas de diferentes orígenes tanto en modelos *in vitro* e *in vivo* de carcinogénesis, así como un agente proangiogénico (Cornelio et al., 2007).

Baratto et al. (2020), ha descrito la sobreexpresión de GRPR en cáncer de próstata, pancreático, de pulmón, colorrectal, mamario, neuroblastma y de cuello y cabeza; también menciona que influye en la progresión del ciclo celular (G1→S) y se ha observado que su presencia está relacionada con una mejora en la diferenciación tumoral. Aunque hay pocos reportes de la sobreexpresión de GRPR en cáncer cervicouterino, Cornelio, et al. (2007) reportó mediante tinción inmunohistoquímica que la sobreexpresión de GRPR estaba presente en el 99% de las muestras de cáncer cervical ($n=88$) y que había diferencia significativa en su presencia con respecto a los controles ($n=14$).

Por otra parte, la investigación de Begum et al (2016) empleó a BBN como un agonista de GRPR con el fin de evaluar el nivel de expresión del receptor en líneas celulares de distintos tipos de cáncer, incluyendo HeLa, utilizando la línea celular Caco-2 como control positivo. Se reportó que la línea celular HeLa tenía una sobreexpresión significativa del receptor GRPR.

En contraste, GRPR se encuentra expresado en tejido sano del páncreas, colon, mama, próstata y en algunas regiones del Sistema Nervioso Central (hipocampo, hipotálamo y amígdala) (Lau, et al., 2019). Además, Baratto et al. (2020) reportó una clasificación semicuantitativa para la expresión de GRPR de acuerdo con los valores estandarizados de captación (SUV por sus siglas en inglés, *Standardized Uptake Value*) cuyos resultados establecen que en el hígado, cerebro y bazo no tuvieron un SUV significativo en comparación con el pool sanguíneo (control), mientras que en pulmones sanos y glándulas salivales no expresan GRPR; en contraparte, se registró que el páncreas tuvo valores de SUV significativamente mayores al control, seguido del esófago, estómago, duodeno y recto. A pesar de la presencia del receptor para GRP, Baratto et al. (2020) también menciona que el nivel de expresión para GRPR en células cancerígenas es mayor. Es debido a esto, que el ligando GRP es una molécula prometedora para el direccionamiento de terapia génica contra células tumorales.

Quitósán como vector no viral en terapia génica

Dentro de los biopolímeros catiónicos, el quitosán y sus derivados son de los más comúnmente empleados como vectores no virales por su citotoxicidad e inmunogenicidad reducida.

El quitosán está compuesto por D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidos por un enlace glucosídico β (1 \rightarrow 4) (Figura 4) y se obtiene mediante la desacetilación alcalina de la quitina (Helal, et al., 2017).

No es soluble en agua u otros solventes orgánicos, aunque es soluble en soluciones ácidas acuosas con pH <6.5 debido a su valor de pKa en los grupos amino. En ambientes ligeramente ácidos las aminas primarias en la estructura del quitosán son protonadas, lo que le confiere la capacidad interactuar con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos mediante fuerzas electrostáticas (Oliveira et al., 2017).

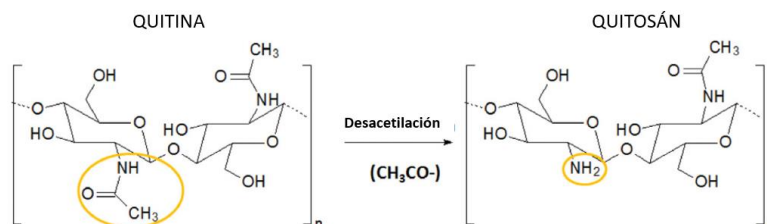


Figura 4. Estructura de la quitina y quitosán. Recuperado de Muxika, et al. (2017).

El quitosán fue introducido como un vector para terapia génica en 1995 por Mumper et al. y, de acuerdo con Rizeq, et al. (2019), los complejos CS-DNA protegen al material genético

de la degradación por parte de las nucleasas y pueden provocar la lisis del endosoma tras 72 h de su administración.

La degradación del quitosán puede ocurrir por enzimas que hidrolizan enlaces glucosamina-glucosamina, glucosamina-N-acetil-glucosamina (quitosanasas), N-acetil-glucosamina-N-acetil-glucosamina (quitinasas) e *in vivo* ocurre principalmente por acción de la lisozima. Hasta el momento, se han identificado 8 quitinasas humanas y 3 de ellas con actividad enzimática sobre el quitosán (Kean, & Thanou, 2010). Por otro lado, Jiang, et al. (2017) reportó que, en la línea celular de macrófago de murino (RAW 264.7), los compartimentos ácidos intracelulares como los lisosomas y endosomas son responsables de la degradación y exocitosis de CS. Es importante recordar que, de acuerdo con la hipótesis de la bomba de protones, algunos átomos de nitrógeno de las aminas presentes en el CS son protonadas a pH fisiológico, lo que provoca un gradiente de carga y, a su vez, provocará la lisis del endosoma (Silva, 2017).

La biodegradación del quitosán produce oligosacáridos de cadena variable no tóxicos que pueden ser incorporados a glicosaminoglicanos y glicoproteínas; además, su cinética parece estar inversamente relacionada con el grado de desacetilación (Aranaz, 2009).

Se ha reportado cómo la estructura del CS, su DA y MW afectan las características fisicoquímicas y, por ende, su funcionalidad biológica. Estudios sugieren que las condiciones óptimas para el CS son; bajo MW, elevado DA, tamaños de partícula de ~100 nm y potencial Zeta moderadamente positivo (Santos-Carballal, et al., 2018).

Existen diversas técnicas mediante las cuales pueden sintetizarse nanopartículas a base de quitosán (CS-NPs) aunque las principales son la gelación iónica y coacervación compleja; en ambas metodologías el radio entre el quitosán y la molécula con carga negativa determina el tamaño y la carga de las CS-NPs. En la gelación iónica, ocurre la interacción electrostática entre los grupos amino del quitosán y un polianión con carga negativa como el tripolifosfato (TPP), el TPP ayuda a reducir el tamaño de partícula y aumentar la estabilidad del complejo; mientras que la coacervación compleja se basa en la formación de complejo iónico por la interacción entre los grupos amino del quitosán y los grupos fosfato del DNA (Nagpal, et al., 2010).

Otra ventaja del CS es que los grupos hidroxilo y amino presentes en su estructura, permiten su modificación mediante enlaces covalentes con el objetivo de dirigir las nanopartículas a las células blanco (Oliveira, et al., 2017), una de las metodologías para la modificación de CS es mediante el empleo de entrecruzadores

Acoplamiento de biomoléculas para direccionamiento de nanopartículas empleando entrecruzadores

El entrecruzamiento covalente químico es un proceso irreversible que permite el acoplamiento estable de moléculas al quitosán; entre estas moléculas se encuentran diversos ligandos de tipo peptídico que sean de interés para la terapia génica dirigida, como el GRP. A continuación, se describen las reacciones relacionadas con este proceso de entrecruzamiento.

Tiolación: introducción de grupos sulfhidrilo

En primer lugar, es importante la generación de grupos tiol libres en el quitosán de tal manera que pueda tener los electrones disponibles para la formación del enlace covalente con el entrecruzador y la molécula a acoplar. Se han desarrollado múltiples estrategias para la tiolación de grupos amino del quitosán; entre los más utilizados es la reacción de los grupos amino del CS con sustancias con grupos tiol reactivos como el 2-iminotiolano (reactivo de Traut), tiolactonas, y ésteres de N-hidroxisuccinimida (Figura 5).

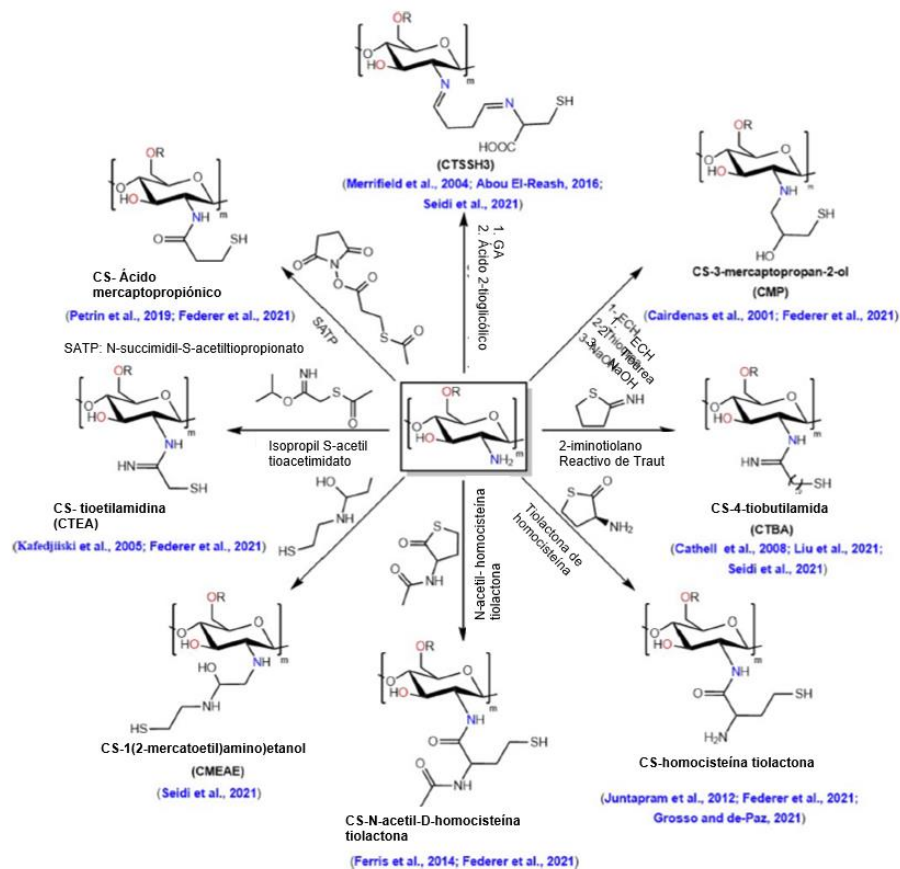


Figura 5. Resumen de estrategias empleadas para la tiolación de los grupos amino del CS mediante el empleo de reactivos con grupos tiol.

Recuperado de Alkabi, J. (2022)

Entre las ventajas del empleo de grupos sulfhidrilo reactivos para el acoplamiento de moléculas al quitosán, se encuentra la restricción de la modificación solamente a ciertos sitios dentro de la molécula blanco; además, la frecuencia de grupos sulfhidrilo en proteínas u otro tipo de moléculas es normalmente bajo comparado con otros grupos como las aminas o carboxilatos. Sin embargo, los grupos sulfhidrilo son susceptibles a ser oxidados y formar puentes de disulfuro por lo que se recomienda preparar los buffers en ausencia de oxígeno o adicionarles EDTA (0.01-0.1 M) por su actividad quelante de iones metálicos (Hermanson, 2013).

A continuación, se describen brevemente las metodologías de modificación de aminas presentes en las biomoléculas de naturaleza peptídica con reactivo de Traut para utilizar el el entrecruzador SPDP.

Modificación de aminas con reactivo de Traut

La modificación de aminas puede realizarse mediante el empleo del reactivo de Traut (2-iminotiolano), que es un imidotioéster cíclico soluble en agua con la capacidad de reaccionar con aminas primarias a un pH 7-10 para su tiolación en una reacción de apertura de anillo (Figura 6). La concentración del grupo sulfhidrilo resultante (péptido tiolado, en el caso de un ligando), deberá ser evaluado mediante el ensayo de Ellman's o mediante el coeficiente de absorptividad del 2-iminotiolano ($\epsilon = 8,840 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 248 nm. Los productos tiolados por reacción de Traut deben ser utilizados inmediatamente en una reacción de conjugación para evitar la pérdida de grupos tioles disponibles por reciclación (Figura 7) (Hermanson, 2013).

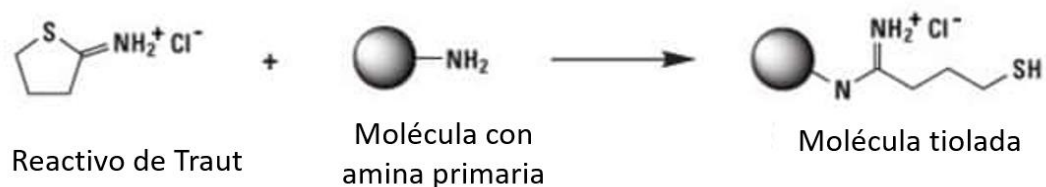


Figura 6. El 2-iminotiolano interactúa con la amina primaria para crear un grupo sulfhidrilo.
Recuperado de Hermanson 2013.

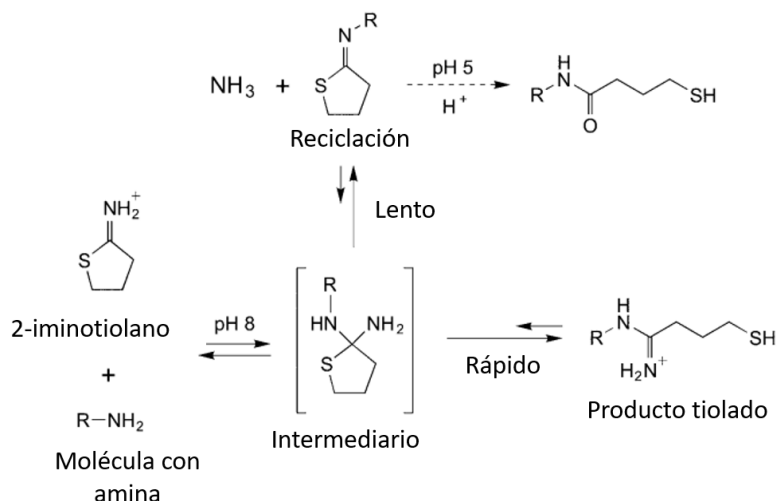


Figura 7. El grupo tiol terminal puede reciclarse para crear otro derivado del iminotiolano.
Recuperado de Hermanson 2013.

Modificación de aminas con SPDP

El N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), es un entrecruzador ampliamente utilizado; el éster NHS terminal del SPDP reacciona con grupos amino, mientras que el 2-piridilditio terminal reacciona con grupos sulfhidrilo para formar puentes de disulfuro (Figura 8 inciso a). También es empleado para crear grupos sulfhidrilo en proteínas u otras moléculas en conjunto con DTT que es un agente reductor para liberar la piridin-2-tiona y dejar al grupo sulfhidrilo libre que posteriormente puede ser conjugado con cualquier entrecruzador que contenga grupos reactivos sulfhidrilo (Figura 8 inciso b) (Hermanson, 2013).

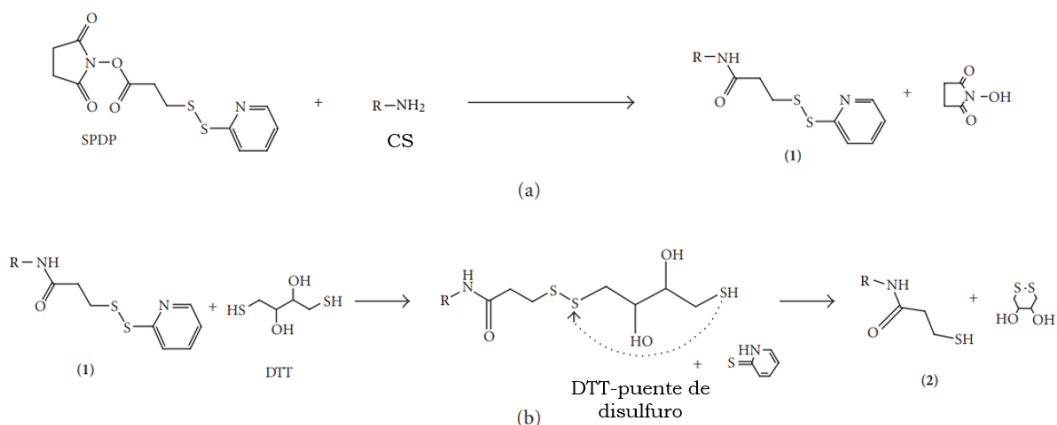


Figura 8. a) Reacción entre el SPDP y el grupo amino del quitosán para la formación de puentes de disulfuro y la liberación de la piridin-2-tiona. b) Reacción de reducción entre el quitosán modificado por SPDP y el DTT para la formación de grupos sulfhidrilo libres. Recuperado de Katas, et al., 2012

Una vez ensambladas las nanopartículas y acoplada la biomolécula o el ligando a éstas, es importante realizar la caracterización fisicoquímica para descartar que la modificación tenga efectos significativos en tamaño de partícula, PZ y PId. Las metodologías empleadas, se describen a continuación.

Metodologías empleadas para la evaluación de nanopartículas

Los parámetros a continuación enlistados son útiles para conocer la interacción entre el pDNA-CS, la estabilidad de los complejos y si forman o no agregados, citotoxicidad y para predecir la interacción con la membrana celular, eficiencia de transfección y la disolución del poliplexo una vez adentro de las células. De ahí la importancia de su determinación (Santos-Carballal, et al., 2018).

Determinación de tamaño de partícula por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Se basa en las fluctuaciones de macromoléculas y partículas coloidales sujetas a movimiento Browniano cuando están dispersas en solvente. Posteriormente, un rayo de luz monocromático incide la solución provocando un cambio tipo Doppler de la luz. Las mediciones DLS permiten la evaluación de la habilidad de una macromolécula a la difusión en solución. Es posible calcular el radio hidrodinámico de una partícula asumiendo una geometría esférica y la distribución de la polidispersión. La ecuación Stokes-Einstein relaciona la difusión de partículas esféricas en medio líquido y permite la determinación del radio hidrodinámico de las partículas dinámicas en un medio con viscosidad conocida, temperatura constante y movimiento Browniano (Santos-Carballal, et al., 2018).

Determinación Potencial Zeta (PZ)

El ZP es un parámetro fisicoquímico determinado mediante la movilidad electroforética y la determinación de la velocidad de las partículas mediante Velocimetría por Láser Doppler (LDV). La movilidad electroforética es la velocidad a la cual una partícula cargada migra en un medio líquido bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado. Cuando el voltaje es aplicado mediante los electrodos, las partículas cargadas migrarán hacia el campo con la carga opuesta. Mediante el empleo de la ecuación Henry, la movilidad electroforética es convertida al potencial Zeta para permitir la comparación de los materiales en diferentes condiciones (Santos-Carballal, et al., 2018).

Determinación de forma física por Microscopía Electrónica de Barrido

Se basa en el empleo de un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen, tiene una gran profundidad de campo que permite el enfoque de una gran parte de la muestra, además que permite la observación de imágenes de alta resolución.

La muestra es recubierta con una capa de carbón o de un metal como el oro para proporcionarle propiedades conductoras a la muestra, el procesamiento de la muestra induce artefactos estructurales durante la preparación que pueden minimizarse mediante diversas técnicas como ultrasonido o la modificación del pH para mejorar la dispersión y suspensión (Bouzakher, N. et al., 2019).

