



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Desarrollo, caracterización y evaluación *in vitro* de nanopartículas a base de quitosán y el plásmido pSELECT-zeo-HSV1tk para el tratamiento de cáncer mediante terapia génica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

HÉCTOR EDUARDO CORONADO CONTRERAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARIA EUGENIA ARANDA BARRADAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA 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 el: **Trabajo de tesis**

Desarrollo, caracterización y evaluación *in vitro* de nanopartículas a base de quitosán y el plásmido pSELECT-zeo-HSV1tk para el tratamiento de cáncer mediante terapia génica.

Que presenta el pasante: **Héctor Eduardo Coronado Contreras**

Con número de cuenta: **418065958** para obtener el título de: **Licenciado 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 13 de octubre de 2022.

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	QFB. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	M. en C. Victoria Edwina Campos García	

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

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 y C2267

Dedicatoria

A mis padres Héctor Coronado González y Ana Laura Contreras Jerónimo, los cuales siempre han sido un magnífico ejemplo de lo que el trabajo duro, la constancia y el ingenio pueden lograr. He de confesar que durante mucho tiempo me faltó la sabiduría para entender todo lo que quisieron enseñarme y lo que aún trato de aprender de ustedes. Siempre han sido una guía, pero más que eso son unos padres increíbles, y tengo suerte de haber podido crecer con ustedes y me embriaga de felicidad el poder decir que nunca llegaron a hacerme falta. Ellos que me han acompañado en cada uno de los pasos que he dado a lo largo de mi vida, apoyándose sin pedir nunca nada a cambio. Ustedes que alimentaron todos mis sueños (cada uno más loco y descabellado que el anterior) a pesar del enorme esfuerzo que ello conllevaba. Me enseñaron a valerme por mí mismo, que no existía meta que no pudiera alcanzar, que no importa cuánto esfuerzo tome, siempre debo dar lo mejor de mí, sea cual sea el resultado. Ustedes me enseñaron que vale la pena luchar por lo que es justo, que pelearon en muchas ocasiones mis batallas (debo confesar que en ocasiones desearía que aún fuera así) y me enseñaron a hacerlo por mi cuenta. Quisiera tener la habilidad para poder plasmar de mejor manera el amor que les tengo, pero las palabras no son suficientes para lograrlo, es por eso que me comprometo a dejar que mis acciones hablen por sí solas. Prometo que ese orgullo que sienten cada vez que me miran no hará otra cosa más que crecer, usare todo lo que ustedes me enseñaron para lograr cualquier cosa que me proponga.

A mi hermano Cristian Daniel, que desde la primera vez que te mire a los ojos me mostraste una forma de ver el mundo completamente nueva, desde ese momento supe que no existía nada que yo no hiciera por ti. Al escribir esto evocan a mi mente cientos de recuerdos, sé que falle muchas veces, pero no dudes que mis acciones siempre estuvieron motivadas con las mejores intenciones. Sé que ya no eres un niño, pero desde el instante en que te conocí supe que no harías otra cosa más que impresionarnos a todos. Es usual que los hermanos mayores sean el ejemplo, pero Cristian, a cada paso que das me sigues asombrando y demostrándome que tengo mucho por aprender de ti.

A mis amigas, que más allá de lo académico me apoyaron y dieron fuerzas a cada paso que di en este camino. Me enseñaron muchas cosas que me convirtieron en una mejor persona y que sin su apoyo, consideración y cariño estos años hubieran sido completamente diferentes. Ustedes son los mejores ejemplos a seguir y sé que aún tengo demasiado que aprender de ustedes, y espero poder seguir aprendiendo a su lado durante varios años más. Es a todos ustedes a quienes les dedico este trabajo con gratitud, admiración y amor.

Agradecimientos

Se suele pensar que en la vida existen momentos sin importancia y aquellos que definen en quien nos convertiremos. Realmente cada situación por más importante que parezca se compone de pequeñas acciones que en el momento lucen insignificantes, pero al igual que el jardinero que planta una flor cada día y al pasar el tiempo construye un hermoso jardín, estas acciones generan importantes resultados. Una tesis sin importar del nivel que sea es igual, detrás de ella se encuentra depositado una gran cantidad de trabajo y tiempo, y que sin duda se compone del esfuerzo y cooperación de diversas personas. Con tal motivo, me gustaría tomarme un tiempo para agradecer a todas las personas que me han acompañado y brindado su apoyo en el final de esta gran etapa.

Primero me gustaría hacer un especial agradecimiento al técnico académico Francisco Rodolfo González por el apoyo técnico en la realización de este trabajo de tesis. Y no solo eso, quiero agradecer su infinita paciencia que me permitió aprender demasiado, no únicamente en lo académico, enseñándome lo que el compromiso, la constancia y la solidaridad significan.

Al Doctor Carlos Gerardo García Tovar y la Doctora Susana Patricia Miranda Castro, por abrir las puertas de sus laboratorios y brindarme no solo el acceso a reactivos y equipos, sino la confianza para permitirme aprender con completa libertad el uso de cada elemento en el laboratorio.

De igual forma quiero agradecer al INCAN, CINVESTAV, CFATA Juriquilla, a la academia de genética de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, al doctor Tonatiuh Cruz Sánchez y al doctor Abraham Méndez Albores, por el acceso a equipos y reactivos sin los que este proyecto no hubiera podido realizarse.

A mis compañeras y amigas de laboratorio Yareli y Karen que a pesar de conocerlas desde tiempo atrás esta experiencia nos permitió llegar a conocernos mucho más. Sin ustedes muchos de los resultados plasmados en esta tesis no hubieran podido ser obtenidos y no tengo duda alguna que sin su ayuda incondicional no hubiera sido capaz de aprender muchas cosas. A pesar de que nuestro trabajo estuvo plagado de mala suerte estoy bastante agradecido por haber podido contar con su apoyo tanto en los buenos y malos momentos. Especialmente quiero agradecer a mi asesora de tesis, la doctora María Eugenia Aranda Barradas, que además de ser una increíble asesora se convirtió en una gran amiga; permitiéndome tener la libertad y el control que ello conlleva sobre el proyecto a niveles que nadie jamás me hubiera permitido. Por siempre valorar y considerar mi opinión, ya que sin importar la diferencia de grados me hizo sentir que mis ideas eran verdaderamente valiosas y que merecían ser escuchadas. No puedo terminar de agradecer su siempre precisa crítica al proyecto, las facilidades que me dio no solo en el acceso a materiales con los que realizar este trabajo, sino el tener siempre el comentario ideal que me permitiera

mejorar en lo técnico y en lo personal. Gracias doctora por su cercanía y siempre estar dispuesta a resolver cualquier duda sin importar lo tonta que esta pudiera llegar a ser.

Con normalidad al llegar al final de un camino se suele mirar hacia atrás, tal vez como un acto inconsciente de liberación o en muchas ocasiones con el anhelo de poder quedarse por lo menos un minuto más en el mismo. Esto no es más que una simple treta del tiempo, que al recordar el pasado nos hace ver las cosas más felices de lo que verdaderamente fueron, pero esta no es la ocasión. Tengo la absoluta certeza de que el camino a pesar de estar plagado de momentos difíciles conserva en su mayoría un matiz de felicidad. Gracias Jessica, gracias Alejandra, gracias Jennifer, gracias a ustedes puedo decir que la felicidad fue el medio en el que decidí vivir durante este etapa. Ustedes estuvieron ahí cuando tuve la fuerza para lograr lo que fuera y cuando no fui capaz de ponerme de pie, siempre colocaron una gran sonrisa en mi rostro y me dieron la confianza para seguir adelante a pesar de todo. Se que el camino no fue ni será fácil, pero con ustedes será mucho más sencillo.

Mamá y papá, hace un tiempo hice un ejercicio muy interesante, consistía en tomar una foto de cuando era pequeño, mirar a ese niño a los ojos y preguntarme, ¿Si el me estuviera viendo diría “quiero ser como tú cuando sea grande”? Me alegra decir que la respuesta es un sí y estoy completamente seguro de que gran parte de ese merito se los debo a ustedes. Se que no fue fácil, que no siempre tuvieron las respuestas, pero si algo puedo jurar es que no pude tener mejores padres, al verme al espejo y reconocer mis más grandes virtudes se llena mi pecho porque sé que vienen de ustedes. Gracias por todo, por los regaños, los castigos, los premios, pero, sobre todo, por el cariño y orgullo que cada que me miran se escapa de sus ojos. Tendré muchísima suerte si al crecer soy tan solo la mitad de bueno que ustedes, muchas gracias, mamá y papá, les prometo que todo valdrá la pena, aunque sé que para ustedes siempre ha sido así.

Índice de contenido

Abreviaturas	16
1. Resumen.....	19
2. Introducción	21
3. Definición del problema y justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos.....	23
5.1. Objetivo general.....	23
5.2. Objetivos particulares	24
6. Antecedentes	24
6.1. Terapia génica.....	24
6.1.1. Clasificación terapia génica.....	26
6.1.2. Insertos utilizados en la terapia génica	30
6.1.3. Terapia génica en cáncer	32
6.1.3.1. Terapia a base de genes suicidas.....	34
6.1.4. Vectores virales	37
6.1.5. Vectores no virales	39
6.1.5.1. Complejos entre polímeros catiónicos y ácidos nucleicos (poliplejos)	41
6.1.5.2. Quitósán como material en el desarrollo de vectores no virales.....	43
6.1.5.3. Ligandos y péptidos cariofílicos como estrategias para mejorar la transfección.....	49
6.1.5.4. Coacervación compleja para la formación de nanopartículas.....	53
6.1.5.5. Toxicidad de nanopartículas a base de quitósán	55
6.2. Evaluación eficacia terapéutica <i>in vitro</i>	57
6.2.1. Transfección celular	57
6.2.2. Viabilidad celular	60
6.2.2.1. Ensayo de reducción de MTT	62
7. Metodología	64
7.1. Preparación del quitósán para su utilización	64