Evaluación de funcionalidad biológica *in vitro*

Una forma de evaluar la funcionalidad biológica para sistemas de entrega en terapia génica es mediante la realización ensayos de transfección *in vitro* en los cuales puede evidenciarse la efectividad de las nanopartículas para hacer llegar el material genético a la célula y al núcleo. En este caso, se evalúa la expresión del transgén y no el gen *per se*, por lo que se emplea un gen reportero como los bioluminiscentes. Uno de estos plásmidos que contiene genes reporteros es el pQBI25, el cual codifica para la proteína verde fluorescente que facilita la evaluación de la funcionalidad biológica debido a que la expresión de la proteína puede observarse mediante el empleo del microscopio de fluorescencia.

Definición del problema y justificación

El cáncer es un problema de salud global; en el 2020 hubo 18.1 millones de casos a nivel mundial y 10 millones de muertes por esta enfermedad, el cáncer cervicouterino se encuentra dentro de los primeros 10 tipos de cáncer más comunes a nivel mundial. La perspectiva a futuro calcula que la carga de cáncer aumentará aproximadamente en un 60% durante las próximas dos décadas (World Cancer Research Fund International, 2022). En México, el INEGI reporta que el cáncer es la tercera causa de muerte y que en la última década aumentó la tasa de defunciones por tumores malignos de 6.18 a 7.17 por cada 10 mil personas. Los grupos de edad más afectados son aquellos de 50 años en adelante (INEGI, 2022) y el cáncer cervicouterino en el 2018, se posicionó en el 4° lugar de incidencia (Arceo, et al., 2021). Debido al incremento de incidencias previsto, se debe apostar a estrategias de prevención y a nuevas y mejores opciones terapéuticas.

El tratamiento convencional del cáncer incluye cirugía, quimio y radioterapia. Sin embargo; dichas opciones presentan algunas limitaciones, por ejemplo, la cirugía solo es una opción viable en etapas tempranas de la enfermedad, mientras que la quimio y radioterapia dañan a células, tejidos y órganos sanos; de esta manera, las limitaciones de la terapia convencional contra el cáncer radican en la dosificación compleja, falta de especificidad y, sobre todo, los numerosos y diversos efectos adversos que dañan la calidad de vida de los pacientes (Tolossa, et al., 2021). Por otro lado, las opciones terapéuticas novedosas incluyen a la terapia con células madre, terapia génica, terapia dirigida, nanopartículas, entre otras.

En terapia génica se emplean vectores para la transferencia del material genético, los más comunes son los vectores virales por su buena eficiencia de transfección, aunque son inmunogénicos, tienen una capacidad limitada de empaquetamiento de material genético y pueden provocar mutaciones indeseadas u oncogénesis; es por esto por lo que cada vez es mayor el interés por los vectores no virales.

Dentro de los vectores no virales, los polímeros catiónicos, como el quitosán, permiten la interacción electrostática con el material genético y lo protegen de la degradación enzimática (Thomas, et al., 2019); además, facilitan la funcionalización de las nanopartículas (Santos-Carballal, et al., 2018).

A pesar de las numerosas ventajas de los vectores no virales, aún se debe de mejorar la eficiencia de transfección y una de las estrategias para lograrlo es el acoplamiento de moléculas que, mediante interacción Ligando-Receptor, permitan además un direccionamiento de las nanopartículas. Uno de los receptores sobreexpresados en algunas

células cancerosas es el GRPR, por lo que el acoplamiento del ligando GRP a nanopartículas a base de quitosán permitiría el aumento en la eficiencia de transfección y direccionamiento del tratamiento a células de algunos tipos de cáncer.

Hipótesis

Si se acopla el ligando GRP, mediante el empleo del entrecruzador SPDP, a nanopartículas a base de quitosán ensambladas por coacervación compleja, entonces se aumentará la eficiencia de transfección en células tumorales debido a la interacción específica ligando-receptor entre las nanopartículas dirigidas a células tumorales. Lo anterior como una herramienta para solucionar parcialmente la baja transfección de los vectores no virales

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar y evaluar una metodología de acoplamiento del ligando GRP empleando el entrecruzador SPDP con el fin de direccionar nanopartículas a base de quitosán para terapia génica hacia células tumorales cervicouterinas.

Objetivos particulares

1. Transformar el plásmido pQBI25 en la cepa de *E. coli* TOP10 con la finalidad de generar un banco de trabajo como fuente ilimitada del plásmido
2. Propagar y aislar el plásmido pQBI25 mediante el MegaKit Qiagen® para su cuantificación y evaluación de integridad
3. Determinar las relaciones molares óptimas plásmido/péptidos cariofílicos mediante ensayos de retardo para obtener el complejo plásmido/péptido cariofílico
4. Determinar las relaciones molares óptimas plásmido-péptido cariofílico/quitosán mediante ensayos de retención para el ensamblaje de nanopartículas con características óptimas
5. Desarrollar una metodología de acoplamiento del ligando GRP a las nanopartículas previamente ensambladas utilizando el entrecruzador SPDP
6. Determinar tamaño, índice de polidispersión, morfología y potencial Zeta de las nanopartículas obtenidas mediante DLS y LDV
7. Evaluar la funcionalidad biológica de las nanopartículas en ensayos de transfección *in vitro* en las líneas celulares HeLa y SiHa (cáncer cervicouterino)

Metodología

Preparación del quitosán como vehículo

El quitosán pulverizado fue obtenido a partir del exoesqueleto de camarón con un MW de 20.6 y 52.7 kDa, un DA de 85-90%. Fue producido y caracterizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y se utilizó sin ningún otro tratamiento adicional (Miranda, 2011). Se preparó una solución de quitosán al 1.0% con ácido acético al 0.1% mediante la adición progresiva del sólido con agitación constante a temperatura ambiente hasta su completa disolución.

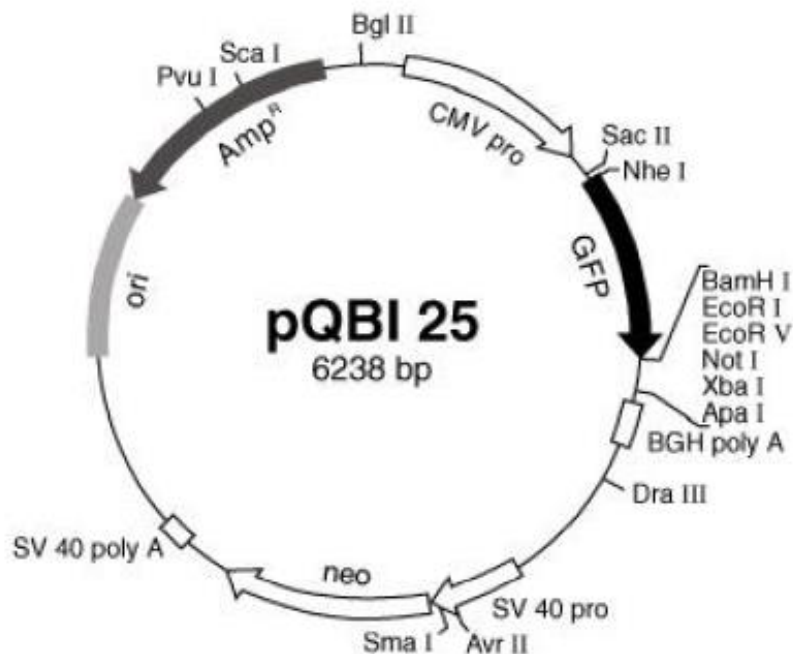
Generación de células competentes

Las bacterias *E. coli* TOP 10 fueron descongeladas y se dispusieron en un tubo con tapón de baquelita con 1 mL de caldo Luria-Bertani (LB) (Invitrogen) estéril y se incubaron a 37°C por 17 h, una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 8000 rpm/5 min. Se resuspendió la pastilla en 0.5 mL de CaCl² (30nM) frío y se adicionó 50 µL de glicerol bacteriano estéril para ser almacenadas a -20°C.

Transformación de plásmido pQBI25 en *Escherichia coli*

En condiciones estériles, se adicionó 1 µL del plásmido pQBI25 (proporcionado por el Dr. Rubén García Sánchez), el cual cuenta con el gen de la proteína verde fluorescente (Figura 9) a las células TOP10 y se llevó a baño de hielo durante 30 minutos seguido de un choque térmico a 42°C por 90 segundos y baño de hielo por 2 segundos. Posteriormente, se adicionaron 400 µL de caldo LB y se incubó durante 1 h a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo, las condiciones estériles ya no son necesarias, se llevó la muestra a la microcentrífuga durante 4 minutos, se descartó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla y se sembró en Agar LB con ampicilina (Invitrogen).

pQBI25



Feature Locations:

CMV promoter:	242-967
Transcription start	893
GFP coding sequences	979-1696
chromophore	1159-1176
SP6 promoter/primer	1791-1808
BGH polyA	1835-2058
SV40 promoter	2582-2907
neo coding sequences	2944-3734
SV40 polyA	3901-4031
pUC ori	4717-5188
ampicillin	6103-5245

Figura 9. Mapa del plásmido pQBI25.

Propagación y aislamiento del plásmido

Se prepararon 500 mL de medio LB suplementado con ampicilina, se realizó un inóculo de la bacteria *E. coli* TOP 10 transformada con el plásmido pQBI25 (Figura 9) y se incubó a 37°C por 16-18 h, el plásmido empleado codifica para la proteína verde fluorescente lo que facilita su observación en los ensayos de transfección. El aislamiento se realizó utilizando el kit QIAGEN Mega Prep el cual se describe brevemente: el caldo de cultivo tras la finalización del periodo de incubación fue centrifugado a 4000 rpm/15 min/4°C. El sobrenadante fue descartado y la pastilla fue resuspendida en 50 mL de buffer P1 frío

(QIAGEN; 50 mM Tris- HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNAsa A)), se adicionaron 50 mL de buffer P2 (QIAGEN; 200 mM NaOH, 1% SDS), se agitó por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Seguido, se adicionaron 50 mL de buffer P3 frío (QIAGEN; 1.0 M acetato de potasio pH 5.5), se agitó por inversión y se incubó en hielo por 30 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm/30 min/4°C. Se equilibró la columna QIAGEN-tip con buffer QBT (QIAGEN; 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol (v/v)) y el sobrenadante se vertió en la columna. La columna se equilibró con buffer QC (QIAGEN; 1.0 NaCl, 50 mM 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol (v/v)). El DNA se eluyó con buffer QF (QIAGEN; 1.25 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanol (v/v)) y se precipitó con isopropanol a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar a 14000 rpm/30 min/4°C. La pastilla fue lavada con etanol 70% y se centrifugó por 10 min. El etanol fue descartado y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, la pastilla se disolvió en agua libre de nucleasas, la cuantificación de pDNA fue determinada mediante el espectrofotómetro Epoch (Biotek, UK).

Para conocer la integridad se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% por 20 minutos a 120 mV.

Ensayos de retardamiento entre pQBI25 y péptidos cariofílicos

Las secuencias de los péptidos cariofílicos empleados se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de los péptidos cariofílicos empleados

Péptido 1 (P1)	CGGGPKKKRKVED
Péptido 2 (P2)	PAAKRVKLD

Se realizaron diluciones seriadas de los péptidos cariofílicos en agua inyectable para obtener las siguientes concentraciones: P1: 0.3, 0.35, 0.4, 0.45 y 0.5 µM y P2: 0.19, 0.27, 0.36, 0.44, 0.52 y 0.59 µM, la diferencia de concentraciones se debe a que la longitud de la secuencia es diferente entre los péptidos cariofílicos. Se realizó una dilución de DNA a 100 ng/µL con sulfato de sodio (25 mM) a partir de la alícuota con mayor concentración y mejor relación 260 nm/280 nm obtenida. Posteriormente se adicionó con una relación 1:1 la solución del péptido a la del pDNA, respetando el orden y se incubó en agitación en vórtex por 30 minutos a temperatura ambiente.

Cada sistema fue corrido en electroforesis de gel de agarosa al 1% a 30 minutos a 120 mV. A partir de lo obtenido en la electroforesis se determinó el radio molar óptimo pDNA-péptido cariofílico.

Ensayos de retención entre pQBI25-péptidos cariofílicos y quitosán

Se realizó una dilución de DNA a 100 ng/μL y de los péptidos cariofílicos, P1 [0.35] μM, P2 [0.52] μM, con agua inyectable como diluyente. Además, se realizaron diluciones seriadas de quitosán 20.6 kDa con ácido acético al 1% como diluyente a las concentraciones; 0.08, 0.1, 0.12, 0.14 y 0.16%.

Se prepararon 5 sistemas adicionando la solución de DNA, la solución de P1 en una relación de volumen 1:1 y se dejaron reaccionar por 30 minutos en vórtex a temperatura ambiente, posteriormente a cada sistema se le adicionó la concentración de quitosán correspondiente respetando la relación de volumen 1:1:1 (DNA:P1:CS) y se dejó reaccionar en vórtex durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El proceso anterior se repitió para P2 y las mismas concentraciones de quitosán. Finalmente, se corrió electroforesis en gel de agarosa al 1% a 120 mV por 30 minutos.

Ensamblaje de CS-NP por coacervación compleja

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir del ensayo de retardo se eligió la concentración óptima de quitosán y se ensamblaron las nanopartículas para su caracterización. Para la CS-NP con el P1 se empleó la concentración de quitosán de 0.16% y para el P2 0.14%

Se preparó una dilución de DNA (100 ng/μL) en Na₂SO₄ (25 mM), una dilución del P1 [0.35 μM] y P2 [0.52 μM] y quitosán 20.6 kDa 0.16, 0.14% en ácido acético pH 5.5. Se adicionó el DNA, P1 (relación 1:1) a concentración ideal de [0.35] μM y se dejó reaccionar en vórtex por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó la solución de quitosán (relación 1:1:1) 20.6 kDa 0.16% y se dejó reaccionar 30 minutos en vórtex a temperatura ambiente. El procedimiento anterior se repitió para P2 (concentración ideal de [0.52] μM) con la solución de quitosán 0.14%.

Acoplamiento del ligando GRP a las nanopartículas mediante SPDP

Metodología adaptada a partir de Mao, et al., 2000 & Hermanson, 2008.

Tiolación de GRP

Se ensamblaron las NP mediante coacervación compleja con el P2 tal y como se describió previamente. Posteriormente se preparó una solución del péptido GRP (10 mg/mL) en buffer de fosfatos, solución de reactivo de Traut (2 mg/mL) en agua inyectable.

Inmediatamente, se adicionó a la solución GRP la solución de Traut, respetando una proporción de 45.8 μL de solución de Traut por cada mililitro de solución de GRP. Se dejó reaccionar con ayuda del vórtex durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para cuantificar los grupos sulfhidrilo se realizó el ensayo de Ellmans mediante el coeficiente de absorptividad. Brevemente, consiste en disolver 4 mg del reactivo de Ellmans en 1 mL de buffer PBS pH=8; por cada muestra a cuantificar se preparó el sistema por duplicado de la siguiente forma: 50 μL de la solución de Ellmans y 2.5 mL del buffer PBS (buffer de reacción) y posteriormente se agregan 250 μL de la muestra. El blanco se preparó con 250 μL del buffer de reacción. Se homogenizaron las muestras y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos, posteriormente el espectrofotómetro se configuró a 412 nm y se calibró con el blanco para después leer las muestras. Finalmente, la concentración de grupos sulfhidrilo se calculó a partir del coeficiente de extinción molar ($14,150\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Funcionalización del quitosán con SPDP

Se mezcló 1 mL de CS-NP con 5 μL de solución DSS (10mM), 10 μL de SPDP (10mM) y 10 μL de PBS 10x; posteriormente se dejó reaccionar por 30 minutos con agitación constante a temperatura ambiente y se agregaron 50 μL de glicina 1M para terminar con la reacción.

Acoplamiento de GRP-SH a CS-NP-SPDP

Se adicionaron 250 μL de GRP-SH (1 mg/mL) a CS-NP-SPDP y se dejaron reaccionar por una hora con agitación constante a temperatura ambiente, posteriormente se realizó una centrifugación con spin, se tomó una alícuota del sobrenadante y se hizo una dilución 1:5 en buffer PBS para leer en el espectrofotómetro a 343 nm para determinar la eficiencia de reacción (cálculo descrito en resultados, sección “Eficiencia de reacción para CS-NP-GRPSH”).

Evaluación fisicoquímica de CS-NPs y CS-NPs-GRP

Dispersión dinámica de luz (DLS)

El tamaño de los complejos se determinó con ayuda del equipo Malvern ZetaSizer Pro. Las muestras fueron cargadas en una celda capilar DTS1070. La distribución de tamaño obtenida por intensidad fue ajustada a una función de correlación por los algoritmos del software ZetaSizer. Posteriormente, los datos se graficaron en el software OriginPro 8 y para el análisis estadístico se realizó la prueba *t* de Student en Excel.

Movilidad electroforética acoplada a láser Doppler

El ζ -potencial de CS-NPs fue determinado por movilidad electroforética y por Velocimetría por Láser Doppler (LDV) utilizando el equipo Malvern ZetaSizer Pro. De igual manera, los datos se graficaron en el software OriginPro 8 y para el análisis estadístico se realizó la prueba *t* de *Student* en Excel.

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para evaluar la forma física de los complejos, las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM-6060LV (Jeol Inc., MA, USA), para mejorar la conductividad y la calidad de la imagen, las muestras fueron cubiertas con una capa de oro ionizante tras el secado. El análisis se realizó utilizando 20 KeV.

Internalización de los poliplejos

Este protocolo se realizó de acuerdo con Olivo (2022). Brevemente: antes de la formación de los complejos, el plásmido pQBI25 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se marcó con yoduro de propidio (PI) concentración final en el medio 10 μM y se mantuvo en agitación por 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Tras el marcaje del plásmido para el seguimiento de los complejos, se ensamblaron las NPs siguiendo las metodologías de coacervación compleja, acoplamiento de péptidos cariofílicos y ligando GRP descritas anteriormente.

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

Evaluación de la transfección de los complejos

Se emplearon dos líneas celulares de cáncer cervicouterino, SiHa y HeLa, se sembraron 100,000 células en placas de 24 pozos con medio DMEM suplementado con 10% de FBS, se incubaron en atmósfera de CO_2 al 5% hasta alcanzar una confluencia del 50%. Posteriormente, se reemplazó el medio y se adicionaron los microlitros de complejo

equivalentes a 9.9 µg o 3.7 µg de pDNA (para evaluar la funcionalidad de las nanopartículas sin ligando y con ligando acoplado, respectivamente) y se incubaron por 16 horas. Finalizada la incubación, se retiró el medio de cultivo suplementado para ser reemplazado por 2 mL de medio suplementado fresco y se incubó nuevamente durante 48 horas bajo las mismas condiciones (protocolo modificado de Romoren, Pedersen, Smistad, Evensen & Thu, 2003).

Para visualizar la expresión de GFP se realizó la fijación de las muestras; el procedimiento consiste en retirar el medio de cultivo y lavar una vez con PBS, realizar una fijación con formalina al 4% en PBS durante 20 minutos y al finalizar el tiempo, lavar nuevamente con PBS para permeabilizar con Tritón 100x en PBS por 5 minutos y proceder al lavado con PBS por duplicado y uno con agua destilada para proceder al montaje con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) y terminar con el sellado de las laminillas para ser observadas con el microscopio de fluorescencia modelo Zeiss® Axios.

Resultados

Integridad y concentración de pDNA

Se realizó la propagación y extracción del plásmido pQBI25 que codifica para la proteína verde fluorescente que será de utilidad para la evaluación biológica *in vitro*, de ahí la importancia de la pureza e integridad de las muestras de pDNA. De acuerdo con la Tabla 3, la media de la relación A260 nm/280 nm para el lote es de 1.82 lo cual se considera como una pureza óptima de la muestra (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020). Otro parámetro importante para considerar es la integridad del DNA que se evalúa mediante la electroforesis en gel de agarosa, como se puede observar en la Figura 10, el gel de agarosa muestra bandas discretas y con ausencia de *smear* para cada una de las alícuotas, la fluorescencia tan intensa se debe a las altas concentraciones del pDNA. Debido a lo anterior, se afirma que las muestras de DNA cuentan con una pureza e integridad adecuada para su posterior uso.

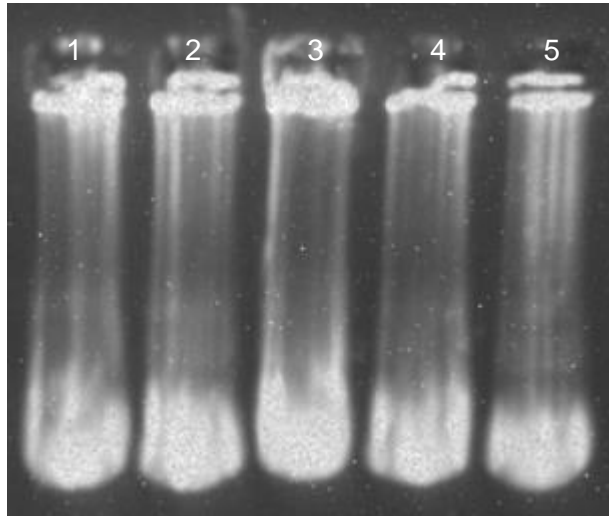


Figura 10. Gel de electroforesis tras extracción de pDNA mediante kit QIAGEN Mega Prep

Tabla 3. Resultados de concentraciones (ng/ μ L) y relaciones 260/280 obtenidas después de la extracción de pDNA.

Alicuota	1	2	3	4	5
Concentración media (ng/ μ L)	3669.93	3483.84	3547.58	3649.22	2765.99
Media de relación 260 nm/280 nm	1.796	1.779	1.748	1.913	1.90

Ensayos de retardo pQBI25-péptidos cariofílicos

La primera parte para el ensamblaje de nanopartículas se basa en la realización de ensayos de retardo con el objetivo de determinar la concentración óptima de cada péptido cariofílico para la formación de complejos con una concentración constante de pDNA. Los complejos se formaron mediante interacciones electrostáticas entre los aminoácidos con carga positiva presentes en los péptidos cariofílicos y la carga negativa de los fosfatos del material genético; este tipo de interacciones se prefieren sobre los enlaces covalentes debido a que no interfieren con la posterior transfección del transgén (Opanasopit, et al., 2009). Hernández-Baltazar, et al., 2012 establece que el criterio para la selección de la concentración ideal de péptido es aquella en la cual la banda electroforética retarda lo suficiente para que se encuentre a la mitad del borde superior de la banda electroforética control; de acuerdo con la Figura 11 y Figura 12, las concentraciones ideales para los péptidos cariofílicos son [0.35] μ M para P1 y [0.52] μ M para P2. La importancia de la no saturación de las cargas negativas del pDNA con el péptido reside en la intervención con la futura interacción entre el material genético y el quitosán.

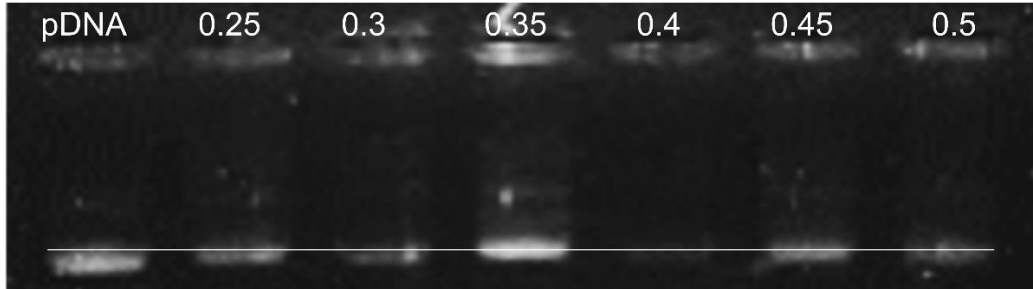


Figura 11. Gel de electroforesis del ensayo de retardo entre pQBI25 (100 ng/μL) con P1. Las concentraciones de péptido cariofílico son μM.

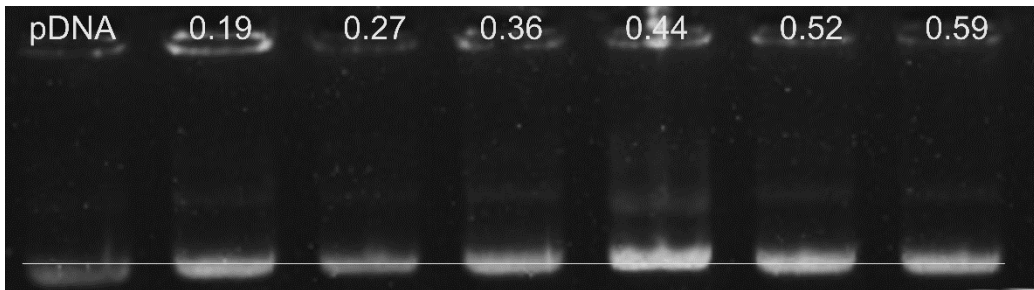


Figura 12. Gel de electroforesis del ensayo de retardo entre pQBI25 (100 ng/μL) con P2. Las concentraciones de péptido cariofílico son μM.

Ensayos de retención

Una vez seleccionadas las concentraciones óptimas de péptidos carifílicos, se realizó el ensayo de retardamiento para seleccionar la concentración de quitosán óptima para los complejos pDNA-P1/P2. El criterio teórico para la selección de la concentración óptima de quitosán será aquella en la que, idealmente, no se observe fluorescencia en el pozo del gel a pesar de contener muestra; esto ocurre debido a que la interacción entre CS-pDNA-P1/P2 es tal que no permite la intercalación del colorante (GelRed) con el material genético.

Los ensayos de retardo permitieron identificar la concentración óptima de ambos péptidos cariofílicos. Utilizando estas concentraciones, se realizaron los ensayos de retención para determinar la concentración óptima de quitosán en ambos casos. De acuerdo con las Figuras 13 y 14, las concentraciones óptimas de quitosán fueron 0.16% (radio N/P 16) y 0.14% (radio N/P 14) para los complejos pDNA-P1 y pDNA-P2, respectivamente.

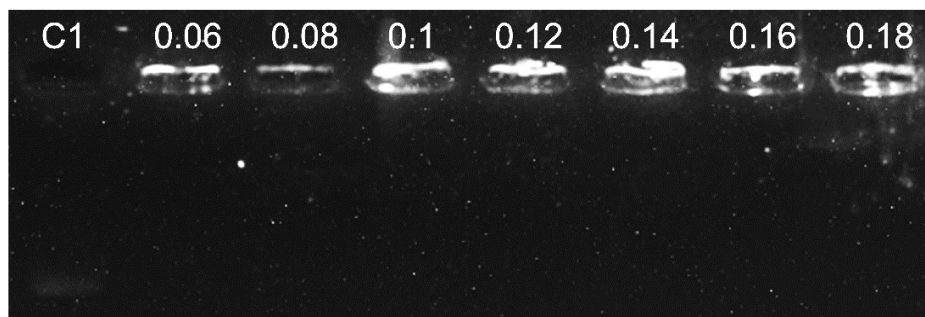


Figura 13. Gel de electroforesis del ensayo de retención CS 20.6 kDa con pQBI25 (100 ng/μL) +P1 [0.35] μM. C1: Complejo CS-DNA-P1. Las concentraciones de CS son porcentuales.

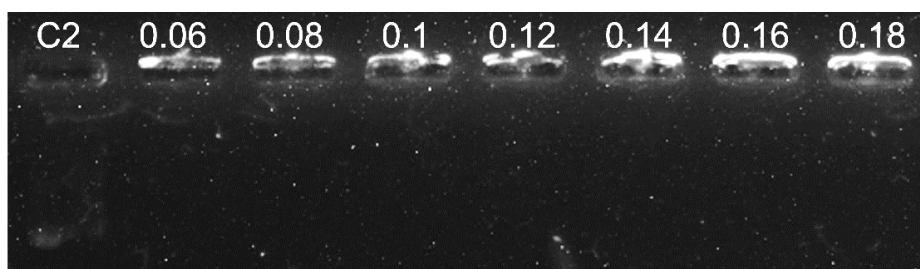


Figura 14. Ensayo de retención CS 20.6 kDa con pQBI25 (100 ng/μL) +P2 [0.52] μM. C2: Complejo CS-DNA-P2. Las concentraciones de CS son porcentuales.

Por su parte, se realizó el ensayo de retención sin péptidos cariofílicos y se identificó que para quitosán de alto peso molecular (52.6 kDa) la concentración óptima de este fue de 0.12% (relación N/P 12) (Figura 15), de acuerdo con los hallazgos descritos por Aranda-Barradas, et al. (2022) la concentración óptima (%) de quitosán de alto peso molecular (52.6 kDa) fue la misma concentración para el quitosán de bajo peso molecular (20.6 kDa) por lo que también se utilizó 0.12% (radio N/P) como concentración óptima para el quitosán de bajo peso molecular en el presente trabajo. El motivo por el cual se emplearon dos MW diferentes de CS fue para evaluar el efecto de esta variable en los parámetros fisicoquímicos y seleccionar aquél MW de CS con los mejores valores para las propiedades fisicoquímicas de acuerdo con los parámetros aceptables en la literatura científica.

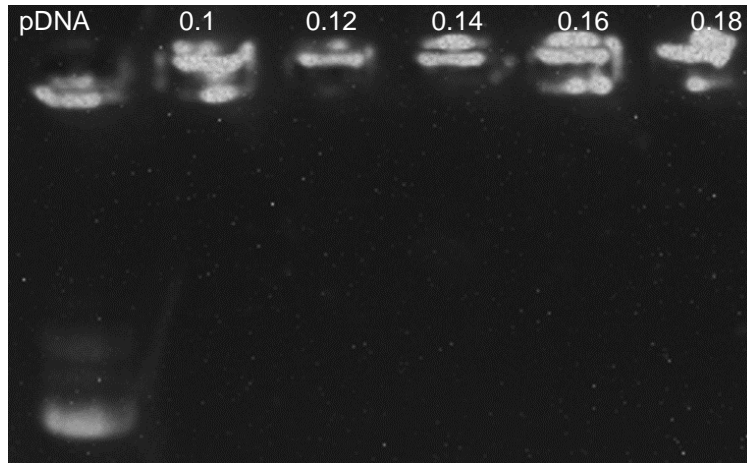


Figura 15. Ensayo de retención CS 52.7 kDa con pQBI25 (100 ng/μL). Las concentraciones de CS son porcentuales.

Determinación de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta

Como se puede observar en la gráfica del tamaño de partícula, para las nanopartículas ensambladas con el CS de alto MW (52.7 kDa) (Figura 16 A), hay dos picos que sugieren, aunado con el valor del PId (Tabla 4), que se forman aglomerados y que la muestra no es estable. Debido a esto, se seleccionaron las nanopartículas ensambladas con CS bajo MW como muestra control y que en lo sucesivo se abreviarán CS-NPs LMW.

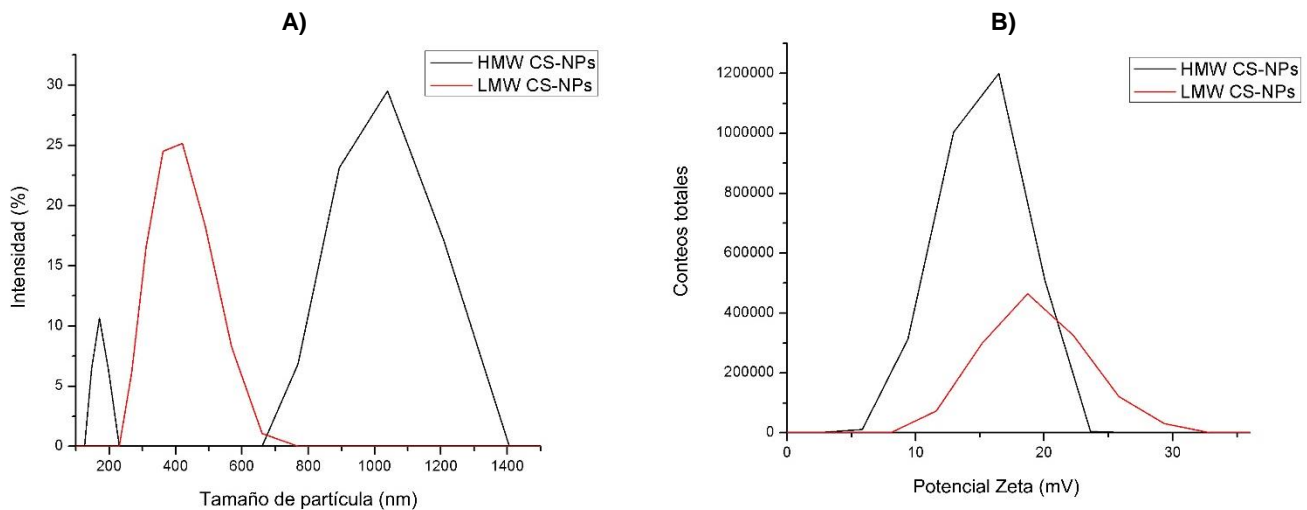


Figura 16. Caracterización fisicoquímica de poliplejos con diferentes MW de quitosán. A) tamaño de partícula, B) PZ. CS-NPs LMW: Nanopartículas a base de quitosán de bajo MW (20.6 kDa), CS-NPs HMW: nanopartículas a base de quitosán de alto MW (52.7 kDa)

De igual forma, se obtuvieron las gráficas del tamaño de partícula y PZ para las muestras control y los poliplejos ensamblados con los péptidos cariofílicos (Figura 17), además, se

determinó la media de los valores de tamaño de partícula, PZ e índice de polidispersión de los valores ($n=3$) obtenidos mediante DLS y LDV (Tabla 4).

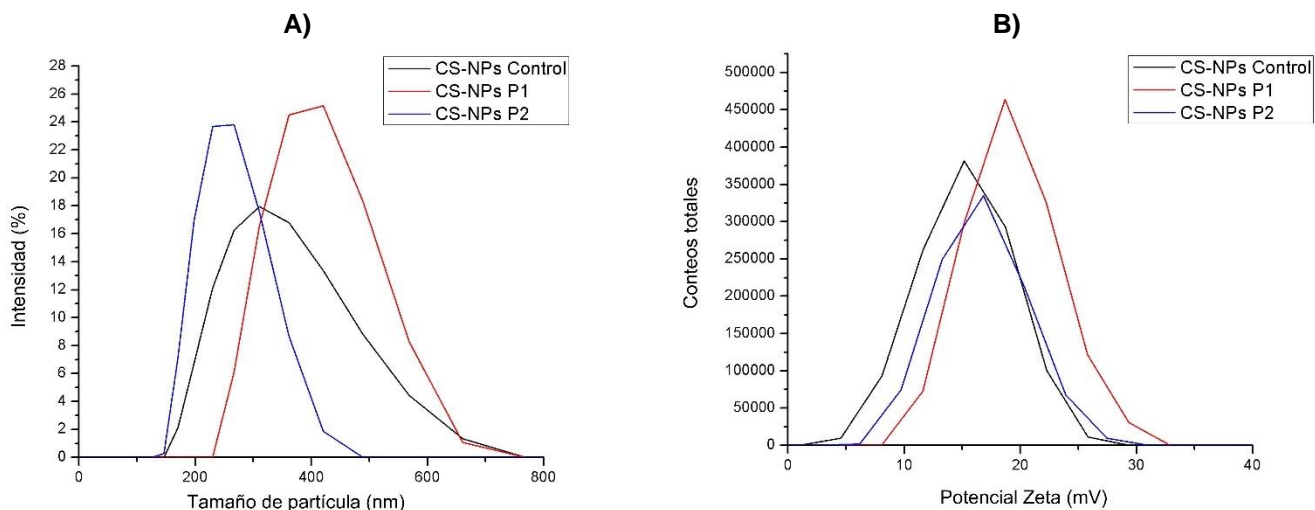


Figura 17. Caracterización fisicoquímica de diferentes CS-NPs. A) tamaño de partícula, B) PZ.

CS-NPs Control: CS-NPs-LMW Nanopartículas a base de quitosán de bajo MW (20.6 kDa), CS-NPs P1: poliplejos ensamblados con P1 y CS de bajo MW, CS-NPs P2: poliplejos ensamblados con P2 y CS de bajo MW

Tabla 4. Resultados del tamaño de partícula, potencial ζ e índice de polidispersión de las diferentes CS-NPs

Muestra	Tamaño de partícula (nm)	Potencial ζ (mV)	Índice de polidispersión
CS-NPs LMW	327.56 \pm 29.21	16.5 \pm 2.8	0.14 \pm 0.07
CS-NPs HMW	445.37 \pm 52.48	15.79 \pm 1.3	0.67 \pm 0.14
CS-NPs P1	346 \pm 128.52	17.13 \pm 4.27	0.15 \pm 0.23
CS-NPs P2	262.2 \pm 0	16.56 \pm 1.28	0.1 \pm 0.11

Se realizó el análisis estadístico empleando la prueba t de Student ($n=3$) para determinar si existe diferencia significativa de los parámetros obtenidos para las diferentes comparaciones entre muestras de nanopartículas (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de significancia para tamaño de partícula, potencial ζ e índice de polidispersión para las distintas comparaciones entre CS-NPs. p : valor p de t de Student $n=3$

Muestras comparadas	CS-NPs LMW/CS-NPs HMW	CS-NPs LMW/CS-NPs P1	CS-NPs LMW/CS-NPs P2	CS-NPs P1/CS-NPs P2
Tamaño de partícula (nm)	0.358	0.416	0.012	0.174
Potencial ζ (mV)	0.356	0.421	0.487	0.422
Índice de polidispersión	0.004	0.476	0.328	0.382

Una vez finalizada la caracterización fisicoquímica de las diferentes nanopartículas, se realizó la caracterización morfológica solamente de la muestra CS-NPs-P2 debido a que la muestra CS-NPs-P1 no mostró diferencia significativa para ningún parámetro fisicoquímico cuando se comparó con CS-NPs LMW, a diferencia de CS-NPs-P2 que presentó un tamaño de partícula significativamente menor que la muestra CS-NPs LMW y además, en general, obtuvo valores más favorables que CS-NPs P1 para los tres parámetros fisicoquímicos.