7.2. Generación de bacterias competentes.....	64
7.2.1. Formación de bacterias competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	64
7.2.2. Generación de bacterias competentes de <i>Escherichia coli</i> TOP10	64
7.3. Transformación del plásmido pSELECT-zeo-HSV1tk en <i>Escherichia coli</i>	64
7.3.1. Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> DH5 α y TOP10.	64
7.3.2. Propagación de las bacterias transformadas.	64
7.4. Extracción y purificación del plásmido.	65
7.4.1. Extracción mediante lisis alcalina.	65
7.4.2. Extracción por mega kit QIAGEN ®.	65
7.4.3. Recuperación de las muestras a partir de gel de agarosa.....	65
7.4.4. Tratamiento de las muestras por precipitación salina (Salting out).....	65
7.5. Cuantificación del plásmido	65
7.6. Restricciones enzimáticas con HindIII y EcoRI.....	66
7.7. Evaluación de integridad del plásmido.....	66
7.8. Ensayos de retardamiento del plásmido con péptido cariofílico	66
7.9. Ensayos de retención del plásmido-péptido cariofílico con quitosán.....	66
7.10. Formación de las nanopartículas mediante coacervación compleja	66
7.11. Determinación de potencial zeta y tamaño de partícula.	67
7.12. Microscopia electrónica de barrido para forma de partícula	67
7.13. Estandarización de las condiciones de transfección	67
7.14. Ensayo de seguimiento de internalización de nanopartículas	67
7.15. Ensayos de viabilidad celular para evaluar funcionalidad biológica.....	68
7.15.1. Curva de sensibilidad al ganciclovir en células HeLa y SiHa.....	68
7.15.2. Ensayo de reducción de MTT para evaluar viabilidad celular	68
7.16. Determinación de niveles de expresión de las nanopartículas mediante RT-PCR..	68
7.16.1. Ensayo de transfección para obtención de mRNA	68
7.16.2. Obtención de RNA de las muestras	68
7.16.3. Cuantificación de RNA en las muestras	68
7.16.4. Obtención de CDNA	69
7.16.5. Construcción de los primers y análisis bioinformático.	69

7.16.6. PCR de gradiente T para optimizar la temperatura de fusión (tm) de los cebadores.....	69
7.16.7. RT-PCR	70
7.16.8. Evaluación del amplificado:	70
8. Resultados	70
8.1. Propagación del plásmido pHSV-TK1	70
8.2. Ensayos de retención y retardamiento de las nanopartículas.....	79
8.3. Eficiencia de acoplamiento del ligando GRP a los nanocomplejos.....	83
8.4. Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas obtenido a partir de dispersión dinámica de la luz (DLS).....	83
8.5. Estabilidad de las nanopartículas en función del tiempo	87
8.6. Microscopia electrónica de barrido para observar los nanocomplejos	92
8.7. Estandarización de las condiciones de transfección	92
8.8. Ensayo de seguimiento de nanopartículas con la finalidad de evaluar su internalización	93
8.9. Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT.....	96
8.9.1. Ensayo de sensibilidad al ganciclovir	96
8.9.2. Determinación del efecto de los sistemas en la viabilidad celular	96
8.10. Evaluación de niveles de expresión de la timidina cinasa mediante RT-PCR. 100	
8.10.1. Optimización de la tm de reacción	100
8.10.2. Cuantificación y evaluación del RNA extraído de las células.....	102
8.10.3. Reacción de cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR). 103	
9. Discusión	104
9.1. Propagación del plásmido.....	104
9.2. Determinación de las relaciones de los componentes de los nanocomplejos	111
9.3. Evaluación de las características físicas de los sistemas	115
9.4. Estandarización de la transfección	117
9.5. Ensayos de internalización del plásmido.....	119
9.6. Evaluación de la expresión del gen terapéutico mediante rtPCR	120
9.7. Curva de citotoxicidad del GCV	121

9.8. Viabilidad celular por reducción de MTT	122
10. Conclusiones	126
11. Perspectivas.....	127
12. Bibliografía	127
13. Anexos	134
Anexo 1. Composición de las soluciones empleadas.	134
Anexo 2. Volúmenes utilizados para los ensayos de retardamiento y retención.....	135
Anexo 3. Volúmenes de nanopartículas empleados en la determinación de características físicas y biológicas.....	137
Anexo 4. Gel de referencia ensayos de retardamiento	138
Anexo 5. Cálculo de eficiencia de acoplamiento de GRP	139
Anexo 6. Primer´s para RT-PCR.....	139
Anexo 7. Tablas generadas del análisis estadístico DLS y potencial zeta	139
Anexo 8. Tablas generadas del análisis estadístico de los ensayos de reducción de MTT	143

Índice de tablas

Tabla 1. Algunas de las enfermedades hereditarias que son susceptibles a la terapia génica.	25
Tabla 2. Algunos sistemas de genes suicidas utilizados en la terapia génica.....	36
Tabla 3. Características de los péptidos cariofílicos empleados en la formación de las nanopartículas.....	66
Tabla 4. Programa de PCR de gradiente T utilizado para la optimización de la tm.....	69
Tabla 5. Concentración del stock de plásmido pHSV-TK resuspendido.	70
Tabla 6. Solución de plásmido a partir de la purificación por el mega kit de QIAGEN. 71	
Tabla 7. Concentración de plásmido de DNA concentrado.	72
Tabla 8. Concentración de plásmido extraído mediante lisis alcalina a diversos tiempos de incubación.....	74
Tabla 9. Concentraciones de plásmido obtenido mediante mega kit QIAGEN.	75
Tabla 10. Concentración plásmido de TOP10 obtenidas mediante lisis alcalina.	75
Tabla 11. Resultados de la cuantificación de pHSV-1tk proveniente de las bacterias TOP10.....	76
Tabla 12. Purificación de DNA mediante el kit QIAQuick Gel Extraction Kit a partir de gel de agarosa 1%.....	77
Tabla 13. Cuantificación de las muestras después de realizar precipitación salina.....	77
Tabla 14. Índices de polidispersión de cada uno de los sistemas en las diferentes mediciones.....	86
Tabla 15. Resultados prueba t de student para datos con varianzas desiguales.	87
Tabla 16. Índices de polidispersión de los sistemas en función del tiempo	91
Tabla 17. Resultados prueba t de student para datos con varianzas desiguales del porcentaje de viabilidad.....	97
Tabla 18. Resultados prueba t de student para datos con varianzas desiguales del porcentaje de viabilidad.....	99
Tabla 19. Concentración y relación 260/280 del RNA extraído de las líneas celulares HeLa y SiHa.	102
Tabla 20. Concentración y relación 260/280 del cDNA obtenido a partir del RNA.....	103
Tabla 21. Volúmenes empleados para la preparación de las diluciones a utilizar en los ensayos de retardamiento y retención.....	136

Tabla 22. Datos para la preparación de las soluciones utilizadas en los ensayos de retardamiento.....	136
Tabla 23. Volúmenes que fueron tomados para la preparación de soluciones de los péptidos cariofílicos para los ensayos de retención.....	136
Tabla 24. Volúmenes que fueron tomados para la preparación de soluciones de los péptidos cariofílicos para los ensayos de retención.....	137
Tabla 25. Preparación de las soluciones de quitosán para los ensayos de retención.	137
Tabla 26. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para el tamaño de partícula.	139
Tabla 27. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para potencial zeta.....	140
Tabla 28. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para el índice de polidispersión.....	142
Tabla 29. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas con/sin GCV.	143
Tabla 30. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas sin GCV.	144
Tabla 31. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas con GCV.....	145
Tabla 32. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas con/sin GCV.	146
Tabla 33. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas sin GCV.	147
Tabla 34. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas con GCV.....	148
Tabla 35. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas con GCV contra el control de GCV.....	149

Índice de figuras

Figura 1. Ejemplo de terapia génica ex vivo del receptor LDL para tratar la hipercolesterolemia familiar monogénica.	27
Figura 2. Ejemplo de terapia génica in vivo del inserto que codifica al regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).....	28
Figura 3. Terapia de genes suicidas.....	35
Figura 4. Mecanismo de la transformación de la quitina en quitosán.	45
Figura 5. Efecto esponja de protones.	50
Figura 6. Mecanismo de la reducción de MTT en formazán.	63
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1% para la evaluación de integridad del stock del plásmido.....	71
Figura 8. Electroforesis de las soluciones purificadas de plásmido.	72
Figura 9. Electroforesis de la muestra de plásmido concentrado.	73
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de las lisis alcalinas en distintos tiempos de incubación.....	74
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1% del plásmido obtenido mediante lisis alcalina.....	75
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1% de pHSV-1tk purificado a partir de las bacterias TOP10 de las alícuotas 3 y 6 (tabla 11).....	76
Figura 13. Electroforesis de muestras 3 y 5 (Tabla 13) después de realizarse la precipitación salina.	78
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1% de las muestras, 1, 2, 4 y 6 (Tabla 13) después de hacerse la precipitación salina.....	78
Figura 15. Restricción enzimática del plásmido pHSV-TK1 con EcoRI y HindIII.....	79
Figura 16. Ensayo de retardamiento con la finalidad de evaluar la interferencia por proteínas.....	79
Figura 17. Ensayo de retardamiento entre el plásmido pHSV-TK y los péptidos cariofílicos 1 y 2.	80
Figura 18. Ensayo de retención de los complejos pDNA/péptido cariofílico y quitosán.	81
Figura 19. Ensayo de retención con las concentraciones aumentadas de quitosán.	82
Figura 20. Efecto del pH en la retención del pDNA.	82

Figura 21. Barrido espectral (300-800 nm) de los complejos entre nanopartículas y GRP.	83
Figura 22. Gráfico de las determinaciones de tamaño de los complejos.....	84
Figura 23. Gráfico de las mediciones de potencial zeta de las diferentes muestras.	85
Figura 24. Determinación de tamaño y potencial zeta de complejos formulados con GRP.	86
Figura 25. Gráfico de tamaño de los complejos al mes de la preparación de las muestras.	88
Figura 26. Gráfico de tamaño de los complejos a los tres meses de la preparación de las muestras.....	89
Figura 27. Gráfico del potencial zeta de los sistemas tras el transcurso de un mes.	90
Figura 28. Gráfico del potencial zeta de los sistemas tras el transcurso de tres meses. ..	91
Figura 29. Microfotografías de las nanopartículas tomadas por microscopia electrónica de barrido.	92
Figura 30. Expresión de GFP con y sin suero evaluada por microscopia de fluorescencia.	93
Figura 31. Microfotografía de un campo de células del sistema con nanopartículas sin péptido cariofílico.....	93
Figura 32. Internalización de las nanopartículas con el péptido cariofílico 1 en células SiHa a lo largo del tiempo.....	94
Figura 33. Internalización de las nanopartículas con el péptido cariofílico 2 en células SiHa a lo largo del tiempo.....	95
Figura 34. Internalización de las nanopartículas en la línea celular HeLa.....	96
Figura 35. Sensibilidad de líneas celulares de cáncer cervicouterino a diferentes concentraciones de GCV.....	96
Figura 36. Porcentaje promedio de viabilidad de cada una de las condiciones experimentales en las líneas celulares SiHa y HeLa.....	97
Figura 37. Segundo ensayo de reducción de MTT para cada una de las condiciones experimentales en células HeLa y SiHa.....	99
Figura 38. Electroforesis PCR gradiente T primers HSV-TK.....	101
Figura 39. Electroforesis gradiente T primers actina	102
Figura 40. rtPCR de los sistemas.....	103