Análisis de la morfología de las nanopartículas

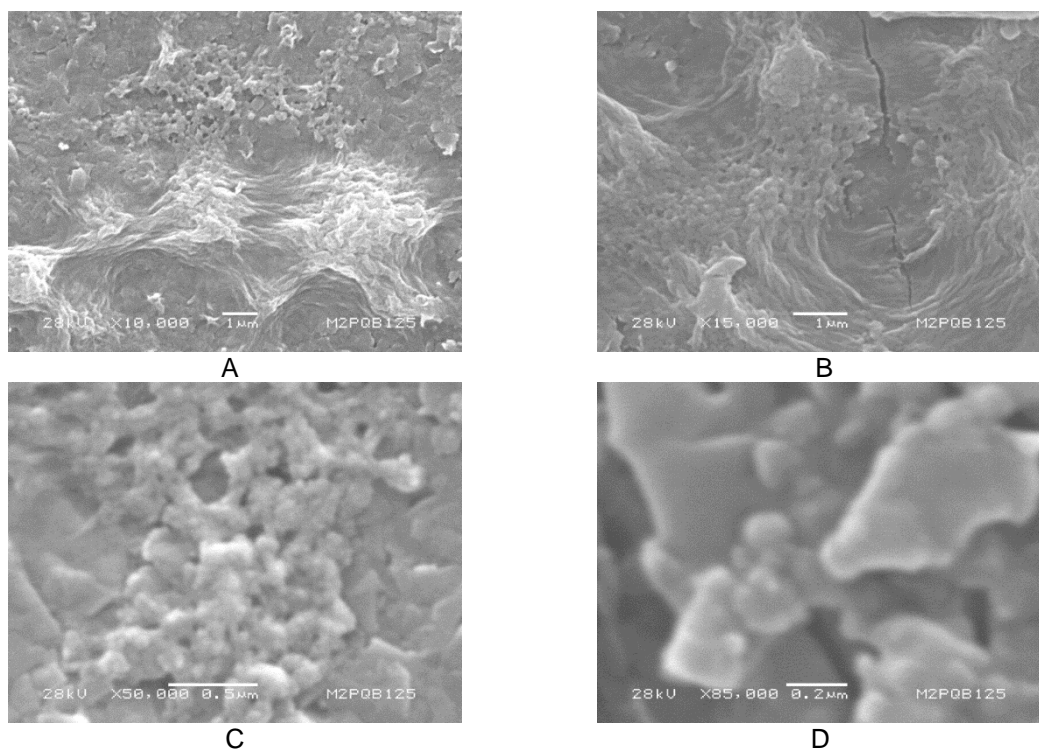


Figura 18. Imágenes SEM de LMW-CS-NPs P2 a 10,000 (A), 15,000 (B), 50,000 (C) y 85,000 (D)

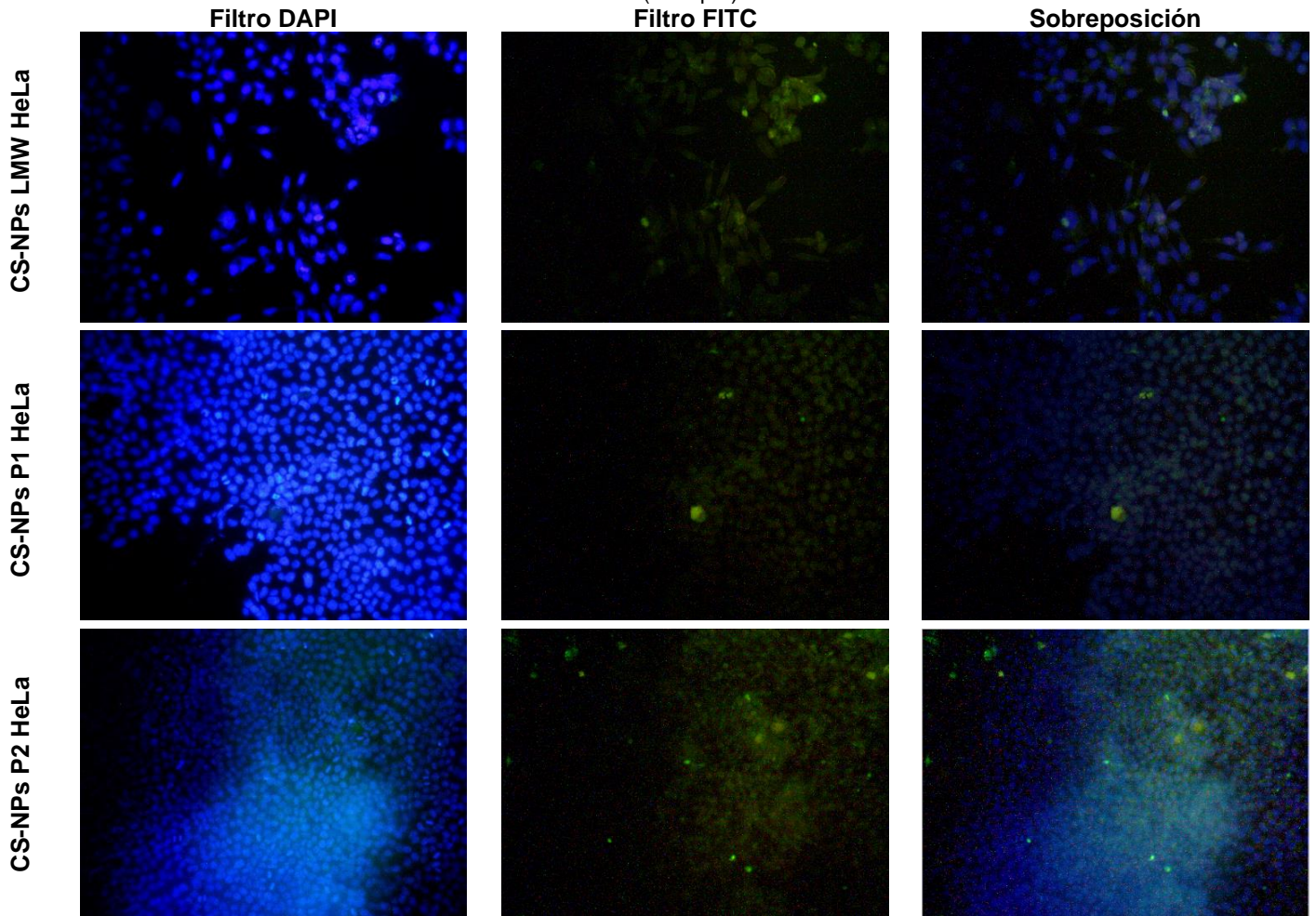
Las imágenes SEM de las nanopartículas LMW-CS-NPs P2 (Figura 18) revelan una morfología indefinida y se puede apreciar la formación de *film*, aunque la figura del inciso C (50,000 X) muestra una morfología pseudo-esférica.

Ensayos de transfección *in vitro*

Después de la caracterización fisicoquímica de los complejos y la caracterización morfológica de CS-NPs P2, se evaluó la funcionalidad biológica de la muestra control y de CS-NPs P2 para conocer el efecto de la presencia del péptido cariofílico en la eficiencia de transfección *in vitro* para las líneas HeLa y SiHa (Tabla 6).

Tabla 6. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los ensayos de transfección *in vitro* realizados en las líneas celulares SiHa y HeLa con 10% FBS en el medio.

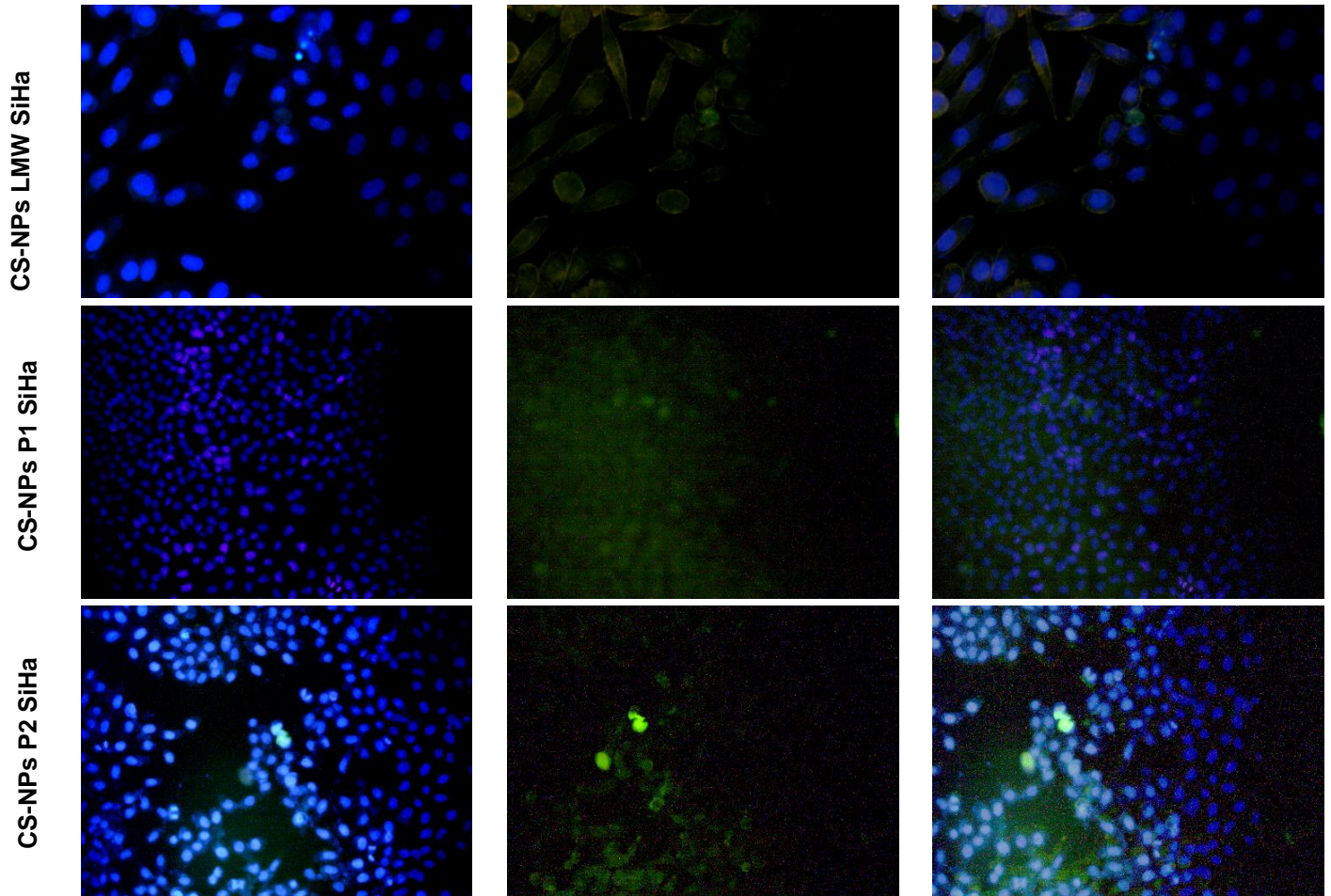
CS-NPs LMW; nanopartículas acopladas con CS de bajo peso molecular (20.6 kDa) y pQBI25 (100 ng/μL), CS-NPs P1: nanopartículas acopladas con CS de bajo peso molecular (20.6 kDa) y pQBI25 (100 ng/μL) y P1 (0.35 μM) y CS-NPs P2: nanopartículas acopladas con CS de bajo peso molecular (20.6 kDa) y pQBI25 (100 ng/μL) y P2 (0.52 μM).



Se puede observar que la fluorescencia en la sobreposición para la muestra CS-NPs-LMW en la línea celular HeLa es menor en comparación con las células tratadas con las nanopartículas con péptidos cariofílicos; sin embargo, se distingue que la fluorescencia es cualitativamente mayor para las nanopartículas ensambladas con P2 que con P1 por lo que la funcionalidad biológica evaluada es mejor para los complejos ensamblados con P2 que con P1 y con la muestra control (CS-NPs LMW) en HeLa.

Tabla 6 (continuación). Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los ensayos de transfección in vitro realizados en las líneas celulares SiHa y HeLa con 10% FBS en el medio.

CS-NPs LMW; nanopartículas acopladas con CS de bajo peso molecular (20.6 kDa) y pQBI25 (100 ng/μL), CS-NPs P1: nanopartículas acopladas con CS de bajo peso molecular (20.6 kDa) y pQBI25 (100 ng/μL) y P1 (0.35 μM) y CS-NPs P2: nanopartículas acopladas con CS de bajo peso molecular (20.6 kDa) y pQBI25 (100 ng/μL) y P2 (0.52 μM).



La línea celular SiHa presentó el mismo comportamiento en SiHa que HeLa; la fluorescencia es menor para la muestra CS-NPs-LMW en la línea celular SiHa que la observada con la alcanzada con los péptidos cariofílicos; de igual forma, la fluorescencia es cualitativamente mayor para las nanopartículas ensambladas con P2 que con P1.

La funcionalidad biológica evaluada es mejor para los complejos ensamblados con P2 que con P1 y con la muestra control (CS-NPs LMW) para ambas líneas celulares, aunque el análisis cualitativo favorece a la línea celular HeLa sobre SiHa por la fluorescencia observada con todas las muestras (control y con péptidos cariofílicos).

Desarrollo de la metodología de acoplamiento del ligando GRP a las nanopartículas

Una vez que se confirmó la funcionalidad biológica de las nanopartículas ensambladas con el plásmido pQBI25 con y sin los péptidos cariofílicos, se realizó el acoplamiento del ligando GRP mediante el entrecruzador SPDP y el reactivo de Traut a la muestra CS-NPs-P2 por la obtención de mejores resultados cuanti y cualitativos. La reacción se esquematiza en la Figura 19.

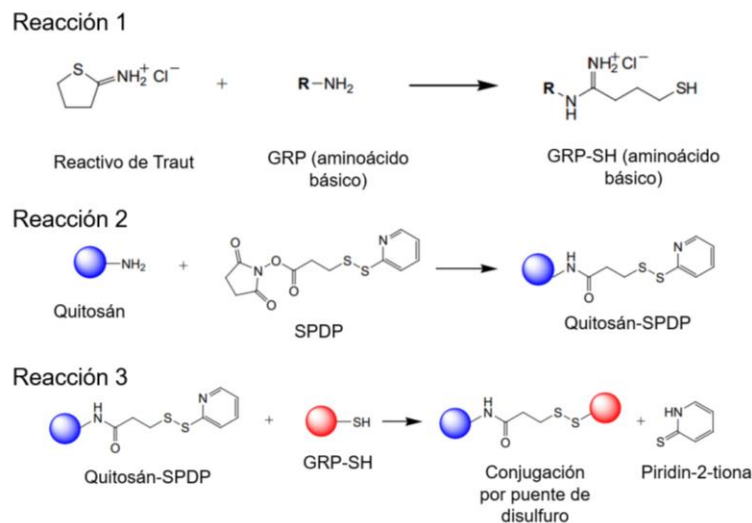


Figura 19. Reacciones ocurridas para el acoplamiento del ligando a CS-NPs P2.

Reacción 1: tiolación del péptido GRP con el reactivo de Traut. Reacción 2: entrecruzamiento del SPDP con las nanopartículas a base de quitosán. Reacción 3: acoplamiento del ligando GRP tiolado con el quitosán entrecruzado con SPDP con liberación de piridin-2-tiona como subproducto.

La primera parte consistió en la tiolación del péptido GRP con el reactivo de Traut, la concentración del péptido GRP tiolado se realizó mediante el ensayo de Ellmans. En la Tabla 7, la metodología A para la tiolación de GRP incluye el proceso de concentración de la muestra mediante centrifugación al vacío después de su paso por una resina Sephadex G-15 empacada en una columna de vidrio para separar los componentes de la solución mediante cromatografía por gravedad y la lectura espectrofotométrica de las fracciones colectadas correspondientes a GRP-SH (el resto corresponde al reactivo de Traut libre). Por su parte, en la metodología B propuesta se omitió esta cromatografía y el proceso de concentración de la muestra, ya que el reactivo de Traut no interfiere con las etapas posteriores del acoplamiento y su concentración disminuye tras la centrifugación y resuspensión de las nanopartículas con el ligando GRP acoplado. Además, la cuantificación de GRP-SH se realizó mediante el coeficiente de absorptividad molar usando el reactivo de Ellmans. Los cálculos se describen a continuación:

Cálculo de peso molecular de GRP-SH

Peso promedio de cada aminoácido: 110 g/mol (Promega, S/A)

$$GRP_{\text{aminoácidos no básicos}} MW = 110 \frac{g}{mol} * 24 \text{ aminoácidos no básicos}$$

$$GRP_{\text{aminoácidos no básicos}} MW = 2640 \frac{g}{mol}$$

Para cada aminoácido básico presente en el péptido, ocurre la siguiente reacción:

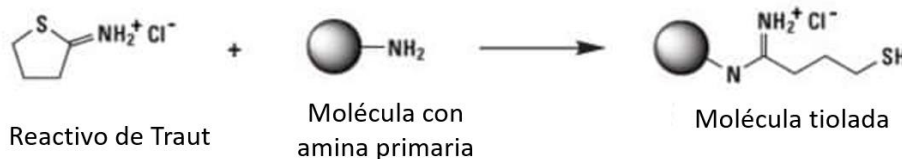


Figura 6. Reacción del reactivo de Traut con aminas primarias. Obtenido de Thermo Scientific

Peso molecular de cada aminoácido básico:

$$GRP_{\text{aminoácidos básicos}} MW = 110 \frac{g}{mol} - 1 \frac{g}{mol} + 138.51 \frac{g}{mol}$$

$$GRP_{\text{aminoácidos básicos}} MW = 247.51 \frac{g}{mol}$$

Se le resta el peso molecular del hidrógeno y se le suma el peso molecular del reactivo de Traut de anillo abierto.

Por lo tanto,

$$GRP - SH MW = 2640 \frac{g}{mol} + (3 * 247.51 \frac{g}{mol})$$

$$GRP - SH MW = 3382.53 \frac{g}{mol}$$

Cálculo de concentración de GRP-SH por ensayo de Ellman's

$$[GRP - SH]M = \frac{Abs_{412 nm}}{14,150 M^{-1} cm^{-1}} * \frac{2800 uL VT}{250 uL VS}$$

Donde VT: volumen total y VS: volumen del sistema

$$GRP - SH \frac{mg}{mL} = GRP - SH \frac{mmol}{mL} * \frac{3382.53 mg}{1 mmol GRP - SH}$$

A partir del espectro de absorción para la determinación del péptido GRP tiolado empleando la metodología A y B (Figura 19), se realizaron los cálculos pertinentes con la absorbancia obtenida a 412 nm para la determinación del péptido GRP-SH (Tabla 7). Dicha longitud de onda es establecida en el ensayo de Ellmans y su fundamento se basa en que el reactivo de Ellmans, al reaccionar con grupos sulfhidrilo, produce una coloración amarilla cuya absorbancia máxima es a 412 nm (Bhat, et al. 2018).

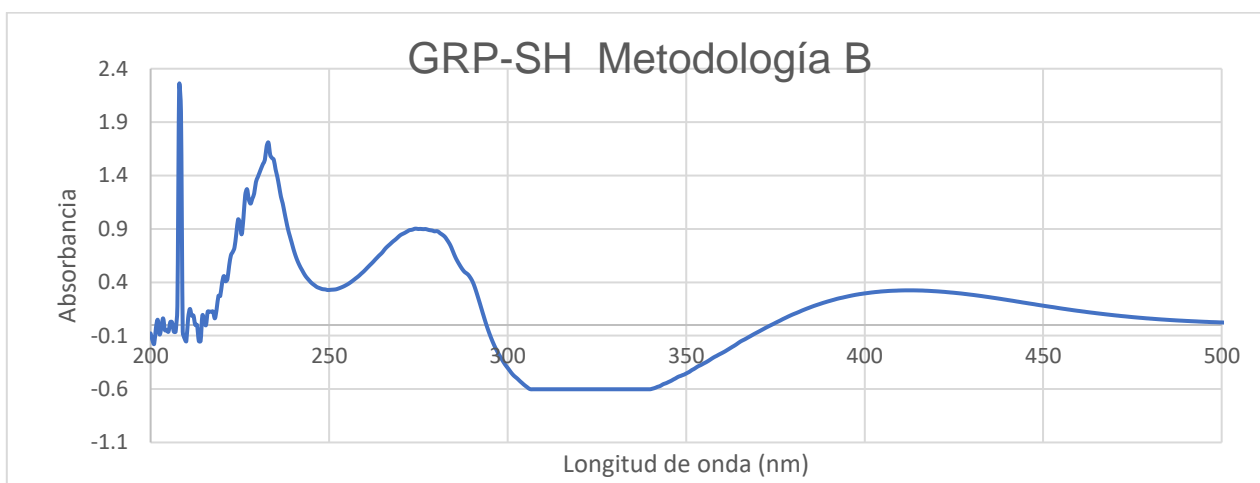


Figura 20. Barrido espectral para la determinación de la concentración de GRP-SH mediante ensayo de Ellmans.

Gráfica realizada a partir de los resultados obtenidos por el espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV1601

Tabla 7. Concentración (mg/mL) del péptido GRP-SH.

	Concentración (mg/mL)
Metodología A	0.083
Metodología B (ensayo 1)	0.878
Metodología B (ensayo 2)	0.859
Metodología B (ensayo 3)	0.642
Media (metodología B)	0.703

Metodología A: se realiza el proceso de concentración de la muestra GRP-SH y separación de los componentes de la solución mediante cromatografía por gravedad. **Metodología B:** omite la concentración de la muestra y cromatografía por gravedad.

Después de la tiolación y el ensayo de Ellmans, se realizó la funcionalización del quitosán con el SPDP para posteriormente realizar el entrecruzamiento con GRP-SH y se determinó mediante la medición de la absorbancia de la piridin-2-tiona (Figura 20) la eficiencia de reacción (Tabla 8). Se mide la absorbancia a 343 nm debido a que la reacción entre la porción sulfhidril-reactiva del SPDP y los grupos sulfhidrilo del GRP-SH liberan la piridin-2-tiona cuya concentración se determina a esa absorbancia.

La metodología A precisa de una diálisis al final del entrecruzamiento, mientras que la metodología B, la omite ya que debido a que se realiza la recuperación de nanopartículas por centrifugación de la muestra y resuspensión con cambio de buffer; lo anterior pretende reducir la concentración de subproductos.

Los cálculos para la eficiencia de reacción se describen a continuación:

Eficiencia de reacción para CS-NP-GRPSH

$$[piridin - 2 - tiona]M = \frac{Abs \text{ a } 343 \text{ nm}}{8.08 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1} M^{-1}} * 5$$
$$[SPDP]_{sistema \text{ final}}M = \frac{SPDP \text{ } 0.01 \text{ M} * 10 \text{ uL}}{1325 \text{ uL}}$$
$$[SPDP]_{sistema \text{ final}}M = 7.5472 \times 10^{-5} M$$
$$eficiencia \text{ de reacción} = \frac{[piridin - 2 - tiona]M}{7.5472 \times 10^{-5} M} * 100\%$$

Se mide la absorbancia de la piridin-2-tiona para calcular la eficiencia de reacción debido a que cuando se acopla el péptido GRP tiolado a las nanopartículas con el entrecruzador, hay liberación de este compuesto (Figura 19).

Debido a que la absorbancia obtenida de la piridin-2-tiona fue tan baja que no se pudo calcular la eficiencia de reacción con la metodología A, en la Tabla 8 solamente se enlistan las eficiencias de reacción de los diferentes ensayos realizados con la metodología B.

Tabla 8. Eficiencia de reacción de acoplamiento del ligando GRP-SH a CS-NPs-SPDP.

	Eficiencia de reacción (%)
Metodología con modificaciones B (ensayo 1)	49.93
Metodología con modificaciones B (ensayo 2)	72.72
Metodología con modificaciones B (ensayo 3)	77 %
Media	66.55%

Metodología A: se realiza el proceso de concentración de la muestra GRP-SH y separación de los componentes de la solución mediante cromatografía por gravedad y diálisis de las nanopartículas con el ligando acoplado. Metodología B: omite la concentración de la muestra, cromatografía por gravedad y diálisis.

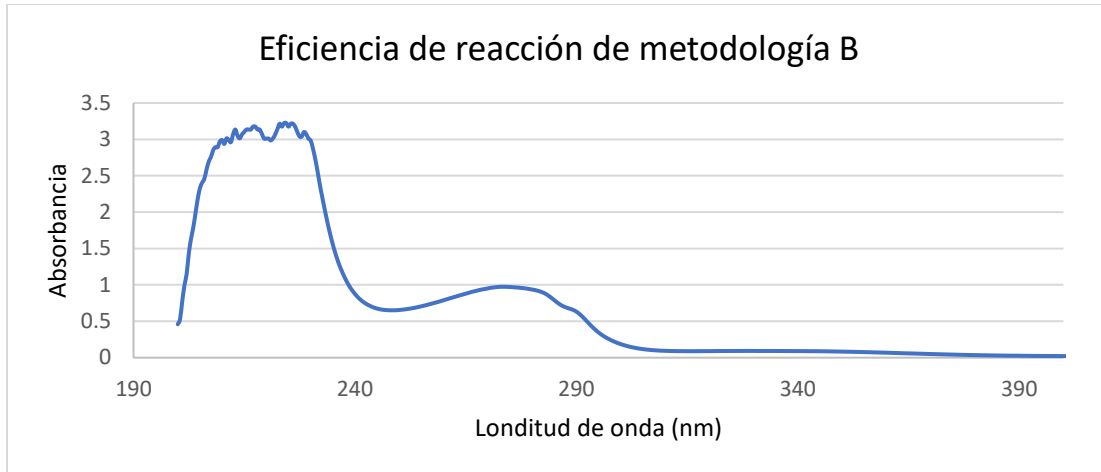


Figura 21. Barrido espectral para la determinación de la piridin-2-tiona de acuerdo con la metodología B.

Gráfica realizada a partir de los resultados obtenidos por el espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV1601.

Mediante el barrido espectral (Figura 21) se determinó la concentración del analito piridin-2-tiona en PBS como medio de disolución, teniendo una concentración de 54.88 M.

Caracterización fisicoquímica y morfológica de las nanopartículas dirigidas

Una vez estandarizada la metodología, se realizó la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas con el ligando GRP acoplado (CS-NPs GRP) (Figura 22) con el fin de determinar el impacto de la presencia del ligando GRP en las características fisicoquímicas y morfológicas de las nanopartículas. Además, se determinó la media para los 3 parámetros fisicoquímicos (tamaño de partícula, PZ y PId) (Tabla 9).

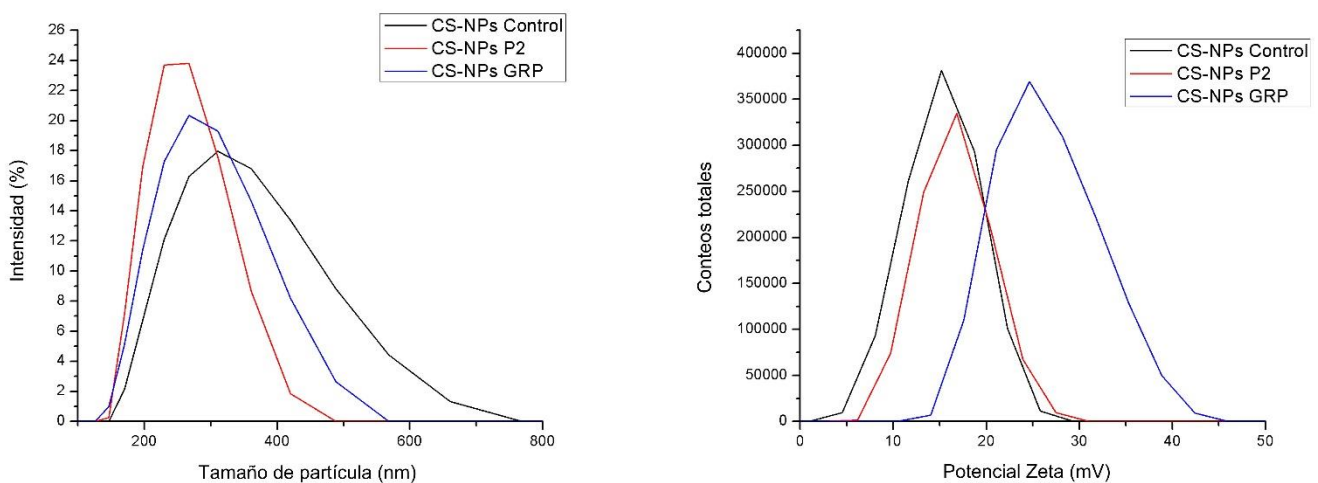


Figura 22. Caracterización fisicoquímica de diferentes CS-NPs. A) tamaño de partícula, B) PZ.

CS-NPs Control: CS-NPs-LMW Nanopartículas a base de quitosán de bajo, CS-NPs P1: polipejos ensamblados con P1 y quitosán de bajo MW, CS-NPs P2: polipejos ensamblados con P2 y quitosán de bajo MW

Tabla 9. Resultados del tamaño de partícula, potencial ζ e índice de polidispersión de CS-NPs GRP

Muestra	Tamaño de partícula (nm)	Potencial ζ (mV)	Índice de polidispersión
CS-NPs GRP	269.23 \pm 40.48	24.96 \pm 1.11	0.23 \pm 0.05

Posteriormente, se realizó el análisis estadístico empleando la prueba *t* de Student ($n=3$) para determinar si había diferencia significativa entre los parámetros fisicoquímicos cuando se comparó al control contra los poliplejos sin el ligando GRP acoplado y contra aquellos con GRP acoplado (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de significancia para tamaño de partícula, potencial ζ e índice de polidispersión para las distintas comparaciones entre CS-NPs. *p*: valor *p* de *t* de Student $n=3$

Muestras comparadas	CS-NPs LMW / CS-NPs GRP	CS-NPs P2 / CS-NPs GRP
Tamaño de partícula (nm)	0.0159	0.3824
Potencial ζ (mV)	0.0107	0.0004
Índice de polidispersión	0.0494	0.0819

Por otro lado, el análisis morfológico arrojó que las nanopartículas con el ligando GRP acoplado tienen una morfología esférica (Figura 20).

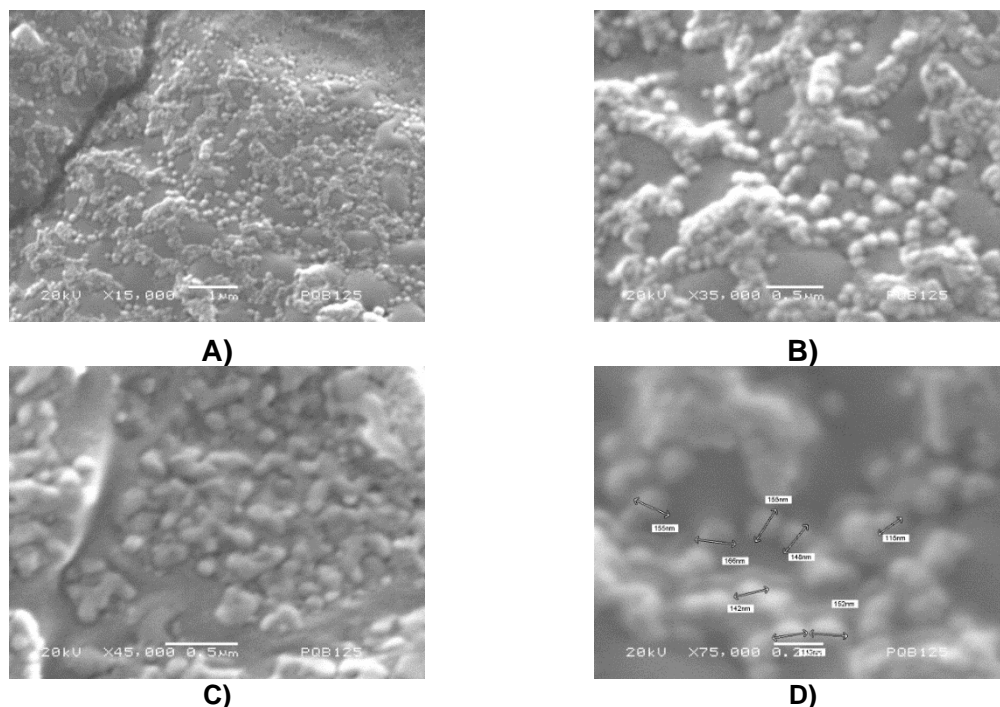


Figura 23. Imágenes SEM de CS-NP-GRP con P2 y CS 20.6 kDa a 15,000 (A), 35,000 (B), 45,000 (C) y 75,000 (D)

Ensayos de internalización

Finalizada la caracterización fisicoquímica y morfológica de las nanopartículas dirigidas y con apoyo del pLBD Hector E. Coronado C., se realizó el ensayo de internalización para evaluar el efecto del ligando en la endocitosis en las células HeLa y SiHa a los 30 minutos en comparación con la muestra control y la muestra CS-NPs P2 (Figura 24).

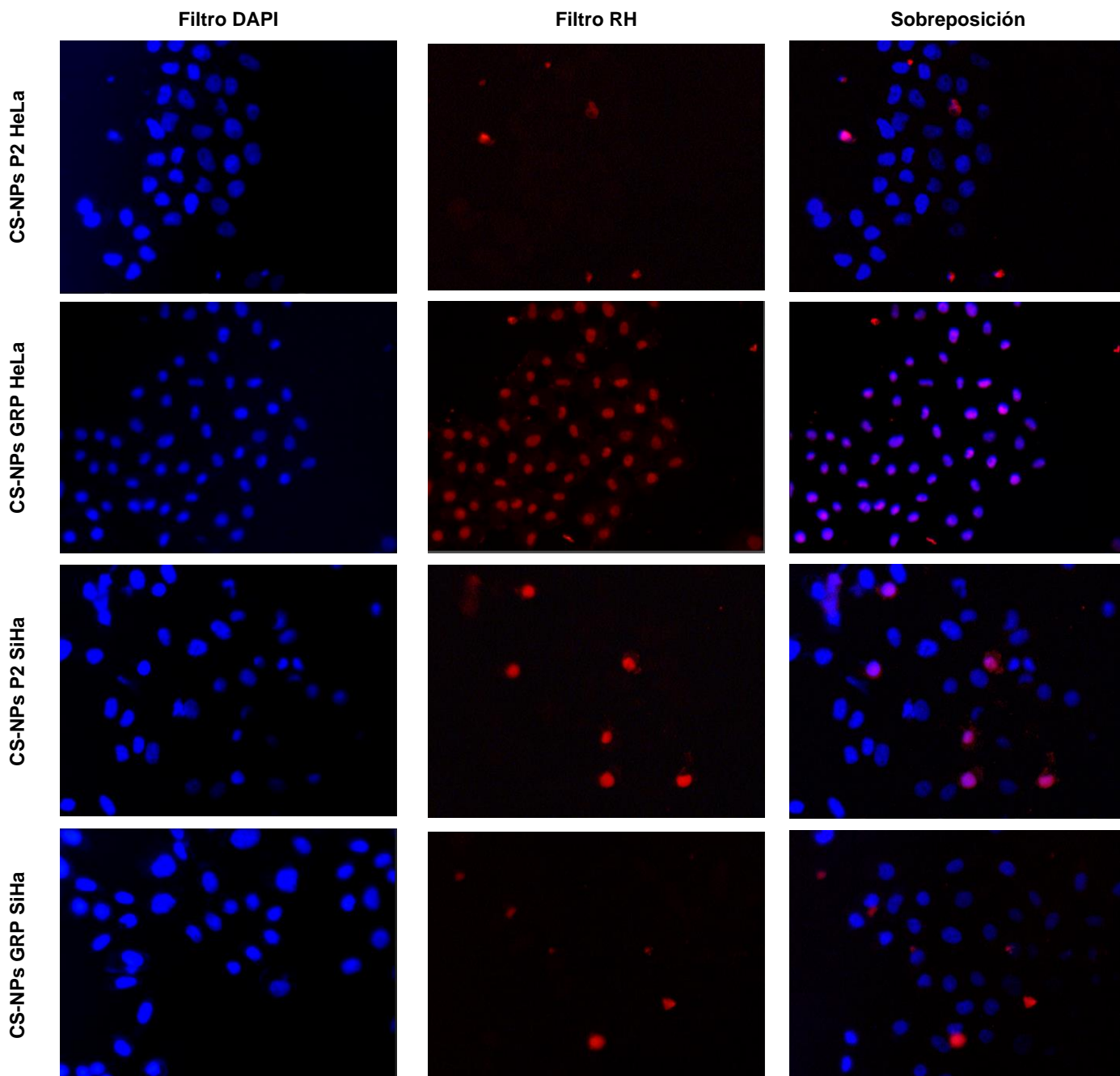


Figura 24. Ensayos de internalización en las líneas celulares HeLa y SiHa a 30 minutos.

Filtro DAPI para observación de los núcleos celulares y filtro RH para el seguimiento de las nanopartículas por el marcaje del pDNA con yoduro de propidio. CS- NPs P2: nanopartículas a base de quitosán (20.6 kDa) con el péptido cariofílico P2. CS-NPs GRP: nanopartículas a base de quitosán (20.6 kDa) con péptido cariofílico P2 y el ligando GRP acoplado.