Figura 41. Efecto del pH sobre la retención del DNA y la formación de complejos con neurotensina.....	112
Figura 42. Gel de retardamiento para el plásmido de pEGFP evaluando diferentes concentraciones de péptido cariofílico.	138

Abreviaturas

% GC	Porcentaje de guanina y citocina
°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
Abs	Absorbancia
ATP	Adenosín trifosfato
cap	Proteínas estructurales virales
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CFATA	Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada
CFTR	Regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Dióxido de carbono
DA	Grado de acetilación
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DD	Digestión enzimática doble
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DL50	Dosis letal 50
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dnTP	Nucleósido trifosfato
DO	Densidad óptica
DP	Grado de polimerización
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Enfermedades congénitas del metabolismo
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
endA	Endonucleasa 1
env	Proteína de envoltura viral
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos

gag	Antígeno específico de grupo
GCV	Ganciclovir
GCV-3P	Ganciclovir trifosfato
GDP	Guanosina difosfato
GlcN	N-glucosamina
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
GRAS	Reconocido generalmente como seguro
GRP	Péptido liberador de la gastrina
GTP	Guanosina trifosfato
hEF1-HTLC	Promotor del virus de la leucemia de células T
HSV-TK	Timidina cinasa del virus del Herpes simple
IDT	Tecnologías de DNA integrado [™]
IL-2	Interleucina 2
INEGI	Instituto nacional de estadística y geografía
IPD	índice de polidispersión
iRNA	Ácido ribonucleico de interferencia
kDa	Kilodaltons
kg	Kilogramos
LB	Luria Bertani
LDH	Lactado deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Lec	Lectura
MDR1	Mutación de resistencia a múltiples fármacos 1
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTS	3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboimetoxi-phenil]-2-[4-sulfophenil]-2H-tetrazolio
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
mV	Milivoltios
N/P	Relación de cargas
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOH	Hidróxido de sodio

NaSO ₄	Sulfato de sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ng	Nanogramos
NLS	Señales de localización nuclear
nm	Nanómetros
NoP	No péptido
NoT	No tratamiento
NPC	Complejo de poros nucleares
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
ori	Origen de replicación
p/v	Porcentaje peso/volumen
P1	Péptido cariofílico 1
P2	Péptido cariofílico 2
pb	Pares de bases
pDNA	Plásmido de ácido desoxirribonucleico
pEGFP	Plásmido de la proteína verde fluorescente mejorada
PES	Fenazina etil sulfato
pH	Potencial de hidrogeno
pHSVTK	Plásmido de la timidina cinasa del virus del herpes simple
pKa	Constante de disociación
PMS	Fenazina metil sulfato
PNA	Ácidos peptidonucleicos
pol	Polimerasa
RanGAP1	Proteína de activación de la Ran GTPasa 1
RanGEF	Factor de intercambio de nucleótido Ran guanina
recA	Recombinasa 1
rep	Proteínas implicadas en la replicación viral
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SD	Digestión enzimática simple
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
siRNA	Ácido ribonucleico silente

SiT	Si tratamiento
SPDP	Succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato
ssRNA	RNA de cadena sencilla
SV40 pAn	Señal de poliadenilación tardía del virus de simio 40
T0	Tiempo cero
Ta	Temperatura de alineamiento
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Tm	Temperatura de hibridación
TPP	Trifosfato pentasódico
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WST-1	Sal de tetrazolio soluble en agua
XTT	2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfophenil)-2H-Tetrazolio-5-Carboxanilida
zeo	Zeocina

1. Resumen

La terapia génica como estrategia terapéutica puede ejercer su acción en diferentes sitios celulares empleando diversos mecanismos, entre los que se encuentran los sistemas suicidas. Los cuales codifican para proteínas que realizan la conversión de un metabolito no tóxico a su forma tóxica, y como consecuencia generan la muerte de la célula. Esta estrategia facilita el efecto terapéutico específico al poderse direccionar la entrega del material genético, la cual es una enorme ventaja sobre los esquemas tradicionales de tratamiento del cáncer, que a pesar de los esfuerzos continúan siendo bastante inespecíficos.

Resulta vital facilitar la entrada del material genético al interior de la célula debido a la existencia de diversas barreras que impiden el paso de los ácidos nucleicos y como consecuencia inhiben su potencial efecto terapéutico. Con este fin, se han diseñado vectores tanto de origen viral como no viral. Particularmente, los vectores no virales se componen de una gran diversidad de biomateriales (mayormente de naturaleza catiónica), entre los que se encuentra el quitosán. El quitosán al ser un biopolímero catiónico cuenta con la capacidad de interactuar electrostáticamente con los ácidos nucleicos. Interacción que brinda un efecto protector sobre nucleasas al compactar el DNA, además de que permite la interacción y fusión con la membrana celular, así como el escape del endolisosoma, siendo estas dos últimas barreras las más importantes cuando se ingresan ácidos nucleicos a la célula. Los vectores no virales cuentan con una serie de ventajas que los convierten en una gran herramienta para terapia génica, estas virtudes no deben

eclipsar una de sus principales desventajas y es que presentan una transfección menor al ser comparados con los vectores de naturaleza viral, lo cual es una consideración importante al momento de elegir un vector. La transfección en los vectores no virales puede ser mejorada empleando diversas estrategias, entre las que se encuentra el uso de ligandos de receptores sobrexpresados en la célula diana, y el uso de péptidos con secuencias de localización nuclear que buscan facilitar la entrada de los complejos al interior del núcleo celular.

En el presente trabajo se construyeron vectores no virales a base de quitosán que fueron ensamblados por el método de coacervación compleja, siendo la formulación de estos complejos: plásmido terapéutico (pHSVTK), péptido cariofílico (evaluándose dos diferentes péptidos), GRP (péptido liberador de la gastrina) el cual es un ligando contra receptor sobreexpresado en diversas células tumorales y el quitosán. Se determinaron mediante ensayos de retención electroforética las relaciones adecuadas de quitosán (material protector) y péptido cariofílico (potenciador de la transfección), que garantizaron las características físicas óptimas de los complejos (tamaño > 100 nm, carga de superficie positiva y conformación esférica). Evaluándose el tamaño de los complejos (dispersión dinámica de la luz), carga de superficie (velocimetría acoplada a laser Doppler) y su morfología (microscopía electrónica de barrido), siendo estos adecuados tanto en presencia de péptidos, GRP o en ausencia de ambos.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de las nanopartículas se hicieron determinaciones del comportamiento de los complejos en función del tiempo. A estos sistemas se les midió tanto el tamaño y carga de superficie, observándose que los complejos se mantienen estables tras un mes, aunque pierden su estabilidad tras un periodo de tres meses, degradándose los sistemas al transcurrir este tiempo.

Por otra parte, se estudió la función biológica de los complejos al confirmar su habilidad para introducirse a células de cáncer cervicouterino (HeLa y SiHa), con ayuda de estudios de internalización empleando complejos marcados con yoduro de propidio, y evaluando la expresión del gen terapéutico mediante la determinación de la presencia del transcrito del gen usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) confirmándose la transcripción tanto en los sistemas con péptido cariofílico como sin él, aunque en menor medida. Habiéndose ratificado la transcripción, se evaluó el efecto de los complejos sobre la viabilidad, siendo más pronunciado en los tratamientos sobre la línea celular HeLa y encontrándose que en presencia/ausencia de péptido cariofílico y presencia/ausencia del ligando GRP se presenta una disminución considerable de la viabilidad celular. Para la línea celular SiHa se encontró que los sistemas GRP y péptido 2 disminuyen significativamente la viabilidad, siendo la única condición ineficaz los complejos sin señales NLS ni ligando en donde si se ve reducida la viabilidad, pero de forma no

significativa. La efectividad, reflejada por los porcentajes de viabilidad de las condiciones (en orden descendente) es: GRP (55.2% y 65.2%), péptido 2 (30% y 73.9%) y sistemas control (sin mejora) (64.6% y 83.3%) en las líneas HeLa y SiHa respectivamente.

2. Introducción

En los últimos años, ha surgido un concepto de especial interés tanto para la comunidad científica como para la sociedad en general, la terapia génica. Resulta fundamental definir a la terapia génica para tener un acercamiento mucho más objetivo y de esa manera comprender el enorme potencial que está representando para el tratamiento de enfermedades tan importantes y mortales, como es el cáncer.

Se puede definir a la terapia génica como las estrategias que se utilizan para “vehicular” material genético al interior de las células “blanco”, con la intención de lograr modular la expresión de proteínas modificadas o que provengan de otras especies, con la finalidad de revertir un trastorno biológico (Ronchera & González, 2002). Esta estrategia terapéutica se rige por diversas clasificaciones, acorde al procedimiento de entrada al hospedador (*ex vivo* o *in vivo*) o a la naturaleza del vector (viral o no viral) (Vera Lastra, 2006).

Los vectores virales han sido los más estudiados y empleados debido a que proporcionan una serie de ventajas entre las que se encuentran: presentar una eficiencia de transfección elevada (el procedimiento de internalizar ácidos nucleicos foráneos en una célula con el objetivo de generar “células modificadas”), estabilidad, mayor cantidad de información disponible debido a su amplio estudio y uso, aunado a una alta expresión del gen de interés. Pese a lo anteriormente mencionado, estos vectores cuentan con desventajas que los convierten en una elección cuanto menos “peligrosa”: son capaces de generar efectos tóxicos en el hospedero, presentan un control de calidad complicado por características inherentes de los virus, entregan una pequeña cantidad de material genético debido a la región casete y desencadenan un efecto indeseado por parte de la respuesta inmune (el contacto previo con virus del mismo tipo utilizado como vector genera una decaída en la eficacia terapéutica) (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

Por otro lado, los vectores no virales como su nombre lo indica presentan una naturaleza diferente a los virus; de manera general cuentan con una carga catiónica, usándose para su formación polímeros o liposomas. Estos vectores cuentan con una serie de inconvenientes que pueden ser sorteados mediante diversas estrategias, pero, aun así, deben ser considerados: presentan bajos niveles de transfección, probable reducción de su actividad biológica debido a componentes del suero y su aparente disposición a agregarse. Previamente se mencionó la capacidad de evitar estos quebrantos, por ejemplo, la actividad biológica no puede ser afectada por los componentes del suero siempre y cuando se utilicen

concentraciones molares óptimas que protejan al ácido nucleico permitiendo que este sea envuelto completamente por el material del vector. La agregación se evita mediante la determinación de la carga de superficie con la finalidad de asegurarse de que las partículas cuenten con carga y que esta a su vez las haga repelerse, así como la integración de procesos de conservación como la liofilización. Es posible aumentar la eficiencia de transfección mediante la adición de péptidos cariofílicos y/o ligandos específicos de receptor, así como la optimización del tamaño y forma del vector, facilitándose de esta manera la internalización a nivel de las diferentes membranas. Ahora, entre sus ventajas se encuentra la capacidad de transportar una gran cantidad de material genético en contraste de los vectores virales, su amplia versatilidad fisicoquímica, facilidad de escalamiento en procesos industriales, seguridad (la gran mayoría de biomateriales son inocuos para los organismos vivos), bajos costos y una baja (o nula) respuesta inmune indeseada (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