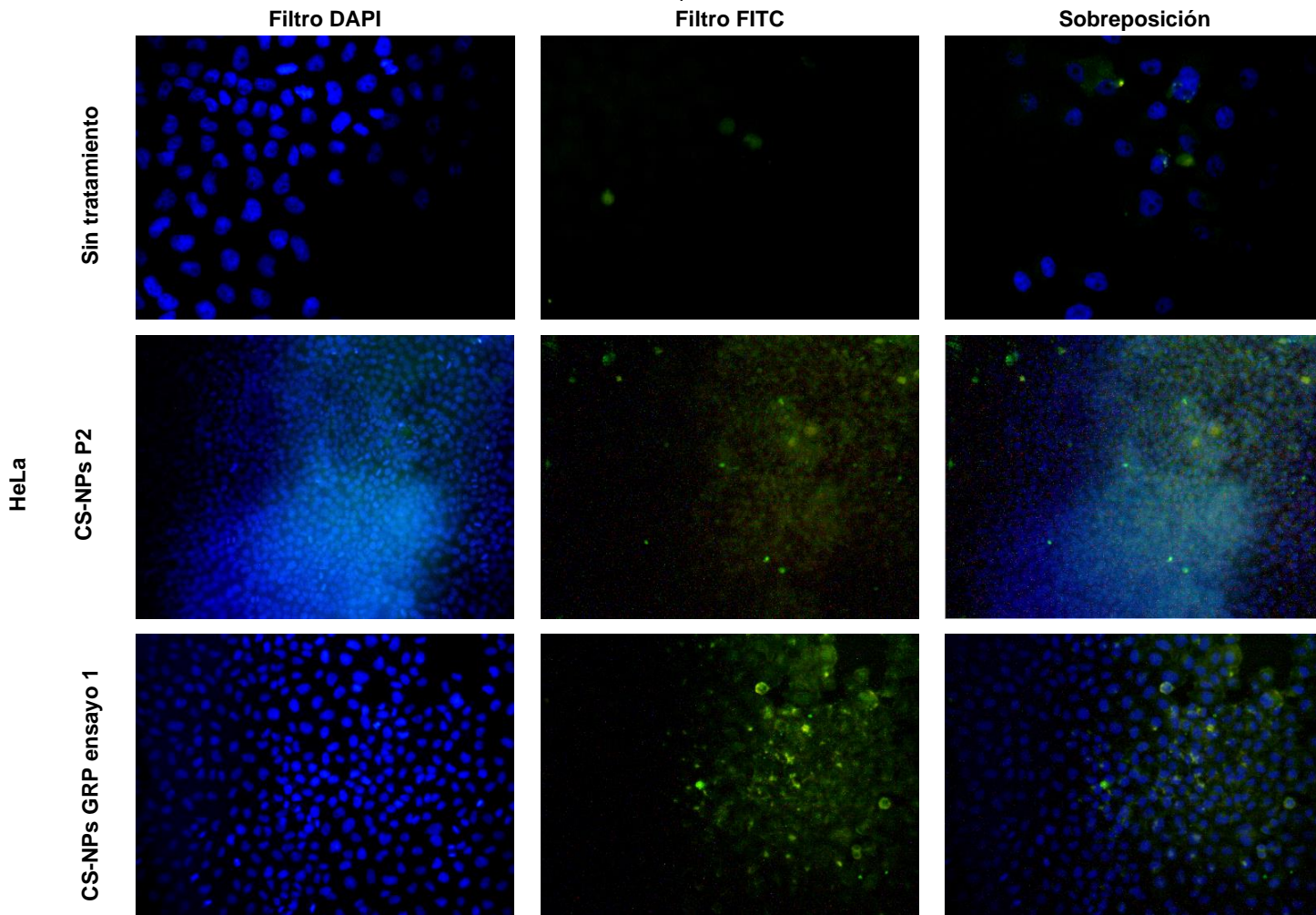
Se aprecia en la Figura 24 que para la línea celular HeLa, la internalización alcanzada a los 30 minutos es cualitativamente mayor para las células tratadas con las nanopartículas con el ligando acoplado en comparación con aquellas tratadas con los poliplejos con P2, sin embargo, para SiHa, la internalización alcanzada a los 30 minutos no parece ser cualitativamente diferente en presencia del ligando acoplado.

Ensayos de transfección *in vitro* de CS-NPs GRP

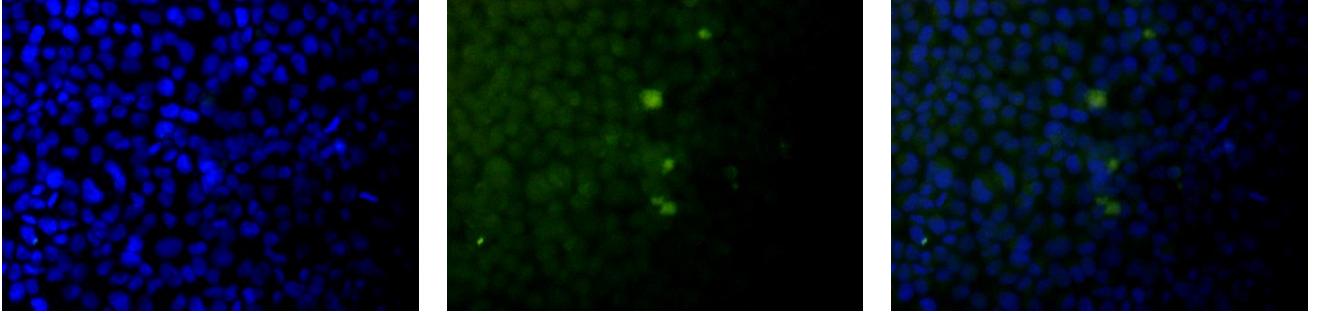
Tras la evaluación de la internalización de los complejos, se evaluó la funcionalidad biológica y el impacto del ligando GRP en la eficiencia de transfección en las líneas HeLa y SiHa (Tabla 11).

Tabla 11. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los ensayos de transfección *in vitro* realizados en las líneas celulares SiHa y HeLa con los poliplejos CS-NPs-GRP.

pQB125: plásmido desnudo; CS-NPs LMW: nanopartículas a base de quitosán de bajo peso molecular; CS-NPs P2: nanopartículas a base de quitosán de bajo peso molecular y P2; CS-NPs GRP: nanopartículas a base de quitosán de bajo peso molecular, P2 y ligando GRP acoplado.



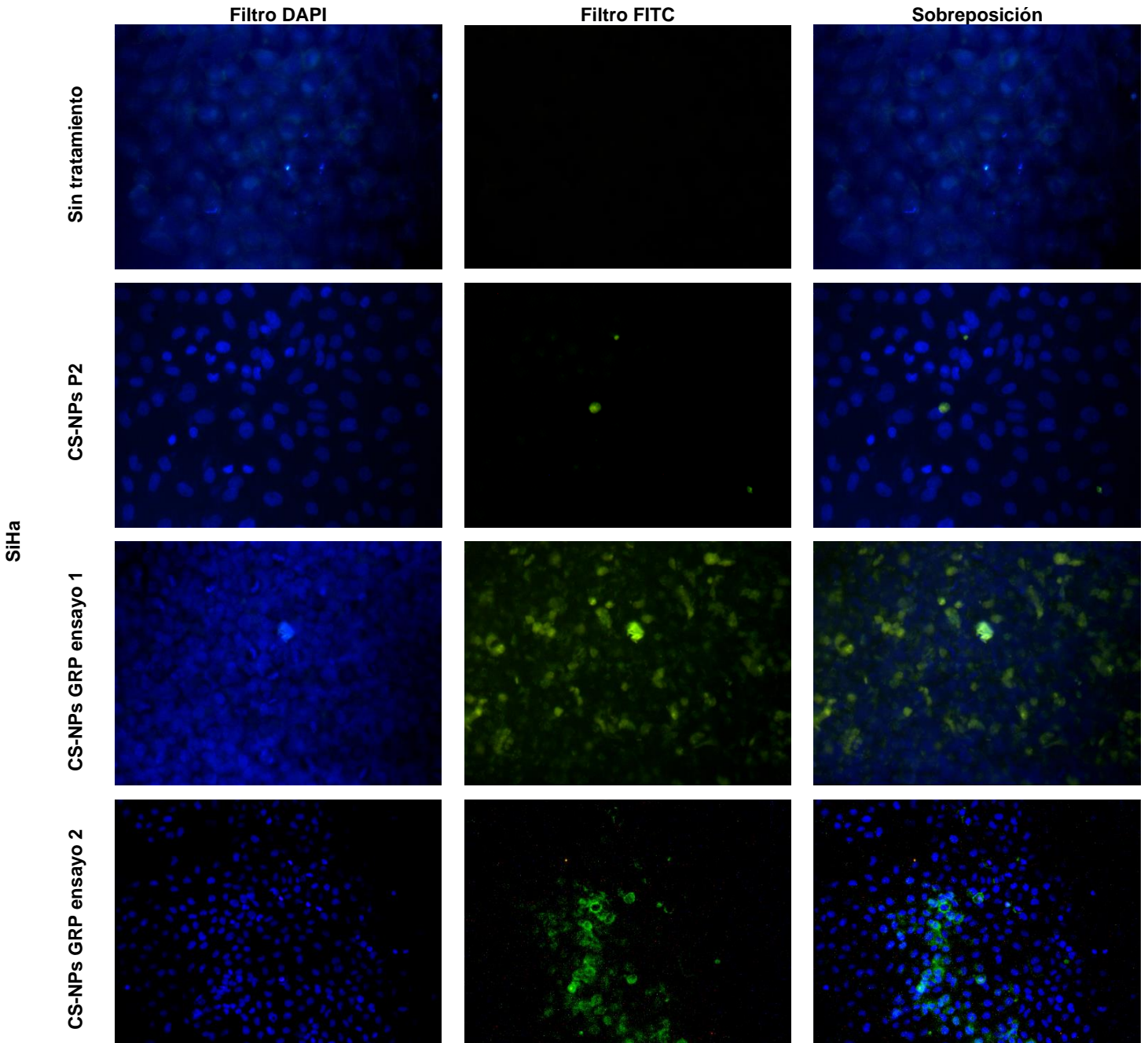
CS-NPs GR P ensayo 2

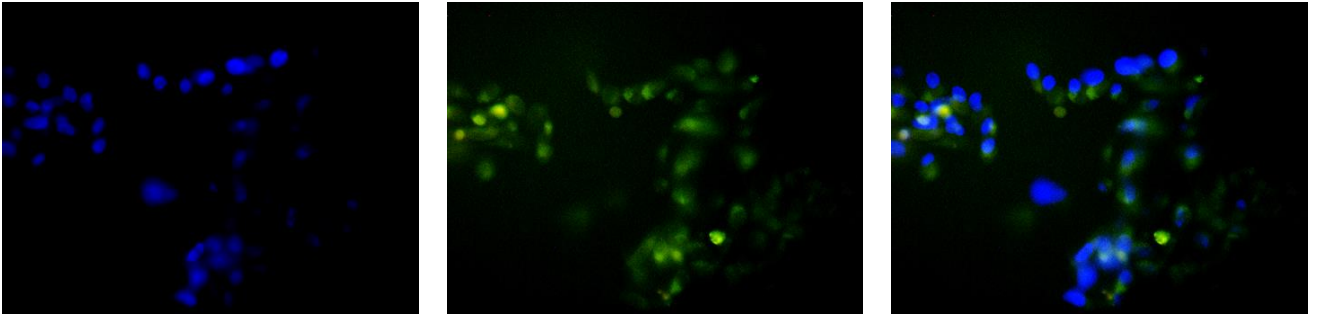


Se visualiza una mayor fluorescencia en las células tratadas con nanopartículas con el ligando acoplado que la alcanzada con los polipéptidos ensamblados con P2, destacando la fluorescencia observada con el ensayo 1 para las células HeLa.

Tabla 11 (continuación). Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los ensayos de transfección in vitro realizados en las líneas celulares SiHa y HeLa con los poliplejos CS-NPs-GRP.

pQB125: plásmido desnudo; CS-NPs LMW: nanopartículas a base de quitosán de bajo peso molecular; CS-NPs P2: nanopartículas a base de quitosán de bajo peso molecular y P2; CS-NPs GRP: nanopartículas a base de quitosán de bajo peso molecular, P2 y ligando GRP acoplado.





Se puede observar una mayor fluorescencia en las células tratadas con las nanopartículas con GRP que la alcanzada con los poliplejos ensamblados con P2. Por lo tanto, la evaluación de la funcionalidad biológica reveló que el acoplamiento del ligando GRP a las nanopartículas aumenta cualitativamente la fluorescencia en ambas líneas celulares; sin embargo, se observa mayor fluorescencia con las células SiHa que con las células HeLa. La fluorescencia aumentada en presencia de GRP, indica que el acoplamiento del ligando a las nanopartículas es capaz de potenciar la eficiencia de transfección.

Discusión

La relación A260 nm/280 nm es utilizada para evaluar la pureza de las muestras de DNA siendo 1.8-2.0 valores óptimos para dicha relación, valores menores indican una posible contaminación con compuestos aromáticos y valores mayores se deben a la presencia de RNA en la muestra. La media de la relación A260 nm/280 nm (Tabla 3) para el lote es de 1.82, lo que indica que la muestra tiene una pureza óptima, además; se puede apreciar en la electroforesis de agarosa (Figura 10) que la integridad del DNA también es adecuada. Lo anterior asegura que la pureza e integridad del DNA son óptimas para su posterior empleo.

Los ensayos de retardo permitieron identificar la concentración óptima de ambos péptidos cariofílicos. Utilizando estas concentraciones, se realizaron los ensayos de retención para determinar la concentración óptima de quitosán en ambos casos. En las Figuras 13 y 14, no se observa la ausencia de fluorescencia a ninguna de las concentraciones empleadas, aunque de acuerdo con lo reportado por Aranda-Barradas, et al. (2022), concentraciones elevadas de quitosán pueden dar lugar a la formación de *film*, lo que afectaría las características fisicoquímicas y funcionalidad biológica del poliplejo; otra forma de reducir la probabilidad de la formación de *film* es empleando sulfato de sodio que funge como agente de coacervación. Bajo este criterio, las concentraciones óptimas de quitosán de 0.16% y 0.14% para los complejos pDNA-P1 y pDNA-P2, respectivamente debido a que relaciones N/P son de 16 y 14, respectivamente; de acuerdo con Alameh, et al. (2012) nanopartículas con radios N/P mayores a 25 generan problemas prácticos debido a la agregación y efectos no específicos del quitosán y comprobó que nanopartículas ensambladas con CS con DS de 80%, MW de 10 y radio N/P de 10 son sistemas efectivos y no tóxicos para la entrega de genes con fines terapéuticos; por su parte, Aranda-Barradas, et al. (2022) reportaron el ensamblaje CS-NPs empleando el plásmido pEGFP-N1 y CS con MW de 20.6 kDa, DS de $\geq 85\%$ y N/P de 43 y de 8 y concluyeron que los poliplejos ensamblados a un N/P de 8 tuvieron mejores resultados fisicoquímicos y una morfología esférica que no se observó en los poliplejos ensamblados a un N/P de 43. Debido a lo anterior y a la diferencia de tamaño entre el plásmido pEGFP-N1 (4733 bp) y pQBI25 (6238 bp), se eligió una concentración intermedia.

Caracterización fisicoquímica y morfológica de CS-NPs

Una vez ensambladas las nanopartículas a las concentraciones óptimas de péptidos cariofílicos y de biopolímero, se determinaron las propiedades fisicoquímicas de los

poliplejos mediante DLS y LDV (Figuras 16 y 17). De acuerdo con la Tabla 4, los resultados de tamaño de partícula para las cuatro muestras son mayores a 200 nm. Este parámetro, aunado a la ausencia de ligando conjugado, sugiere que la internalización celular para las 4 muestras probablemente sea mediante endocitosis mediada por clatrina que sigue la vía de endosoma-lisosoma lo cual aumenta la posibilidad de llegada al núcleo porque aparentemente evade el sistema endo-lisosomal (Manzares, et al., 2020); en cambio, complejos con un diámetro menor a 200 nm son internalizadas mediante caveolas y se incrementa la posibilidad de que sea transportado hacia el retículo endoplásmico en lugar del núcleo (Aranda-Barradas, et al., 2022). Zhang, et al., (2015) menciona que la interacción no específica de las nanopartículas es dañino para la célula debido a que entre mayor tamaño de partícula, habrá una mayor deformación de la membrana celular y un incremento en la tensión y resistencia a la endocitosis debido a que la distancia entre membranas se reducirá para la formación del endosoma.

Los resultados de la prueba t (Tabla 5) revelaron que no existe diferencia significativa entre el tamaño de partícula ensamblada con P1 (CS-NPs P1) y los poliplejos ensamblados solamente con quitosán de bajo peso molecular (CS-NPs LMW), tampoco existe diferencia significativa entre los poliplejos con P1 y P2; por otro lado, sí existe diferencia significativa cuando se compararon las nanopartículas ensambladas con quitosán de alto y bajo peso molecular, también hay diferencia significativa entre los poliplejos con P2 (CS-NPs P2) y CS-NPs LMW teniendo un menor tamaño de partícula aquellas ensambladas con P2; esta reducción del tamaño de partícula es debido al aumento de interacciones electrostáticas y mayor compactación del DNA, lo anterior puede beneficiar en la transfección y posible reducción de la toxicidad en ensayos *in vitro*.

A pesar de que está ampliamente estudiado que entre menor sea el tamaño de partícula, habrá mayor internalización celular; Oh, et al., (2014) sugiere que la eficiencia de transfección también está sujeta al material de las nanopartículas y al tipo de línea celular cuando se emplean tamaños de partícula iguales. Asimismo, Aranda-Barradas, et al. (2022) menciona que la eficiencia de transfección sí depende los parámetros fisicoquímicos aunque también del MW del quitosán, fisiología celular y el protocolo de transfección *in vitro* en cuanto a la presencia de FBS en el medio. Mediante LDV se determinó el potencial zeta (ZP) que se define como un indicador de la estabilidad de las partículas debido a que muestra el grado de repulsión entre las partículas en dispersión. Valores elevados de ZP significa que las partículas no se agregarán debido a la repulsión; mientras que valores bajos implica la superación de la repulsión por parte de la atracción y es probable que se

formen agregados (Samimi, et al., 2019). Nanopartículas con ZP entre $-10 < 0 < 10$ mV son consideradas como neutras, mientras que nanopartículas con valores de ZP mayores de +30 y menores de -30 mV son consideradas como fuertemente catiónicas o aniónicas, respectivamente. Dado que la mayoría de las membranas celulares tienen una carga negativa, las nanopartículas catiónicas están asociadas con mayor toxicidad debido a ruptura de la pared celular (Clogston & Patri, 2010). En contraste, Shao, X., et al. (2015) analizaron la citotoxicidad asociada a nanopartículas con valores positivos y negativos de PZ y concluyeron que es más influyente la concentración de las nanopartículas sobre la citotoxicidad aún con nanopartículas PZ positivos. Como se puede observar en la Tabla 4, la media de ZP para todas las muestras son valores positivos aunque ninguno es mayor a 30 mV lo que favorecerá la interacción electrostática con la membrana celular en ensayos *in vitro*, además, Mao, et al., (2010) mencionan que nanopartículas catiónicas pueden unirse a microtubulos aniónicos o proteínas moleculares motoras para ser transportadas a la membrana nuclear provocando una mejora en el transporte citoplasmático; por otra parte, un valor positivo de ZP sugiere que la estabilidad de los sistemas es óptima y, en este caso, que no son lo suficientemente catiónicos para producir citotoxicidad (Shao, X., et al., 2015). Resultados de la prueba *t* (Tabla 5) determinó que no existe diferencia significativa entre el ZP de la muestra control contra los poliplejos ensamblados con P1/P2 y tampoco existe diferencia significativa cuando se compara a NPs-P1 contra NPs-P2 lo que sugiere que la presencia de péptidos cariofílicos no modifica la estabilidad del sistema y probablemente tampoco la toxicidad.

Adicionalmente, Manzares, et al. (2020) reporta que nanopartículas catiónicas son internalizadas preferentemente por endocitosis mediada por clatrina.

Finalmente, el tercer parámetro para la caracterización fisicoquímica de los poliplejos, es el índice de polidispersión que estima la uniformidad media de una solución de partículas, dicho en otras palabras, es la representación de la distribución del tamaño de los elementos (nanopartículas para este caso) en una muestra dada; también puede usarse como referencia de la agregación de las nanopartículas. Para nanopartículas a base de polímero, el valor más aceptable es ≤ 0.2 (Danaei, et al., 2018). De acuerdo con la Tabla 4 y con lo recién mencionado, solamente las nanopartículas ensambladas con el quitosán de alto peso molecular (CS-NPs-HMW) presentaron una media de P_{id} superior a 0.2.

No existe diferencia significativa para el P_{id} cuando se comparan las nanopartículas CS-NPs-P1/P2 contra el control ni cuando se comparan los poliplejos ensamblados con péptido

cariofílico entre sí (Tabla 5); sin embargo, es importante mencionar que la media de P_{id} para CS-NPs-P2 es menor que CS-NPs-P1 y que incluso la muestra control.

Debido a los resultados obtenidos tras la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas (Tabla 4 y 5), se decidió que la muestra control a partir de ahora será CS-NPs LMW debido a que la muestra CS-NPs HMW presentó un valor de P_{id} y una media de tamaño de partícula y desviación estándar de tamaño de partícula mayores, lo anterior sugiere que el sistema no es homogéneo, las mediciones mediante DLS no son confiables, probablemente la muestra forma agregados y el tamaño de partícula disminuiría la eficiencia de transfección. Por otra parte, la comparación de la caracterización fisicoquímica entre los poliplejos ensamblados con los péptidos cariofílicos demostró que la muestra CS-NPs P2 tiene un tamaño significativamente menor que la muestra control, los valores de ZP y P_{id} son más adecuados en comparación con los valores obtenidos de la muestra CS-NPs P1. Debido a lo anterior, solamente se realizó caracterización morfológica de la muestra CS-NPs P2, se observa en la Figura 18 una morfología indefinida y parecida a un *film*, sin embargo, en el inciso (C) con el aumento 50,000X se observa una morfología pseudo-esférica, aunque se sigue observando una agregación de los poliplejos. Es importante mencionar que la preparación de la muestra para SEM implica la desecación en la muestra y por ende ocurre la formación de aglomerados (Bouzakher, N. et al., 2019), existen métodos para minimizar la aglomeración tales como la aplicación de ultrasonido, modificación de la carga de superficie mediante cambios en el pH y el PZ.

Debido a lo anterior, es importante correlacionar la morfología observada con los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica y, aunque a partir de las fotografías obtenidas mediante SEM parezca que la muestra forma agregados, los valores de DLS y LDV demuestran que la muestra no forma agregados y sugiere entonces que la morfología es esférica.

Evaluación de la funcionalidad biológica de CS-NPs

Finalizada la caracterización fisicoquímica, se realizaron los estudios *in vitro* para la evaluación biológica de los poliplejos en las líneas celulares SiHa y HeLa con medio DMEM suplementado con FBS al 10% y en ausencia de suero debido a que algunos autores (Pengnam, S. et al., 2018) hipotetizan que, dado que las proteínas séricas tienen una carga negativa, habrá una interacción electrostática entre poliplejos catiónicos y proteínas séricas, lo que afectará la interacción de las nanopartículas con las proteínas presentes en la superficie celular y, por ende, la internalización. Sin embargo, otros autores (Rahmani, et al., 2019) mencionan que la presencia de FBS en el medio de cultivo acelera la función

celular e incrementa la internalización de nanopartículas; además, Aranda-Barradas, et al. (2022) describen que la presencia de suero es menester para la supervivencia celular a largo plazo y se asemeja más a las condiciones de los poliplejos en medio fisiológico.

Tras la visualización de las preparaciones mediante microscopia de fluorescencia, se optó por realizar los ensayos *in vitro* con medio DMEM suplementado con FBS al 10% puesto que, bajo las mismas concentraciones de pDNA (9 µg) y condiciones, la presencia de suero tuvo un efecto positivo en los ensayos de transfección *in vitro* ya que la fluorescencia observada con el filtro FITC era mayor. Una hipótesis adicional para explicar este resultado se basa en que las partículas de gran tamaño sedimentan más rápidamente lo que provoca un incremento en la interacción con las nanopartículas fijadas en el cubreobjetos y al haber un mayor contacto, hay una mayor transfección (Pezzoli, et al., 2017).

No se observó transfección para la muestra del pDNA desnudo tal y como era esperado (resultado no mostrado).

De acuerdo con la Tabla 6, se comparó cualitativamente la fluorescencia observada con el filtro FITC para las muestras control (CS-NPs LMW) en ambas líneas celulares, se observó mayor fluorescencia para la línea celular HeLa; dado que en ambas líneas celulares hay colocalización, se deduce que la fluorescencia observada con el filtro FITC se debe a la expresión del transgén que codifica para la proteína verde fluorescente. Además, el incremento en la confluencia tras la exposición de las células SiHa y HeLa a las nanopartículas sugiere que los poliplejos no son citotóxicos.

Ahora bien, las células HeLa tratadas con las muestras CS-NPs P1 y CS-NPs P2 mostraron mayor fluorescencia bajo el filtro FITC en comparación con las células HeLa tratadas con la muestra control (CS-NPs LMW), en ambas muestras se observó colocalización con el filtro DAPI para la visualización del núcleo. De acuerdo con la Tabla 5, no existe diferencia significativa de las propiedades fisicoquímicas entre CS-NPs LMW y CS-NPs P1 por lo que el aumento de fluorescencia observada con CS-NPs P1 se debe a la presencia del péptido cariofílico. Por otro lado, para CS-NPs P2 solo existe diferencia significativa para el tamaño de nanopartícula cuando se compara con la muestra control, por lo que, además de que P2 aumentó la compactación del pDNA también aumentó la fluorescencia en el ensayo *in vitro*. A pesar del aumento en la fluorescencia debido a la presencia de los péptidos cariofílicos, es relevante mencionar que se observa una mayor fluorescencia para las células transfectadas con las nanopartículas ensambladas con P2 que aquellas ensambladas con P1. El resultado anterior era esperado debido a que los resultados de caracterización

fisicoquímica, específicamente en cuanto a tamaño de partícula, favorecían a la muestra CS-NPs P2 sobre CS-NPs P1.

Por otro lado, para el caso de las células SiHa, se observa mayor fluorescencia en las células tratadas con CS-NPs P1 y CS-NPs P2 comparadas con el control, sin embargo, no se observan diferencias en la fluorescencia cuando se compara las células tratadas con CS-NPs P1 y CS-NPs P2.

Se observa una diferencia cualitativa de la fluorescencia entre líneas celulares bajo las mismas condiciones. Está ampliamente reportado que los ensayos de transfección son dependientes de la línea celular empleada. La investigación realizada por Douglas et. al. (2008) menciona que la fisiología de la membrana celular juega un papel importante en la unión de poliplejos y, a partir del empleo de inhibidores de endocitosis, proponen que tanto las rutas dependientes de clatrina y caveolina están involucradas en la endocitosis, aunque la proporción depende del tipo celular. Adicionalmente, Turan et. al. (2006) establece que no hay correlación entre la internalización celular y la eficiencia de transfección de los complejos, es decir, células que internalicen una cantidad similar de poliplejos no expresan el gen al mismo nivel por lo que también debe considerarse el escape endosomal como punto de mejora para aumentar la expresión del transgén.

Cualitativamente, se observa mayor fluorescencia por expresión de la proteína GFP para los poliplejos ensamblados con los péptidos cariofílicos en comparación con la muestra control. Sin embargo, comparando la fluorescencia entre la muestra ensamblada con P1 y con P2, se observa mayor fluorescencia para esta última con las células HeLa. La transfección mejorada para CS-NPs P2 aunado con los resultados de la caracterización morfológica y fisicoquímica de los poliplejos permiten afirmar que CS-NPs P2 es mejor que CS-NPs P1; una posible explicación radica en la longitud y composición de cada uno de los péptidos cariofílicos ya que P1 está compuesto por 13 aminoácidos (CGGGPKKKRVKVED) mientras que P2 tiene una extensión de 9 aminoácidos (PAAKRVKLD), la cantidad de aminoácidos con carga neutra en P1 es mayor en comparación con P2; los aminoácidos neutros al no interactuar con el pDNA ni con el quitosán, no favorecen la compactación (Olivo, 2022). Lo anterior explica el aumento en el tamaño de nanopartícula y, probablemente dificulte la interacción con la membrana e internalización celular en ensayos *in vitro*.

Modificaciones a la metodología de acoplamiento del ligando a las nanopartículas

La metodología descrita por Mao, et al. (2001) establece que tras la tiolación del péptido se debe eluir la mezcla con una columna con PBS y EDTA (0.01M), el entrecruzador SPDP se emplea para modificar al quitosán con el grupo terminal 2-piridilditiol para formar puente de disulfuro con el ligando tiolado, el uso de DSS ayuda a reaccionar de manera cruzada con los grupos amino del quitosán para estabilizar las nanopartículas, tras la adición de glicina para terminar la reacción de acoplamiento, las nanopartículas (CS-NPs GRP) deben separarse mediante diálisis. Sin embargo, aunque en un primer intento se realizó considerando la elución y diálisis (metodología A), la eficiencia de reacción obtenida fue muy baja (alrededor de 0.0081%).

El anterior resultado pudo deberse a algunas situaciones; en primer lugar, se empleó la solución de GRP-SH un día después de su obtención para realizar el acoplamiento a las nanopartículas debido a lo demorado que había sido la tiolación, cromatografía por exclusión molecular y el proceso de concentración de la muestra por centrifugación al vacío; Hermanson, G. (2008) remarca la importancia de emplear al péptido tiolado inmediatamente para evitar la reciclación de los grupos tioles libres y la disminución de la disponibilidad de los grupos sulfhidrilo. En segundo lugar, el ensayo de Ellman's se realizó construyendo una curva de calibración tal como lo describe Hermanson, G. (2008), sin embargo, las concentraciones de los sistemas eran mucho mayores que la de la muestra (0.083 mg/mL) por lo que ajustar la curva retardó aún más el acoplamiento de GRP-SH a las nanopartículas. En tercer lugar, las soluciones para el entrecruzamiento de SPDP con quitosán (SPDP y DSS) se prepararon un día antes debido a que la tiolación del GRP y el acoplamiento de GRP-SH a las nanopartículas entrecruzadas con SPDP fueron programados para el mismo día; de acuerdo con el fabricante, las soluciones de SPDP y DSS a emplear deben ser preparadas e inmediatamente utilizadas y, aunque no especifica un lapso máximo de utilización, las soluciones pudieron haber sufrido cierta degradación previo al entrecruzamiento con las nanopartículas. Finalmente, se planteó la posibilidad de haber perdido producto durante la manipulación y montaje del sistema de diálisis.

Debido a los hallazgos y puntos de mejora identificados tras el primer intento y dado que el reactivo Traut no interfiere con el resto de la metodología, se optó por la omisión de la cromatografía y concentración del péptido tiolado (metodología B) con el objetivo solucionar el problema de tener baja concentración del péptido tiolado, además de realizar todo el

proceso en un solo día y así reducir la probabilidad de la reciclación de los grupos sulfhidrilo de GRP-SH y la degradación de las soluciones de SPDP y DSS.

Debido a que el PBS para eluir la columna de filtración para GRP-SH contiene EDTA que funge como agente quelante de metales para evitar la oxidación catalizada por metales y la consecuente formación de puentes de disulfuro, se optó por adicionar EDTA (5 mM) al PBS empleado para preparar la solución de GRP (1 mg/mL) tal como lo describe Mao, et al. (2001). Además, se utilizó la metodología descrita por Thermo Fisher Scientific Inc. (2011) para el ensayo Ellman's debido a que no implica la construcción de una curva de calibración pues en su lugar utiliza el coeficiente de absortividad de TNB ($14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para la determinación de la concentración de los grupos tiolados presentes en la muestra; este método reduce tiempo y cantidad de reactivos empleados. Finalmente, la diálisis de las nanopartículas acopladas con GRP-SH también se omitió y en su lugar se realizó una centrifugación para posteriormente resuspender con buffer de fosfatos y así reducir la concentración de trazas de los reactivos utilizados (SPDP, piridin-2-tiona, DSS, glicina, reactivo de Traut libre) cuya cuantificación e identificación se considera como perspectiva de la investigación.

El segundo intento del acoplamiento del ligando GRP a las nanopartículas obtuvo mejores resultados en diferentes aspectos (Tabla 7). Primeramente, se redujo el tiempo lo que permitió que la metodología fuera completada en un solo día; secundariamente, la concentración del péptido tiolado (0.878 mg/mL) así como la eficiencia de reacción (49.9%) fueron mayores que aquellos obtenidos con la metodología original.

Se repitió la metodología B con el fin de corroborar los resultados obtenidos y se determinó que la concentración de GRP-SH fue de 0.859 mg/mL (Tabla 7) y la eficiencia de reacción fue de 72.7% (Tabla 8).

De acuerdo con el barrido espectral del ensayo de Ellmans para la cuantificación de GRP-SH (Figura 19), se pueden observar más picos que aquél de interés (412 nm) entre los cuales se puede encontrar la absorbancia del reactivo de Traut sin reaccionar (248 nm), de los enlaces peptídicos del GRP (190-220 nm), el aminoácido aromático presente en el GRP (Tyr) con una absorbancia de 280 nm y el quitosán de las nanopartículas que se encuentra expuesto y cuya absorbancia es de 230 (Sionkowska, et al., 2013). Por su parte, el barrido espectral para determinar la concentración de la piridin-2-tiona (Figura 20) muestra picos que pueden deberse al reactivo de Traut sin reaccionar, enlaces peptídicos y aminoácido aromático presente en el GRP, glicina (260-280 nm). Sin embargo, para ambos casos se

propone que se realice la caracterización de los componentes de la solución para fines de citotoxicidad.

Caracterización fisicoquímica y morfológica de CS-NPs GRP

Los resultados obtenidos por DLS (Figura 21) determinaron que la muestra CS-NPs GRP tiene un tamaño de nanopartícula promedio de ($n=3$) de 269.23 ± 40.5 nm, PZ de 24.96 ± 1.1 mV y PId 0.2 ± 0.05 (Tabla 9).

Los resultados de la prueba *t* de Student (Tabla 10) determinaron que existe una diferencia significativa del tamaño de partícula cuando se compara la muestra control (CS-NPs LMW) contra las nanopartículas con el ligando GRP acoplado, teniendo esta última un tamaño de partícula significativamente menor que puede explicarse debido a los aminoácidos positivos que tiene GRP; éstos aumentan la carga neta positiva del quitosán y favorecen al efecto de supercompactación con el pDNA por interacción electrostática. Mientras que, para la comparación del tamaño de partícula entre CS-NPs P2 y CS-NPs GRP, no hay diferencia significativa.

Por otro lado, se determinó que CS-NPs GRP tiene un PZ significativamente mayor que CS-NPs LMW y CS-NPs P2 (Tabla 10), y al ser más catiónicas sugiere que la estabilidad de los sistemas es mayor debido a una menor probabilidad de floculación por repulsión de cargas. Lo anterior también podría explicarse debido a la carga neta positiva total por los aminoácidos positivos del GRP.

Finalmente, CS-NPs GRP presenta un valor de PId significativamente mayor que la muestra control y que los poliplejos ensamblados con P2 (Tabla 10), sin embargo, sigue estando dentro del valor aceptado para nanopartículas a base de polímero de acuerdo con (Danaei, et al., 2018) por lo que los resultados obtenidos mediante DLS son confiables por uniformidad de la muestra, además el valor de PId sugiere la ausencia de agregación en esta.

Se realizó la caracterización morfológica mediante SEM para la muestra CS-NPs GRP y se puede observar, de acuerdo con la Figura 22, que la morfología es esférica desde el aumento de 15,000 aunque se percibe mucho mejor a 35,000 y 45,000 (Figura 22 inciso B y C). Bajo el aumento de 75,000 (Figura 22 inciso D).

Comparando la morfología de la muestra CS-NPs GRP (Figura 22) con las nanopartículas CS-NPs P2, se puede observar que CS-NPs GRP es morfológicamente más esférica y no se observa el *film* que estuvo presente en la muestra CS-NPs P2 (Figura 18).

Ensayo de internalización de nanopartículas dirigidas

El ensayo de internalización se realizó para dar seguimiento al tiempo en el que las nanopartículas son endocitadas a los 30 minutos.

Para HeLa, se observa que algunas nanopartículas con el péptido cariofílico (CS-NPs P2) se encuentran circundantes a los núcleos mientras que solo se observan pocas nanopartículas dentro de un núcleo celular. Se observan algunas otras lejanas a los núcleos cuya endocitosis aún no ha ocurrido a los 30 minutos. Por otro lado, las nanopartículas dirigidas, en su mayoría habían alcanzado al núcleo por lo que la presencia del ligando acoplado no solamente mejoró la transfección sino también la aceleró.

En contraste, para la línea celular SiHa, se observa mayor fluorescencia con el filtro RH en los núcleos para la muestra CS-NPs P2 y pocas alrededor de algunos núcleos que pudieran estar en el espacio citoplásmico o extracelular; sin embargo, para las células SiHa tratadas con las nanopartículas dirigidas, se observan más fluorescencia con el filtro RH alrededor de los núcleos y no dentro de éstos. Aunque, debido a que solo se evaluó la internalización a los 30 min, sería bueno re-evaluar la internalización para SiHa con una extensión del tiempo para seguir la entrada de CS-NPs GRP al núcleo. Cobra relevancia mencionar que la fisiología celular y los diferentes mecanismos de endocitosis de la célula influyen en el tiempo para la internalización de los poliplejos (Douglas, et al., 2008).

Evaluación de la funcionalidad biológica para CS-NPs GRP

Se realizaron ensayos *in vitro* con medio DMEM suplementado con FBS al 10% en las líneas celulares SiHa y HeLa para la evaluación de la funcionalidad biológica de las nanopartículas con el ligando GRP acoplado, la cantidad de material genético empleada para la segunda etapa de los ensayos *in vitro* fue equivalente a 3.7 µg debido a que, por el volumen de la muestra CS-NPs GRP no sería suficiente adicionar 9.9 µg de material genético por pozo para ambas líneas celulares.

A pesar de que las alícuotas de la muestra CS-NPs GRP contenían residuos de las reacciones de tiolación, entrecruzamiento y acoplamiento, no se observó que la presencia de estos tuviera un efecto relevante en la citotoxicidad pues permitió el aumento de la confluencia tras la interacción nanopartículas-célula, debido a esto, se infiere que la concentración empleada y el tiempo de exposición no son citotóxicos en las líneas HeLa y SiHa pues el aumento de la confluencia observada en las células sin tratamiento fue cualitativamente similar o igual al de las células tratadas con las nanopartículas CS-NPs GRP.