3. Definición del problema y justificación

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, aproximadamente 442 personas de cada 100,000 son diagnosticadas de algún tipo de cáncer anualmente, y aunque pareciera ser una proporción menor, la Organización Mundial de la Salud reportó que, durante el año 2020, 10 millones de muertes fueron causadas por esta enfermedad, correspondiendo a una sexta parte de los casos que fueron registrados (OMS, 2022). Hablando particularmente de nuestro país el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) indica que se presentaron 683,823 defunciones durante el mismo año (INEGI, 2021). El principal problema asociado al cáncer y como subsecuente aumento de muertes causadas por éste, corresponde al inicio tardío del tratamiento, el cual puede tener su origen en la aparición de síntomas hasta que la enfermedad se encuentra en estadios muy avanzados o en la búsqueda de atención médica no inmediata (INSP, 2020). El diagnóstico no es el único problema. En lo referente al tratamiento, resulta bastante obvio concluir que el inicio tardío es la principal complicación, pero no es la única. Las opciones de tratamiento disponibles cuentan con una serie de desventajas que deben ser debidamente tomadas en cuenta. Cuando hablamos del cáncer, las principales opciones (además de la resección quirúrgica) son la radioterapia combinada con la quimioterapia; estas terapias dañan a las células cancerosas de forma tal que evitan que se dividan, siendo esta opción la más efectiva hasta el momento, ya que consigue eliminar a las células tumorales, aunque de forma poco específica, lo que es considerado el principal inconveniente de esta terapia, pues tiene efectos secundarios considerables (Mieloma España, 2012). Efectos secundarios que según la Sociedad Americana del Cáncer abarcan desde cansancio, caída del cabello, anemia,

ulceras en boca, lengua y garganta, entumecimiento y dolor de músculos y nervios, cambio de color en piel y uñas, problemas renales, reducción en la concentración y hasta problemas de fertilidad (American Cancer Society, 2019). Otra complicación por considerar es la inestabilidad cromosómica de las células neoplásicas, esta inestabilidad desencadena una variación genómica masiva que actúa como mecanismo adaptativo que permite que las células cancerosas tengan una variedad de genotipos bastante amplia. La variedad de genotipos desencadena, a su vez, resistencia a la quimioterapia por mecanismos de resistencia innata, resistencia adquirida o de forma adaptativa, lo que condiciona la terapia, encontrándose que en un tumor existen células sensibles a determinados fármacos y otras resistentes a los mismos (McClelland, 2017).

Tomando esto en cuenta, la terapia génica cuenta con el potencial de convertirse en una gran alternativa ya que puede brindar el efecto terapéutico con una elevada especificidad celular la cual está asociada al vehículo empleado para introducir el inserto, que no es brindada por el resto de los esquemas de tratamiento. De esta forma se eliminan la mayoría de los efectos tóxicos que la falta de especificidad celular conlleva y que ya se citaron previamente.

Dadas las ventajas del uso de vectores no virales, en el presente trabajo se plantea el uso de nanopartículas a base de quitosán de bajo peso molecular y un plásmido que contiene un gen terapéutico suicida (timidina cinasa del virus del herpes simple), con la incorporación de péptidos cariofílicos y un ligando (GRP), estos últimos tienen como finalidad aumentar y dirigir la transfección; de igual forma se busca evaluar su efecto en la viabilidad celular *in vitro* en dos líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa y SiHa), y determinar de esa manera su potencial uso en el tratamiento del cáncer.

4. Hipótesis

Al transfectar las líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa y SiHa) con nanopartículas ensambladas por coacervación compleja entre quitosán y el plásmido terapéutico con o sin péptidos cariofílicos y ligando GRP, estas células presentarán una expresión considerable del gen suicida (HSV-TK1) y una subsecuente reducción de la viabilidad de las células tumorales posterior a la administración del profármaco ganciclovir.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Desarrollar, evaluar y optimizar nanopartículas a base de quitosán utilizando el plásmido pSELECT-zeo-HSV1tk mediante coacervación compleja como estrategia de terapia génica contra el cáncer cervicouterino *in vitro*.

5.2. Objetivos particulares

- Transformar el plásmido pSELECT-seo-HSV1tk en la cepa de *E. coli* TOP10 con la finalidad de generar un banco de trabajo como fuente ilimitada del plásmido terapéutico.
- Propagar y aislar el plásmido pSELECT-seo-HSV1tk mediante el Mega Kit Qiagen® para su cuantificación y evaluación de integridad.
- Determinar las relaciones molares óptimas de los componentes de las nanopartículas mediante electroforesis en gel de agarosa, para garantizar su correcto ensamblaje.
- Obtener el tamaño de partícula y carga de superficie de las nanopartículas por dispersión dinámica de la luz con la finalidad de determinar si estos son los óptimos.
- Determinar la forma física de las nanopartículas por microscopía electrónica de barrido para garantizar que estas sean esféricas.
- Asegurar la internalización de los complejos empleando un marcaje del plásmido con yoduro de propidio comprobando así su capacidad de entrar a las células.
- Confirmar la expresión los complejos midiendo los niveles de mRNA del gen terapéutico mediante RT-PCR en dos líneas celulares de cáncer cervicouterino.
- Evaluar la funcionalidad biológica de las nanopartículas y el efecto que la presencia de dos péptidos cariofílicos y un ligando tienen sobre ella, midiendo la viabilidad celular por reducción de MTT en células HeLa y SiHa.

6. Antecedentes

6.1. Terapia génica

La información genética localizada en el interior de las células contiene las instrucciones necesarias para la realización de sus funciones. Algunas de las enfermedades del *Homo sapiens* tienen su origen en alteraciones de esta información que como consecuencia causan la deficiencia en la función o concentración de proteínas específicas, desencadenando, por ejemplo, las llamadas enfermedades congénitas del metabolismo (ECM). Estas proteínas pueden tener diversas funciones: enzimáticas, hormonales, receptor-transportador de membrana celular o componentes de organelos celulares (el

lisosoma, las mitocondrias y el peroxisoma son algunos ejemplos) (Sanjurjo, Baldellou, Aldámiz-Echevarría, & et al., 2008).

En años recientes ha sido posible modificar la dotación genética celular, al introducir un gen o el producto de la transcripción de este en el organismo diana, con la finalidad de sustituir un gen defectuoso o de introducir uno nuevo con función terapéutica. Al conjunto de técnicas que permiten vehicular al DNA o RNA con la intención de modular la expresión de proteínas “alteradas” para revertir un trastorno biológico se le conoce como terapia génica (Ronchera & González, 2002).

Es necesario hacer una distinción de lo anteriormente dicho, pues la terapia génica no solo permite corregir las deficiencias observables en el fenotipo de enfermedades de origen hereditario como lo son las ECM, sino que, a su vez, permite el tratamiento de trastornos adquiridos durante la vida del paciente.

Esta tecnología ha sido aplicada para el tratamiento de diferentes enfermedades de origen: hereditario, infeccioso, autoinmunitario, entre otros (como las infecciones). En años recientes se han hecho diversos esfuerzos en la creación de diversos protocolos de tratamiento de aquellas de las enfermedades que ya sea, que afectan a un gran número de personas o que por su patogenia llevan al paciente incluso a la muerte, algunas de estas enfermedades se encuentran citadas en la tabla 1, señalándose el blanco terapéutico para cada una de ellas. Es necesario hacer la aclaración de que esta técnica, no se utiliza únicamente como tratamiento de enfermedades, pues diversas tecnologías han sido desarrolladas para su empleo en aspectos preventivos y/o diagnósticos (Vera Lastra, 2006).

Tabla 1. *Algunas de las enfermedades hereditarias que son susceptibles a la terapia génica.*

Enfermedad	Gen defectuoso
Inmunodeficiencia combinada grave	Adenosina deaminasa
Citrulinemia	Argininosuccínico sintetasa
Enfisema	α -1-antitripsina
Deficiencia de adhesión leucocitaria	CD-18
Fibrosis quística	Regulador transmembranal
Hemofilia B	Factor IX
Fucosidosis	α -L-Fucosidasa
Gaucher	Glucocerebrosidasa

Fragmento de tabla recuperado de: Vera Lastra, 2006.

La terapia génica convencional, de manera general sigue tres principales estrategias que tienen como finalidad generar el efecto terapéutico:

- Sustitución de genes defectuosos, al introducirse una copia “nativa o sana” del gen en las células del hospedero (Clínica Universidad de Navarra, 2020).
- La inhibición del funcionamiento de aquellos genes que favorecen el desarrollo de enfermedades, como lo son los oncogenes que promueven el desarrollo del cáncer (Clínica Universidad de Navarra, 2020).
- Introducción de material genético que tenga como finalidad la síntesis de una proteína terapéutica, por ejemplo, proteínas que obstaculizan la replicación viral o epítomos inmunogénicos de organismos patógenos para el desarrollo de inmunidad mediante vacunas (Clínica Universidad de Navarra, 2020).

6.1.1. Clasificación terapia génica.

Se puede clasificar a la terapia génica en función de distintos factores como, el tipo de célula diana o la estrategia aplicada para la introducción del ingrediente activo al hospedador (Ronchera & González, 2002). Cuando se habla de la clasificación basada en el tipo de célula diana, se clasifica las terapias en:

1. Terapia de células germinales: Esta tiene como objetivo modificar la dotación genética de las células que se encuentran implicadas en la ovogénesis o la espermatogénesis. Al tener estas células como objetivo se tiene la cualidad de poder transmitir estas “modificaciones” a la descendencia, por lo tanto, es utilizada para la corrección de enfermedades del tipo congénito. Debe hacerse la observación que esta no es practicada ampliamente debido a múltiples considerandos éticos referentes a la modificación del acervo genético humano derivando en prácticas de eugenesia (Ronchera & González, 2002).
2. Terapia de células somáticas: Dirigida a la modificación de células no germinales, lo que hace que no pueda ser transmitida a la descendencia y de esa manera no afectando al acervo genético de la especie. Este tipo de terapia génica es permitida por la legislación actual para la realización de protocolos clínicos (Ronchera & González, 2002).

Por otra parte, la clasificación basada en la estrategia de entrada al hospedador se divide en:

1. *Ex vivo*: Compuesta por aquellos protocolos en donde es necesaria la extracción de las células diana del paciente, posteriormente se crecen en cultivo celular y sufren de una transfección *in vitro*, acto seguido, se seleccionan a aquellas que hayan sufrido la “modificación” exitosa y son expandidas en un cultivo celular para ser introducidas nuevamente en el paciente (figura 1). Estos protocolos permiten

mantener un estrecho control del proceso generando una mayor eficacia en la transfección genética. A pesar de esas ventajas, esta modalidad de terapia conlleva una inmensa complejidad, elevados costos y principalmente la imposibilidad de transfectar aquellos tejidos que no son capaces de crecer en cultivo celular. Sin contar que el principal inconveniente de este tipo de terapia involucra la preparación de un producto específico para el paciente lo que dificulta el tratamiento en serie (Ronchera & González, 2002).

2. *In vivo*: Se basa en la entrada del material genético a las células del organismo hospedador de manera que no es necesaria la extracción *in vitro* de las mismas. Este tipo de terapia es en extremo sencilla al ser comparada con las técnicas *ex vivo*, y permite la administración para todos los pacientes que cuenten con la enfermedad. Esta extrema sencillez es pagada con una transfección menor, debido a que, al no controlarse el proceso de transferencia, se genera que la eficacia global sea menor (esto se evita mediante modificaciones del vector) y es complicado asegurar un alto grado de especificidad tisular (la adición de ligandos provoca que este inconveniente desaparezca). El mecanismo de acción de esta terapia es esquematizado en la figura 2. En lo referente a la administración, estas terapias pueden ser suministradas de manera similar a cualquier medicamento (Ronchera & González, 2002).

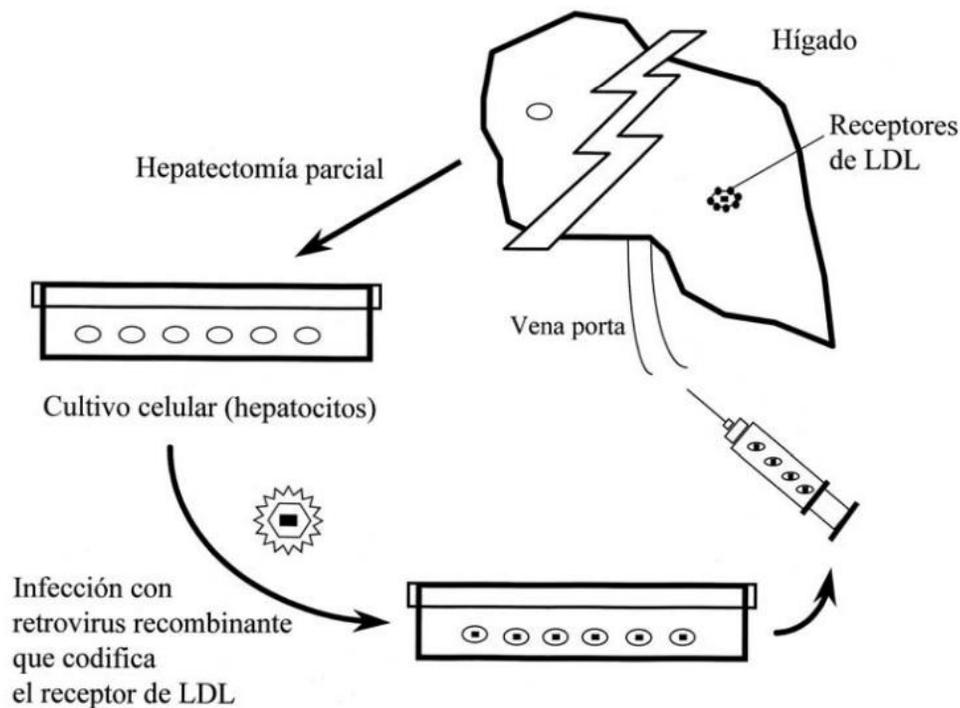


Figura 1. Ejemplo de terapia génica *ex vivo* del receptor LDL para tratar la hipercolesterolemia familiar monogénica.

Imagen recuperada de: Ronchera & González, 2002. Todo comienza al extraerse un segmento del hígado del paciente (hepatectomía parcial), este tejido se coloca en un cultivo celular que tiene

como finalidad la proliferación de los hepatocitos. Los hepatocitos obtenidos del cultivo celular son infectados con un vector viral que contiene la información para codificar al receptor de LDL. Posterior a la infección, se expandieron los hepatocitos que fueron transfectados y estos fueron introducidos dentro del paciente llegando al hígado a través de la vena porta. Y una vez en el hígado estos hepatocitos expresan los receptores de LDL.

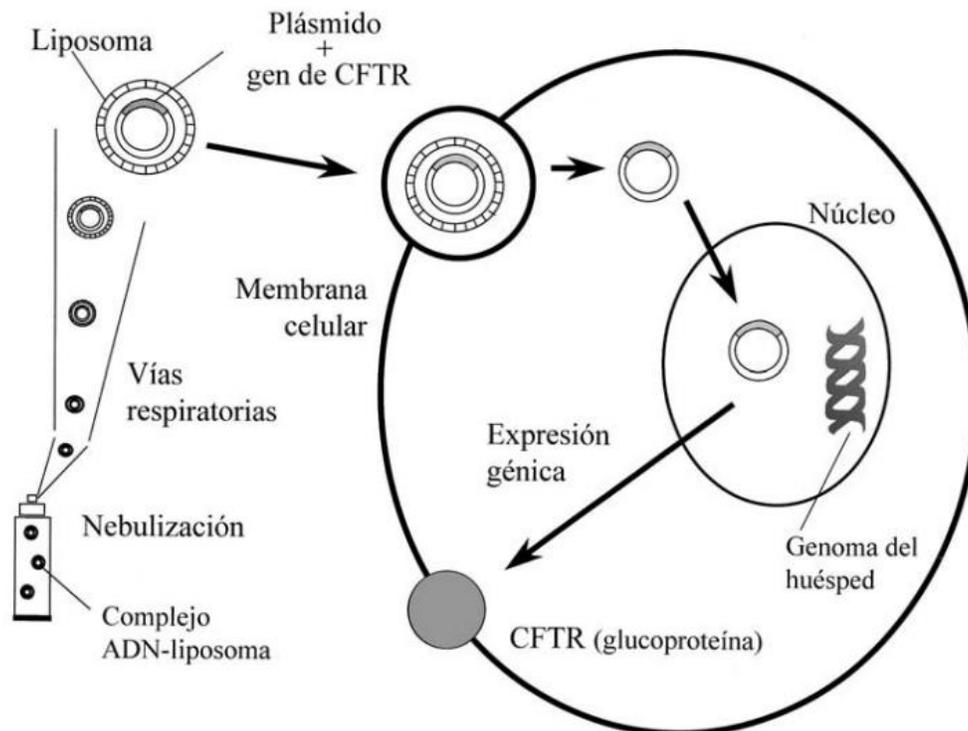


Figura 2. Ejemplo de terapia génica in vivo del inserto que codifica al regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

Imagen recuperada de: Ronchera & González, 2002. El gen CFTR contenido en un plásmido es recubierto por un liposoma generando un complejo DNA-Liposoma que entra al paciente por medio de nebulizaciones y sigue las vías respiratorias para llegar a su célula diana. Al llegar a la célula diana el complejo es internalizado por endocitosis y entra al citoplasma, dentro del citoplasma el inserto llega al núcleo celular ya liberado del complejo. Dentro del núcleo celular el plásmido es expresado y traducido para generar el CFTR.

Para las estrategias *in vivo* resulta crucial considerar la serie de barreras físicas y bioquímicas que el material genético se ve en la necesidad de atravesar para llegar a su sitio de acción:

- Presencia de nucleasas en el ambiente extracelular, las cuales son capaces de degradar el material genético independientemente de la vía de administración (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).
- Membrana plasmática y nuclear. La entrada a la membrana celular es un inconveniente para los ácidos nucleicos, pues estos son macromoléculas. Para este

fin es necesario el uso de procedimientos o vehículos que faciliten el paso a través de éstas, sucediendo ya sea por fusión del vehículo con la membrana, endocitosis, permeabilización o desestabilización de la membrana celular. Por otro lado, la membrana nuclear cuenta con una serie de poros de un tamaño aproximado a los 80 nanómetros, ante esta situación, ciertos vectores se han diseñado para actuar en células en proliferación, debido a que durante la fase M de la mitosis la membrana nuclear se desensambla (Santos, 2009).

- Dificil entrada a las células. El tamaño de los ácidos nucleicos no es el único inconveniente relacionado a la membrana celular, la asociación entre el material genético y la superficie celular es muy complicada debido a la alta densidad de cargas negativas de los nucleótidos y de los proteoglicanos de la membrana celular, lo que hace que el material genético y la célula se repelan mutuamente (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).
- El endotelio vascular como barrera extracelular. Cuando la administración se da por vía intravascular, se suele condicionar la expresión del gen en las células endoteliales. Es posible que el producto transgénico puede llegar a las células diana localizadas fuera de los vasos. En estas ocasiones, el vector debe salir del endotelio, particularmente el discontinuo que presenta espacios entre los 30 y 500 nm, estando esté presente en el hígado, bazo y medula ósea. Esto condiciona a que solo los vectores de tamaño muy pequeño lleguen a los tejidos localizados fuera del endotelio (Santos, 2009).
- El escape del endolisosoma. En caso de que el ácido nucleico consiguiera entrar a la célula por endocitosis, este va a necesitar escapar del endolisosoma, pues dentro de este se encuentran enzimas que degradaran al material genético, y a su vez, el pH al interior del endolisosoma es muy bajo lo que favorece aún más la degradación (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018). Una alternativa reside en evitar la ruta de internalización endolisosomal, con el uso de vectores que usen una vía de entrada diferente a la endocitosis, como puede ser la fusión directa con la membrana plasmática.
- Interacción con componentes del suero. Los vectores no virales al ser menos inmunogénicos dependen para su eliminación de sus características fisicoquímicas, entre las que se destacan el tamaño y la carga de superficie. Cuando se administran partículas con diámetro entre 5-7 μm son eliminadas por filtración capilar a nivel de pulmón. Por otra parte, las partículas con un tamaño menor a este se eliminan mediante el sistema reticuloendotelial. Mientras que, cuando se habla de la carga, las partículas neutras permanecen en circulación por periodos largos, en contraste, las partículas con carga son eliminadas de la circulación con mayor facilidad, estas

partículas tienen tendencia a acumularse en el hígado y son captados por los macrófagos por endocitosis mediada por receptor, o por los macrófagos del bazo. Fenómeno que se encuentra en función de la interacción con proteínas presentes en el suero, lo que induce la formación de partículas grandes y éstas a su vez, son eliminadas (Santos, 2009). Además, en circulación se localizan diversos polianiones que pueden degradar algunos tipos de vectores.