Es importante mencionar que debido a que el pH del medio en los ensayos de transfección *in vitro* es mayor al de la muestra en la que se encuentran suspendidas las nanopartículas, el valor de PZ disminuye; sin embargo, de acuerdo con Layek et al. (2017), valores no tan elevados de PZ son favorables pues son menos citotóxicos y también promueve con mayor facilidad la liberación del pDNA una vez dentro de la célula.

Se puede observar en la Tabla 11 una diferencia en la fluorescencia para la muestra control y para CS-NPs P2 debido a que la cantidad de pDNA empleada fue menor, se ve la diferencia de fluorescencia para la muestra control y las nanopartículas ensambladas con los péptidos cariofílicos en comparación con la fluorescencia observada para el primer ensayo *in vitro* (Tabla 6). Sin embargo, se observa el mismo comportamiento; mayor transfección para la muestra CS-NPs P2 en comparación con CS-NPs P1 y CS-NPs LMW en células HeLa aunque, la muestra con la que se observa mayor fluorescencia es con CS-NPs GRP. De acuerdo con Begum et al. (2016) la línea celular HeLa tiene una sobreexpresión del receptor GRP por lo que se esperaba que la fluorescencia fuera mayor para la muestra CS-NPs GRP debido a la interacción específica ligando-receptor con la superficie celular.

Por otro lado, para la línea celular SiHa también se observó una mayor fluorescencia para la muestra CS-NPs GRP en comparación con los ensayos *in vitro* con las nanopartículas control y con las ensambladas con P1 y P2.

Comparando la fluorescencia observada en ambas líneas celulares tratadas entre la muestra CS-NPs GRP y las muestra control, CS-NPs P1 y CS-NPs P2, se observa mayor fluorescencia en las células tratadas con las nanopartículas acopladas con el ligando GRP. Sin embargo, la línea celular SiHa mostró una mayor fluorescencia en comparación con las células HeLa. Aunado con los resultados de internalización, a pesar de que la internalización de las nanopartículas dirigidas es más tardada para las células SiHa, su transfección es mayor en comparación con las células HeLa.

Debido a que no se encontró reportado en la literatura la sobreexpresión del receptor GRP, se plantea la realización de PCR cuantitativa para comprobar si existe o no la sobreexpresión de este y, además, comparar los niveles de expresión con HeLa.

Conclusiones

Se ensamblaron nanopartículas a base de quitosán mediante coacervación compleja cuyos valores de tamaño de partícula (327.6 ± 29.2 nm), PZ (16.5 ± 2.8 mV) y PId (0.14 ± 0.07) son óptimos de acuerdo con lo reportado en la literatura, posteriormente se realizaron ensayos de retardo y se determinaron las concentraciones óptimas de P1[0.35] mM y P2 [0.52] mM; los ensayos de retención revelaron que las concentraciones óptimas de CS de 20.6 kDa son de 0.16 y 0.14% para P1 y P2, respectivamente.

Se caracterizó fisicoquímica y morfológicamente a CS-NPs ensambladas por coacervación compleja mediante la adición de péptidos cariofílicos (P1 y P2) y se determinó que la adición de P2 al poliplexo tiene un efecto significativamente positivo en el tamaño de partícula comparado con la muestra control (P1 tuvo un tamaño de partícula de 346 ± 128.5 nm y P2 de 267.2 ± 0 nm), los valores de PZ (17.1 ± 4.3 mV para P1 y 16.6 ± 1.3 mV,P2) y PId son óptimos (0.15 ± 0.2 y 0.1 ± 0.1 P1 y P2, respectivamente) para ambas muestras. Además, tras la evaluación de la funcionalidad biológica *in vitro* se observó que su presencia en los poliplexos, mejora la transfección en células HeLa y SiHa; que la fisiología de las líneas celulares son importantes para los ensayos de transfección a pesar de que ambas líneas pertenecen a cáncer cervicouterino observándose una mayor transfección para las muestras con P2 que con P1 en las células HeLa; mientras que en SiHa los poliplexos ensamblados con P1/P2 mostraron un grado de fluorescencia similar. Finalmente, las nanopartículas control y con P1 y P2 no mostraron señal de citotoxicidad.

Debido a que CS-NPs P2 presentó en su mayoría mejores características fisicoquímicas y funcionalidad biológica, se empleó para la segunda etapa del proyecto que consistió en el desarrollo de una metodología de acoplamiento del ligando GRP mediante el empleo del entrecruzador SPDP. La caracterización fisicoquímica determinó que CS-NPs GRP cumple con los valores óptimos para tamaño de partícula (260.9 ± 33.5 nm), PZ (24.2 ± 1.64 mV) y PId (0.25 ± 0.04), es significativamente mayor para las 3 características en comparación con la muestra CS-NPs LMW y que los valores de PZ y PId son significativamente mayores que los valores de CS-NPs P2. Morfológicamente, CS-NPs GRP se observó mediante fotografías SEM como esférica lo que ayudaría la interacción con la membrana celular.

Finalmente, la funcionalidad biológica *in vitro* mostró que la presencia del ligando GRP acoplado a los poliplexos mejoraba la transfección en las líneas HeLa y SiHa a un grado incluso mayor que la observada con CS-NPs P1/P2, destacando a la línea celular SiHa por su mayor transfección en comparación con las células HeLa. Asimismo, no se observó citotoxicidad para ninguna de las líneas celulares para la muestra CS-NPs GRP.

Perspectivas de la investigación

Se sugiere la realización de la caracterización y cuantificación de los residuos presentes en la solución de CS-NPs GRP con el fin de determinar dosis de citotoxicidad de sus componentes.

Debido a que se observó una mayor fluorescencia en las células SiHa tratadas con la muestra CS-NPs GRP se plantea la perspectiva de la realización de una PCR cuantitativa con el objetivo de comprobar la presencia de sobreexpresión del receptor para GRP en células SiHa. Asimismo, resulta considerar para futuras etapas la exposición de células no tumorales a las nanopartículas para evaluar su transfección y efecto.

Finalmente, sería preciso el ensamblaje de nanopartículas con el gen terapéutico de interés para realizar posteriormente el acoplamiento del ligando de acuerdo con la metodología descrita en el presente trabajo para evaluar la expresión del transgén terapéutico.

Referencias

1. Tang, R., & Xu, Z. (2020). Gene therapy: a double-edged sword with great powers. *Molecular and cellular biochemistry*, 474(1-2), 73–81. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03834-3>.
2. Wileys, J. & Sons, L. (2021). Indications addressed by gene therapy clinical trials. *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*. <https://a873679.fmphost.com/fmi/webd/GTCT>
3. Goswami, R., Subramanian, G., Silayeva, L., Newkirk, I., Doctor, D., Chawla, K., Chattopadhyay, S., Chandra, D., Chilukuri, N., & Betapudi, V. (2019). Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Frontiers in oncology*, 9, 297. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00297>
4. Santos-Carballal, B., Fernández Fernández, E., & Goycoolea, F. M. (2018). Chitosan in Non-Viral Gene Delivery: Role of Structure, Characterization Methods, and Insights in Cancer and Rare Diseases Therapies. *Polymers*, 10(4), 444. <https://doi.org/10.3390/polym10040444>
5. Perez Ruiz de Garibay, A. Endocytosis in gene therapy with non-viral vectors. *Wien Med Wochenschr* 166, 227–235 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10354-016-0450-5>
6. Islam, M. A., Firdous, J., Choi, Y. J., Yun, C. H., & Cho, C. S. (2014). Regulation of endocytosis by non-viral vectors for efficient gene activity. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(1), 67–80. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1682>
7. Xiang, S., Tong, H., Shi, Q., Fernandes, J. C., Jin, T., Dai, K., & Zhang, X. (2012). Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 158(3), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.093>
8. Hillaireau, H., & Couvreur, P. (2006). Polymeric nanoparticles as drug carriers. *Polymers in drug delivery*, 101-110.
9. Garaiova, Z., Strand, S. P., Reitan, N. K., Lélou, S., Størset, S. Ø., Berg, K., Malmo, J., Folasire, O., Bjørkøy, A., & Davies, C. (2012). Cellular uptake of DNA-chitosan nanoparticles: the role of clathrin- and caveolae-mediated pathways. *International journal of biological macromolecules*, 51(5), 1043–1051. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.016>
10. Lukashov, A. & Zamyatnin, A. (2016). Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives. *Biochemistry (Moscow)*, 81(7) 926-936. <https://doi.org/10.1134/S0006297916070063>

11. Alnasser S. M. (2021). Review on mechanistic strategy of gene therapy in the treatment of disease. *Gene*, 769, 145246. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145246>
12. Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *The AAPS journal*, 23(4), 78. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00608-7>
13. Helal, N. A., Osami, A., Helmy, A., McDonald, T., Shaaban, L. A., & Nounou, M. I. (2017). Non-viral gene delivery systems: hurdles for bench-to-bedside transformation. *Die Pharmazie*, 72(11), 627–693. <https://doi.org/10.1691/ph.2017.7092>
14. Oliveira, A. V., Rosa da Costa, A. M., & Silva, G. A. (2017). Non-viral strategies for ocular gene delivery. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 77, 1275–1289. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.068>
15. Al-Dosari, M. S., & Gao, X. (2009). Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*, 11(4), 671–681. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9143-y>
16. Jiang, H.-L., Cui, P.-F., Xie, R.-L., & Cho, C.-S. (2014). Chemical Modification of Chitosan for Efficient Gene Therapy. *Advances in Food and Nutrition Research*, 83–101. <https://doi:10.1016/b978-0-12-800268-1.00006-8>
17. Chuan, D., Jin, T., Fan, R., Zhou, L., & Guo, G. (2019). Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. <https://doi:10.1016/j.cis.2019.03.007>
18. Rizeq, B. R., Younes, N. N., Rasool, K., & Nasrallah, G. K. (2019). Synthesis, Bioapplications, and Toxicity Evaluation of Chitosan-Based Nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5776. <https://doi.org/10.3390/ijms20225776>
19. Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3–11. <https://doi.10.1016/j.addr.2009.09.004>
20. Jiang LQ, Wang TY, Webster TJ, Duan HJ, Qiu JY, Zhao ZM, Yin XX, Zheng CL. Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12:6383-6398. <https://doi.org/10.2147/IJN.S142060>
21. Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties, and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1358–1368. <https://doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>

22. Nagpal, K., Singh, S. K., & Mishra, D. N. (2010). Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 58(11), 1423–1430. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.1423>
23. Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., & Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell communication and signaling: CCS*, 19(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00741-y>
24. Opanasopit, P., Rojanarata, T., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., & Ruktanonchai, U. (2009). Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1-2), 291–295. <https://doi:10.1016/j.ijpharm.2009.08.029>
25. Muhammad, K., Zhao, J., Ullah, I., Guo, J., Ren, X. K., , & Feng, Y., (2019). Ligand targeting and peptide functionalized polymers as non-viral carriers for gene therapy. *Biomaterials science*, 8(1), 64–83. <https://doi.org/10.1039/c9bm01112a>
26. Cornelio, D. B., Meurer, L., Roesler, R., & Schwartzmann, G. (2007). Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer. *Oncology*, 73(5-6), 340–345. <https://doi.org/10.1159/000134478>
27. Baratto, L., Duan, H., Maecke, H. R., & Iagaru, A. (2020). Imaging the Distribution of Gastrin Releasing Peptide Receptors in Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, jnumed.119.234971. <https://doi:10.2967/jnumed.119.234971>
28. Begum, A. A., Moyle, P. M., & Toth, I. (2016). Investigation of bombesin peptide as a targeting ligand for the gastrin releasing peptide (GRP) receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(22), 5834–5841. <https://doi:10.1016/j.bmc.2016.09.039>
29. Hermanson, G. (2013). *Bioconjugate Techniques*. Rockford, IL: Pierce Biotechnology
30. Haliza K. & Nik, N. (2012). Synthesis of a New Potential Conjugated TAT-Peptide-Chitosan Nanoparticles Carrier via Disulphide Linkage. *Journal of Nanomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/134607>
31. Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Universidad de Salamanca. <https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
32. Opanasopit, P., Rojanarata, T., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., & Ruktanonchai, U. (2009). Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1-2), 291–295. <https://doi:10.1016/j.ijpharm.2009.08.029>

33. Aranda-Barradas, M., Trejo-López, S. Del Real, A., Álvarez-Almazán, A., Méndez-Albores, A., García-Tovar, C., González-Díaz & Miranda-Castro (2022). Effect of molecular weight of chitosan on the physicochemical morphological, and biological properties of polyplex nanoparticles intended for gene delivery. *Carbohydrate polymer technologies and applications*. Vol. 4 <https://doi.10.1016/j.carpta.2022.100228>
34. Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*. 2014 May 6;9 Suppl 1(Suppl 1):51-63. <https://doi:10.2147/IJN.S26592>
35. Samimi, S., Maghsoudnia, N., Eftekhari, R. B., & Dorkoosh, F. (2019). Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, 47–76. <https://doi:10.1016/b978-0-12-814031-4.00003-9>
36. Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2010). Zeta Potential Measurement. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, 63–70. https://doi:10.1007/978-1-60327-198-1_6.
Mao, S., Sun, W., & Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.08.004>
37. Prabha, S., Arya, G., Chandra, R., Ahmed, B., & Nimesh, S. (2016). Effect of size on biological properties of nanoparticles employed in gene delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1), 83–91. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.913054>
38. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Particle Size and Polydispersity index in the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
39. Pengnam, S., Leksantikul, L., Tonglairoum, P., Opanasopit, P., Ni-yomtham, N., Yingyongnarongkul, B., Plianwong, S. (2018). Influence of serum on DNA protection ability and transfection efficiency of cationic lipid-based nanoparticles for gene delivery. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201819201025>
40. Rahmani, S., Hakimi, S., Esmaeily, A., Samadi, F. Y., Mortazavian, E., Nazari, M., Tehrani, M. R. (2019). Novel chitosan based nanoparticles as gene delivery systems to cancerous and noncancerous cells. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi:10.1016/j.ijpharm.2019.02.016>

41. Pezzoli, D., Giupponi, E., Mantovani, D. et al. Size matters for in vitro gene delivery: investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation. *Sci Rep* 7, 44134 (2017). <https://doi.org/pbidi.unam.mx:2443/10.1038/srep44134>
42. Douglas, K., Piccirillo c., Tabrizian, M. (2008). Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 68 676-687. <https://doi:10.1016/j.ejpb.2007.09.002>
43. Turan, K., & Nagata, K. (2006). Chitosan-DNA Nanoparticles: The Effect of Cell Type and Hydrolysis of Chitosan on In Vitro DNA Transfection. *Pharmaceutical Development and Technology*, 11(4), 503–512. <https://doi:10.1080/10837450600940873>
44. Romøren, K., Pedersen, S., Smistad, G., Evensen, Ø., & Thu, B. J. (2003). The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 261 (1–2), 115–127. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00301-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00301-6)
45. Bouzakher, N., Chivas-Joly, C., Devoille, L., Hochepped, J. & Feltin, N. (2019). Challenges in sample preparation for measuring nanoparticles size by scanning electron microscopy from suspensions, powder form and complex media. *Powder Technology*. <https://doi.10.1016/j.powderc.2019.10.022>
46. Shao, X.-R., Wei, X.-Q., Song, X., Hao, L.-Y., Cai, X.-X., Zhang, Z.-R., Peng, Q. and Lin, Y.-F. (2015), Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Prolif.*, 48: 465-474. <https://doi.org/10.1111/cpr.12192>
47. Olivo, K. (2022). Evaluación del efecto de dos péptidos cariofílicos en el ensamblaje y funcionalidad de nanopartículas para terapia génica a base de quitosán utilizando el plásmido pEGFP-N1. Tesis para obtener el pregrado.
48. Zhang, S., Gao, H. & Bao, G. (2015). Physical principles of nanoparticle cellular endocytosis. *ACS nano*, 9 (9), 8655-8671. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03184>
49. Zylberberg, C., Gaskill, K., Pasley, S., & Matosevic, S. (2017). Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy. *Gene therapy*, 24(8), 441–452. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.41>
50. Thomas, Tajmir-Riahi, H.-A., & Pillai, C. K. S. (2019). Biodegradable Polymers for Gene Delivery. *Molecules*, 24(20), 3744. <https://doi.org/10.3390/molecules24203744>

51. Yin, H., Kanasty, R., Eltoukhy, A., Vegas, A., Dorkin, J & Anderson, D. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews* Vol. 15. pp 541-555. <https://doi.10.1038/nrg3763>
52. Diario Oficial de la Federación (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-257-SSA1-2014, En materia de medicamentos biotecnológicos. Recuperado https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5375517&fecha=11/12/2014#gsc.tab=0
53. Burrows, A. (2017). Key regulatory considerations around cell and gene therapy. <https://informaconnect.com/cell-gene-therapies-regulatory-considerations-whitepaper/>
54. Husain, S., Han, J., Au, P., Shannon, K. & Puri, R. (2015). Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval. *Cancer Gene Therapy* (22) 554-563. <https://doi:10.1038/cgt.2015.58>
55. Thomas, C., Erhardt, A. & Kay, M. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews* 346-358 <https://doi:10.1038/nrg1066>
56. Manzanares, D. & Ceña, V. (2020). Endocytosis: The nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. *Pharmaceutics*. <https://doi:10.3390/pharmaceutics1204371>
57. Alameh, M., DeJesus, D., Jean, M., Darras, V., Thibault, M., Lavertu, M., Buschmann, M. & Merzouki, A. (2012). Low molecular weight chitosan nanoparticle system at low N:P for nontoxic polynucleotide delivery. *International Journal of Medicine* 1399-1414. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26571>
58. Lau, J., Rousseau, E., Zhang, Z., Uribe, C., Kuo, H., Zeisler, J., Zhang, C., Kwon, D., Lin, K. & Bénard, F. (2019). Positron emission tomography imaging of the Gastrin Releasing Peptide Receptor with a novel Bombesin analogue. *ACS Omega* 4(1) 1470-1478. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03293>
59. Tolossa, D., Muzazu, S., Digamo, K., Tayamika, M., Woldemedhin, B., Chilot, D., Khalayi, S., Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE open medicine*, 9, 20503121211034366. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>
60. World Cancer Research Fund International (2022). Worldwide cancer data. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/#:~:text=Find%20information%20about%20world%20cancer,and%208.8%20million%20in%20women.>

70. Bhat, R. & Grover, G. (2018). Ellman's assay for in-solution quantification of sulfhydryl groups. <https://www.bmglabtech.com/en/application-notes/ellmans-assay-for-in-solution-quantification-of-sulfhydryl-groups/#:~:text=Ellman's%20assay%20is%20a%20useful,the%20extinction%20coef%EF%AC%81cient%20of%20TNB.>
71. Sionkowska, A., Lewandowska, K., Planecka, A. & Kaczmarek, B. (2013). Influence of UV-radiation on molecular weight of chitosan. Progress in Chemistry and Application of Chitin and its derivatives. Vol XVIII