- Acción de la respuesta inmune humoral y/o celular. Esta interviene mayoritariamente cuando se hace uso de vectores virales, y es que estos cuentan con componentes muy inmunogénicos, lo que desencadena la activación de la respuesta inmune y un subsecuente estado inflamatorio (Santos, 2009).

6.1.2. Insertos utilizados en la terapia génica

La administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) define a “las vacunas de DNA” como preparaciones que contienen secuencias de DNA en forma de episoma que son capaces de inducir o promover la respuesta inmune contra un patógeno (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018). La definición anterior resulta algo escueta al tratar de abordar el tema de la terapia génica, pero permite entender el rol que ha tomado esta estrategia terapéutica en la sociedad actual y a su vez contextualizar el desconocimiento general que existe respecto a esta técnica.

La terapia génica no se limita a el uso exclusivo de DNA como “inserto”, y sus mecanismos de acción van más allá de su papel en la modulación de la respuesta inmune, como es mencionado en la definición anterior. Una vez se transfiere el material genético a las células enfermas, este sigue un mecanismo de acción en función de la naturaleza de la sustancia insertada. Cuando el material genético a insertar es DNA, este debe llegar al núcleo celular y dentro de este se realiza la transcripción que usa el DNA como molde para generar una molécula de RNA mensajero (mRNA), esta molécula saldrá del núcleo y llegará a los ribosomas contenidos en el citoplasma en donde será traducida generando la proteína terapéutica (Universidad de Concepción, 2020). Estas moléculas de DNA pueden llegar a integrarse en los cromosomas de la célula o quedar como elementos extracromosómicos (episomas), a continuación, se abordarán estas dos diferentes metodologías a detalle:

1. Genes integrados en cromosomas: La ventaja principal de este método de inserción es que se puede perpetuar la expresión tras la división celular, teniendo de esa forma una expresión a largo plazo. El principal blanco para este mecanismo son las células madre debido a que se encuentran en una división activa, consistiendo estas en una población “inmortal” de células, lo que ofrece la posibilidad de curar trastornos de origen genético. Por otra parte, el principal inconveniente de esta

alternativa es que la inserción puede ocurrir casi al azar, generándose dos posibles escenarios, 1. Nula expresión por inserción en regiones muy condensadas de la cromatina, 2. La muerte de la célula huésped al interrumpirse la secuencia de un gen crucial inactivándolo y el riesgo de cáncer al perturbar los patrones de expresión normal de genes que controlen la proliferación celular. Estas posibilidades pueden evitarse mediante el uso de estrategias *ex vivo*, ya que tienen la capacidad de permitir la selección de las células cuya integración fuese exitosa. Aunado a esto, se puede evitar la inserción al azar al unir el gen terapéutico con secuencias homologas del huésped para favorecer la recombinación en las regiones previamente seleccionadas para la inserción (Ronchera & González, 2002).

2. Genes no integrados (episomas): Son diseñados con la finalidad de quedar como elementos extracromosómicos que cuenten con una expresión elevada (normalmente por contar con promotores de alto número de copias como lo son los promotores de proteínas tempranas virales). En caso de que la célula hospedadora se encuentre dividiéndose activamente es posible una segregación desigual a las células hijas lo que compromete la expresión a largo plazo. Esta estrategia no permite la desaparición de trastornos genéticos debido a que se requeriría un tratamiento repetido para mitigar la sintomatología. Lo cual no es necesariamente malo, debido a que no es necesaria una expresión estable a largo plazo para el tratamiento de muchas enfermedades, como el cáncer, en donde la terapia tiene como finalidad la de eliminar las células tumorales y al ser eliminado el tumor ya no es necesario el gen terapéutico (Ronchera & González, 2002).

El gen terapéutico independientemente de su naturaleza, tiene que estar rodeado de una serie de elementos reguladores que favorecen su expresión: primeramente, una región promotora que se encarga de reconocer el sitio de unión de la DNA polimerasa y por último cuenta con una región terminadora que indica el final de la transcripción, esta región mantiene estable a la molécula de mRNA y facilita el transporte al citoplasma para su posterior traducción (Díaz Granados & Chaparro Giraldo, 2012). Aunado a esto, el DNA puede estar ocupando tres posibles configuraciones topológicas, siendo en orden creciente de compactación: lineal, circular relajada y forma superenrollada, resulta fundamental conocer estas configuraciones debido a que la FDA recomienda que mínimo el 80% de las isoformas de DNA presentes en las vacunas de DNA correspondan a la forma superenrollada, ya que está muestra una eficiencia de transfección mayor en contraste al resto de configuraciones (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).

Por otra parte, el DNA no es el único ácido nucleico que puede ser utilizado en la terapia génica, puesto que el RNA puede ser utilizado para la expresión de las proteínas terapéuticas, usándose específicamente para este fin, el RNA mensajero, el cual llega a los

ribosomas y se traducirá en la proteína de interés, eliminándose de esta forma la internalización nuclear, simplificando en gran medida el proceso. Es necesario hacer distinciones con respecto a la inserción a base de DNA, y es que el mRNA no requiere llegar al núcleo celular para funcionar, lo que corresponde una ventaja crucial en ciertos esquemas terapéuticos. Los principales inconvenientes del uso de mRNA radican en que su estabilidad es mucho menor que la del DNA, sin contar que no se puede conseguir una expresión prolongada del gen terapéutico, aunque estas, dependiendo de los objetivos de la terapia pueden pasar de ser desventajas a ventajas.

Los ácidos nucleicos no se utilizan únicamente con la finalidad de codificar proteínas que estén destinadas a cumplir funciones biológicas, estos pueden ser utilizados para interferir el flujo de información genética lo cual es definido como terapia de interferencia o a base de RNA no codificante (Ronchera & González, 2002).

Este tipo de terapia se divide en tres categorías principales:

- Secuencias antisentido: Estas se unen a hebras de RNA mensajero o precursores nucleares de este. Esta unión se hace mediante complementariedad de bases de los ácidos nucleicos (Ronchera & González, 2002).
- Secuencias antigén: Su objetivo es el DNA de doble hebra, al unirse a él se bloquea la transcripción del gen en contraste de la anterior en donde se bloquea la traducción (Ronchera & González, 2002).
- Ribozimas: Se encargan de hidrolizar las secuencias de RNA mensajero (Ronchera & González, 2002).

La terapia antisentido se diseña ya sea, administrando los oligonucleótidos o en su defecto generando la expresión de ellos al transfectar las células diana. Esta segunda opción proporciona mecanismos adicionales induciendo, por ejemplo, la actividad de la ribonucleasa H y una interferencia en la síntesis de la hebra de DNA complementaria (cDNA). Además, esta estrategia permite la expresión de secuencias antisentido de mayor longitud que tiene como finalidad la de proporcionar más posibilidades de interacción con el mRNA (Ronchera & González, 2002).

6.1.3. Terapia génica en cáncer

La terapia génica no sirve únicamente para tratar los errores congénitos del metabolismo, existen una serie de enfermedades que se encuentran dentro del punto de mira de la terapia génica, entre las que se encuentran: SIDA, enfermedad coronaria, enfermedad arterial periférica, artritis reumatoide y los diferentes tipos de cáncer. Es necesario recalcar que esta estrategia terapéutica no se limita únicamente a estos padecimientos, pues con el

desarrollo de los vectores y el estudio detallado se expandirá a situaciones no clínicamente significativas para el paciente (Clínica Universidad de Navarra, 2020).

Ahora hablemos un poco más acerca del cáncer. Se puede intentar definir al cáncer como una enfermedad de la expresión genética, en donde una serie de productos que no deben estar presentes son expresados y otros cuya expresión resulta crucial para el ciclo celular normal se encuentran silenciados. En la actualidad el cáncer corresponde a la segunda causa de muerte a nivel mundial, ocasionando durante el año 2020 aproximadamente 10 millones de muertes, de estas muertes el 70% se localizan en países con ingresos medianos o bajos (OMS, 2021).

Antes de hablar del uso de la terapia génica para el tratamiento del cáncer, es conveniente hablar del papel de los genes en el desarrollo o inhibición del cáncer.

Primeramente, los oncogenes son genes que generan una proliferación masiva de las células causando una transformación maligna (Ronchera & González, 2002), a primera vista parecería que estos genes no tienen una función para el ser humano y son perjudiciales. Pero a decir verdad estos genes cumplen con una función durante el desarrollo embrionario en donde es necesario que las células se proliferen a una tasa mayor a la que se presenta durante el resto del desarrollo del ser humano, en cuanto esta etapa termina, estos genes son inactivados. Estos son susceptibles de mutar y convertirse en oncogenes generando la aparición del cáncer. Usualmente estos codifican factores de crecimiento, receptores y moléculas implicadas en la transducción de las señales o factores de transcripción (Ronchera & González, 2002).

No todas las señales implicadas en la generación del cáncer son las que hacen avanzar el ciclo celular, también se pueden presentar mutaciones en los genes implicados en la detención del ciclo celular. Los genes supresores de tumores se encargan de inhibir el crecimiento celular y al perderse o inactivarse estos se desencadena la generación del tumor. Se tienen identificados aproximadamente 10 genes con esta función, a diferencia de los casi 100 protooncogenes (Ronchera & González, 2002).

La modificación de estos genes no es necesariamente un evento “anormal”, ya que esto ocurre con suma frecuencia al nosotros estar constituidos por billones de células con una constante exposición a agentes químicos, físicos o biológicos, que cuentan la capacidad de inducir estas alteraciones en el ciclo celular. Considerando esto, resultaría en exceso común la generación del cáncer, pero esto no es así, debido al rol que lleva a cabo el sistema inmune en la eliminación de aquellas células que muestren una señal de alteración en la expresión génica y de esa manera suprimir al potencial tumor. Ahora, si nos cernimos únicamente a esto, es prácticamente imposible el desarrollo del cáncer, cuestión que acorde a los datos poblacionales, sabemos que no es así. Lo que ocurre realmente es que los tumores desarrollados en personas con un sistema inmune “sano” son pobremente

inmunogénicos, o la masa primaria del tumor se localiza en una región del organismo con escaso alcance del sistema inmune o incluso regiones inmunoprivilegiadas.

El cáncer al no tener un origen en un defecto genético congénito necesita para su tratamiento que la terapia génica este orientada a dotar de una nueva “propiedad” a las células malignas con la finalidad de aprovechar determinados aspectos patológicos. Las estrategias más comunes se basan en:

- Aumento de la actividad de células inmunes por citoquinas (inmunopotenciación genética) (Ronchera & González, 2002).
- Vacunas tumorales que consisten en la introducción de antígenos para hacer que las células del sistema inmune sean más inmunogénicas contra ese tumor en particular (Ronchera & González, 2002).
- Uso de terapia silente para bloquear la expresión de oncogenes.
- Introducción de genes supresores de tumores.
- Aplicación de adenovirus oncológicos para la lisis dirigida de tumores.
- Uso de RNA de interferencia para el bloqueo de la traducción de los productos proteicos de los oncogenes sobreexpresados (Ronchera & González, 2002).
- Genes anti angiogénicos para limitar el acceso de nutrientes a los tumores.
- Inserción de genes de resistencia a fármacos y reducir los efectos adversos de la quimioterapia (Ronchera & González, 2002).
- Uso de genes suicidas que proporcionan una sensibilidad a fármacos específicos al activar selectivamente a un profármaco y convertirlo en un componente letal para la célula (Ronchera & González, 2002).

6.1.3.1. Terapia a base de genes suicidas

Para el caso particular de los sistemas suicidas, los sistemas que usan estos genes llevan a cabo su acción terapéutica por la introducción de un gen (generalmente de origen bacteriano o viral) el cual va a mediar la conversión de una sustancia no toxica *per se*, en un compuesto toxico para las células (figura 3) (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

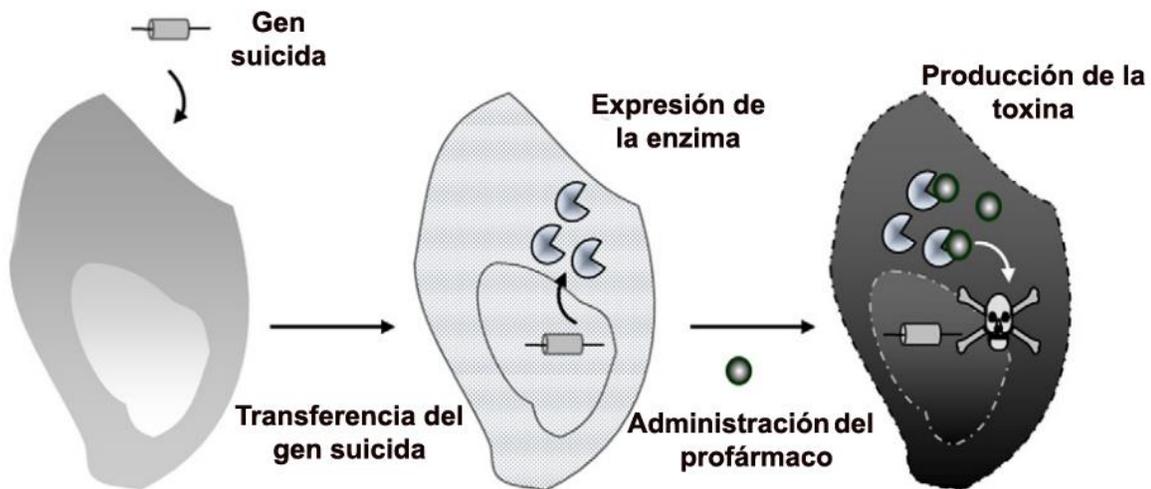


Figura 3. *Terapia de genes suicidas.*

Imagen modificada de: Duarte & Colaboradores. Todo comienza con la introducción en la célula hospedera del gen suicida lo que desencadena la expresión de la enzima terapéutica, la cual al tener acceso al profármaco lo metaboliza y provoca la muerte de la célula.

Ahora, no se puede hablar de los sistemas suicidas sin hablar del efecto “espectador” o “bystander”, el cual se encuentra estrechamente ligado a esta estrategia terapéutica. Este efecto se denomina espectador debido a que hace referencia a aquellas células que no fueron transfectadas por el vector exógeno introducido mediante estrategias *in vivo*, siendo éstas meras espectadoras de la terapia y a pesar de ello sufren sus consecuencias. En la práctica se han logrado tipificar dos tipos de efecto espectador, el local y el distante. El efecto espectador local afecta, como su nombre lo indica, a las células cercanas a la transfectada, siendo éste responsable de la regresión del tumor a pesar de que la eficiencia de transfección no sea del 100% (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012). Existen diversas hipótesis que podrían explicar la muerte de estas células, la difusión pasiva de la toxina, liberación de factores solubles, la endocitosis de vesículas apoptóticas, transporte del fármaco activado a través de uniones gap o la estimulación del sistema inmune (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

Por otra parte, el efecto espectador distante afecta a aquellas células tumorales lejanas a aquellas que expresan el gen suicida. Se piensa (a raíz de la presencia de linfocitos T infiltrados dentro de los tumores) que este efecto se da por la acción del sistema inmune, aunque como mecanismo adyacente se sospecha que la liberación de factores solubles contribuye al efecto antitumoral distante (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

Múltiples investigaciones han demostrado que los sistemas suicidas presentan sinergismos con otros sistemas a base de genes y con las terapias convencionales para el tratamiento del cáncer (radioterapia y quimioterapia). Dentro de las terapias combinadas a base de

genes, se ha encontrado un aumento de la actividad antitumoral al combinarse genes suicidas con RNA de interferencia (iRNA), así como la coexpresión de genes estimulantes de la respuesta inmune como las citosinas (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

Los sistemas suicidas han sido ampliamente estudiados, pues constituyen una potente herramienta importante para la terapia génica, permitiendo que el efecto terapéutico (que para este sistema constituye la muerte celular) sea llevada a cabo por la misma célula, algunos de los sistemas suicidas más utilizados se enlistan a continuación:

Tabla 2. Algunos sistemas de genes suicidas utilizados en la terapia génica.

Enzima	Profármaco	Fármaco
Timidina cinasa del virus del herpes simple	Ganciclovir (GCV)	Ganciclovir trifosfato (GCV-3P)
Citosina desaminasa de <i>Escherichia coli</i>	5-Fluorocitosina	5-Fluorouracilo
Nitroreductasa de <i>Escherichia coli</i>	5-Arizidinil-2,4-dinitrobenzamida	5-(Aziridinil)-4-hidroxilamina-2-niobenzamida
Purina nucleósido fosforilasa de <i>Escherichia coli</i>	6-Metilpurina-2-deoxiribosidasa	6-Metilpurina

Fragmento de tabla recuperado de: Duarte & Colaboradores, 2012.

Entre los sistemas más estudiados, están aquellos que utilizan a la timidina cinasa y a la citosina desaminasa del virus del herpes simple y *Escherichia coli*, respectivamente. El sistema que será abordado a profundidad en el presente trabajo es el sistema de la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK).

Este sistema metaboliza al ganciclovir y lo convierte en ganciclovir trifosfato, compuesto que es un análogo de la desoxiguanosina trifosfato la cual se encarga de inhibir a la DNA polimerasa y al añadirse a la cadena de DNA causa la terminación de la replicación y como consecuencia, la muerte de la célula. Está demostrado que la incorporación de este compuesto en la cadena de DNA causa un retraso de la fase S y un arresto en la fase G2 por la activación de la exonucleasa 3' y la activación de mecanismos de reparación post-replicativos por endonucleasas. Este arresto celular desencadena la apoptosis de las células transfectadas por el sistema HSV-TK consiguiéndose de esta manera el efecto terapéutico (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

Este sistema es incapaz de difundir de manera pasiva, por ende, el efecto espectador local se da por rutas diferentes. Se ha observado la necesidad de conexiones célula-célula para que en este sistema se presente el efecto, por lo que se sobreentiende que se da mediante uniones gap, lo que se comprueba al comparar el efecto en células con genes de conexina o en ausencia de ellos (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

En adición, se ha encontrado que el coexpresarse cadherina E la acción antitumoral se ve potenciada a comparación de la expresión única de la timidina cinasa. Otros estudios han demostrado la acción de este efecto por cuerpos apoptóticos y la acción de factores solubles (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

Dentro de esta sección se mencionó la capacidad de esta estrategia terapéutica de potenciarse al hacerse combinaciones con otras terapias. Particularmente, el sistema HSV-TK se ve potenciado al mezclarse con el RNA de interferencia MDR1 el cual ha mostrado el aumento de la sensibilidad contra fármacos anticáncer. A su vez, la coexpresión del gen de la interleucina 2 (IL-2) ha demostrado aumentar la apoptosis de las células tumorales (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

6.1.4. Vectores virales

Los genes son transferidos a la célula por medio de vectores; estos facilitan la transferencia de genes exógenos a la célula y su biodisponibilidad intracelular. Estos vectores como se mencionó en apartados anteriores se dividen en vectores virales y no virales.

Los vectores virales involucran una transferencia facilitada por los componentes del virus empleado como vehículo, la razón de esto se encuentra en que los virus están capacitados biológicamente para introducirse a las células diana con una alta eficacia y especificidad. El proceso en que estos vectores son “construidos” consiste en retirar los genes prescindibles del vector (todos aquellos no relacionados a la entrada a la célula y la especificidad celular) e introducir en su lugar el o los genes de interés. Este procedimiento genera un virus defectuoso que es capaz de infectar, pero incapaz de multiplicarse dentro de las células. Se denomina región “casete” a aquella en donde se colocan los genes terapéuticos dentro del vector viral, el tamaño de la región se encuentra estrechamente relacionado al tipo de virus, siendo está un factor muy importante que limita la longitud de las secuencias génicas que pueden ser acopladas (Ronchera & González, 2002).

La principal razón para elegir vectores virales es que estos constituyen los sistemas más eficaces, puesto que, son capaces de infectar de manera muy eficiente a las células diana, lo que, a su vez, desencadena una alta expresión del gen y al tratarse de partículas de material genético bien definidas, son altamente estables. A pesar de ello, cuentan con una serie de desventajas importantes. Primeramente, existe una posibilidad de generarse

efectos tóxicos indeseados debido a una transferencia involuntaria del vector viral natural o activación del virus patógeno. Por otro lado, el control de calidad al trabajar con virus además de ser complicado eleva de sobremanera los costos de producción. Además, como se mencionó con anterioridad la región casete limita la cantidad de material genético que puede entrar en ellos, por lo que no pueden ser usados para cualquier esquema de tratamiento (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).

La seguridad es una importante desventaja para este tipo de vectores, pues existe la posibilidad de que se intercambie material genético entre otros virus competentes que permitirán que el vector terapéutico recupere los genes que habían sido eliminados, y como consecuencia, el virus terapéutico recupera la capacidad infectiva (algo en exceso perjudicial para el paciente) (Santos, 2009). Otro de los potenciales efectos indeseados se destaca la oncogénesis insercional, la cual es capaz de activar oncogenes y desencadenar de esta manera un fenotipo tumoral (Cavazzana-Calvo M. et al. 2002).

La respuesta inmune constituye una importante desventaja debido a que el contacto previo con virus de la misma especie del vector genera una eliminación del vector lo que provoca una gran decaída en la eficacia terapéutica (Ronchera & González, 2002). Sin contar que tras varias aplicaciones se genere una respuesta contra el vector, respuesta que puede generar una hipersensibilidad de tipo inflamatorio que puede llegar a ser incluso letal para el paciente.

Los vectores virales más estudiados y por ende utilizados en la terapia génica son:

- Adenovirus: Estos se asocian con infecciones de vías respiratorias, conjuntiva, intestinal y del conducto urinario. Transfieren el episoma en diversos tejidos y células, produciéndolo en grandes cantidades. Aunque el sistema inmune del hospedador limita la duración de la expresión y hace que sea conveniente el repetir la dosis (Vera Lastra, 2006).
- Virus adenoasociados: Se componen de una cadena sencilla de DNA lineal, requieren la coinfección con los adenovirus. Su genoma está compuesto por dos genes, las proteínas implicadas en la replicación (rep) y proteínas estructurales (cap). Los vectores incluyen únicamente las secuencias víricas de repeticiones terminales. Permiten la capacidad de expresión a largo plazo en células con tasa de división mínima y generan una respuesta inmune menor que los mismos adenovirus (Vera Lastra, 2006).
- Herpes virus: Estos son capaces de llevar grandes secuencias de DNA foráneo y tienen la capacidad de ocasionar infecciones latentes de larga duración en donde el genoma del virus se comporta como un episoma sin causar efectos en la célula hospedadora. Presentan el potencial de transfectar a células pluripotenciales, así como a las ya diferenciadas. El principal inconveniente es que estos virus se asocian

con efectos linfoproliferativos y malignidad. Por otra parte, existe la dificultad de mantener una expresión prolongada del gen terapéutico, teniendo una eficiencia menor al compararse con otros sistemas de naturaleza viral o incluso con los vectores de tipo no viral (Vera Lastra, 2006).

- **Retrovirus:** Son virus compuestos por RNA de cadena sencilla, en su ciclo viral pasan por una transcripción reversa generando una doble cadena de DNA y esta a su vez, se integra en el genoma de la célula hospedadora. Su genoma está constituido por el antígeno específico de grupo (gag), la enzima transcriptasa reversa polimerasa (pol) y la proteína de envoltura viral (env) (Vera Lastra, 2006).

6.1.5. Vectores no virales

Con anterioridad se mencionaron las barreras que los ácidos nucleicos tienen que atravesar para conseguir llegar a su diana terapéutica, pero incluso si obviamos estas barreras, el propio DNA o RNA desnudo tiene como particularidad la de presentar una baja captación celular y un aclaramiento sanguíneo rápido. Estas situaciones provocan que sea crucial “envolver” al material genético, ya sea utilizando herramientas biológicas como lo son los virus u optando por estrategias químicas o físicas, estas últimas son las que se definen como vectores de tipo no viral. Estos métodos generalmente están compuestos por un gen de interés integrado en un plásmido que es introducido a la célula diana por métodos físicos o químicos. Como cualquier técnica, estos presentan una serie de desventajas. Los principales inconvenientes de estos modelos son los bajos niveles de transfección y la reducción de su actividad biológica por componentes presentes en el suero, variando en función de los métodos empleados para la transfección, llegando a desaparecer ante ciertas condiciones. Teniendo esto en cuenta, la pregunta de ¿por qué emplear vectores no virales?, adquiere un gran peso. Y es que estos vectores cuentan con una serie de ventajas que los convierten en una opción relevante al momento de hablar de la internalización de los ácidos nucleicos, entre las que se encuentran: su fácil preparación, escalamiento industrial simple, no cuentan con limitaciones a la hora de hablar del tamaño del “inserto”, presentan una baja toxicidad (para algunos sistemas es incluso nula) y mucho más importante aún, no son capaces de activar a el sistema inmune (Ronchera & González, 2002).

De igual manera que con los vectores virales, los vectores de tipo no viral tienen entre sus filas ciertos protocolos que han sido los más utilizados y por ende estudiados. A continuación, se enlistan los métodos más comunes de la amplia gama de vectores no virales:

- **Microinyección:** Este método permite la introducción de largas cadenas de DNA o RNA, aunque genera una expresión por periodos cortos de tiempo. Al compararse

con los vectores virales, estos generan una mucho menor toxicidad y una transfección mayor (Ronchera & González, 2002).

- Precipitación con fosfato de calcio: Se basa en la interacción de cloruro de calcio con DNA en una solución salina de fosfatos haciendo que los ácidos nucleicos se precipiten, generando agregados que son endocitados por las células. Esta precipitación protege al DNA de la degradación por nucleasas celulares. Permite la introducción de DNA de forma estable o transitoria, y los reactivos empleados son muy económicos. Se puede aplicar sobre una cantidad grande de células localizadas en placas de cultivo (González & Vega, 2007).
- Electroporación: Se aplica un elevado voltaje sobre las células durante fracciones de tiempo cortas, ocasionando una despolarización reversible de la membrana celular que forma pequeños orificios que permiten la entrada de nuestras moléculas de interés. Después del shock eléctrico se causa la muerte de cerca del 90 % de las células, quedando incorporadas los ácidos nucleicos en las sobrevivientes. Tiene como peculiaridad que se aplica sobre millones de células a la vez y se obtiene una eficiencia de entrada del 100 % en las células sobrevivientes (González & Vega, 2007).
- Bombardeo con microproyectiles: Se utiliza para transferencias *in vivo* e *in vitro* en donde el plásmido es cubierto con gotas de tungsteno, y posteriormente, estos complejos son sometidos a un pulso eléctrico con la finalidad de acelerarlas y como consecuencia dispararlas al tejido. Estas partículas alcanzan una velocidad suficiente para superar la membrana celular. La transfección por este método se encuentra en función de: la rigidez de los tejidos, la procedencia del DNA foráneo y la transcripción intrínseca (únicamente en procariontes). El episoma en estos protocolos es relativamente inestable, siendo este su principal inconveniente (Ronchera & González, 2002).
- Vehículos biológicos diferentes a los virus: A pesar de que los vectores no virales fueron delimitados para abarcar metodologías del tipo físico y químico, la verdad es que se han empleado el uso de otros sistemas biológicos para generar la internalización. Como vehículos se han empleado bacterias, bacteriófagos, exosomas e incluso los denominados “fantasmas de eritrocitos” (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012).
- Vehículos celulares: múltiples tipos celulares tienen tropismo ya sea por las células tumorales o pueden llegar a contar con cierta tolerancia inmune (como las células madre mesenquimales o las células estromales de la médula ósea). Estos tipos celulares han sido utilizados para entregar productos génicos a diversas células

tumorales (Duarte, Carle, Faneca, & et al., 2012). Este es un procedimiento de transfección “secundario”, ya que implica una transfección primaria utilizando cualquier otro método de internalización (Ronchera & González, 2002).

- Conjugados DNA-liposoma y DNA-polímero catiónico: Estos métodos parten de la carga negativa intrínseca de los ácidos nucleicos y la posible interacción electrostática con liposomas (lipoplejos) o polímeros (poliplejos) que cuenten con carga positiva. Esta interacción actúa de manera muy similar a la de las histonas, condensando al material genético como consecuencia de la interacción electrostática. La formación de los complejos está dada por la interacción iónica entre las cargas negativas de los átomos de oxígeno de los grupos fosfato del ácido nucleico con las cargas positivas del liposoma o del polímero (generalmente provenientes de sus grupos amina). Se pueden transportar en estos complejos “ligandos” que permiten el reconocimiento específico por receptores del tipo celular elegido como diana, lo que proporciona una mayor especificidad celular (Santos, 2009).

6.1.5.1. Complejos entre polímeros catiónicos y ácidos nucleicos (poliplejos)

Las características de los poliplejos dependen en gran medida de las propiedades inherentes de cada polimerización que puede ser empleado para su formación, por ejemplo, su estructura, la densidad de carga o incluso el peso molecular. Aunque no se deben descartar los factores en común que todos los polímeros comparten, como lo son las relaciones de carga o masa entre el polímero y el ácido nucleico, el solvente en el que se encuentran inmersos, ya que este último, condiciona en demasía la fuerza iónica, y esto solo por mencionar algunos.

Con anterioridad se delimitaron las propiedades deben tener los vectores para ser capaces de sortear las distintas barreras, aunque resulta conveniente hacer un breve repaso de estas antes de hablar del quitosán como material empleado en la construcción de poliplejos. Entre las propiedades que estos deben poseer, encontramos:

- Peso molecular: Dentro de medios con una fuerza iónica baja parece que no existe una diferencia al usar polímeros de diferentes pesos moleculares, teniendo estos tamaños bastante constantes. Al aumentar la fuerza iónica del medio, antes o después de la formación de los complejos, las diferencias en función del peso molecular comienzan a ser significantes y son dependientes de cada polímero. Se ha observado que los complejos con pesos moleculares más elevados son más eficaces en transfecciones *in vitro*, mientras que aquellos poliplejos de tamaño pequeño

preparados en medio libre de iones son más capaces de superar al capilar *in vivo* (Santos, 2009).

- **Tamaño de los complejos:** Es una de las propiedades más importantes, su importancia se encuentra en el gran número de barreras que los poliplejos se ven obligados a enfrentar. Complejos de gran tamaño son incapaces de atravesar las membranas de manera pasiva, y esto se ve reflejado notablemente en la eficacia de transfección. El tamaño de estos poliplejos puede oscilar de unos cuantos nanómetros hasta llegar a varias micras, este último tamaño, no es en esencia un aspecto negativo pues se han descrito la posibilidad de la formación de agregados de partículas, que son observados por técnicas como la DLS, como complejos de gran tamaño, por lo que el tamaño no debe ser usado como una medida de corte (Santos, 2009).
- **Forma de los poliplejos:** Muy estrechamente relacionado con el tamaño de los complejos se encuentra su forma. Debido a que existen conformaciones geométricas que facilitan la endocitosis (vía de entrada a nivel membrana celular), siendo la más adecuada la esférica. No debe entenderse que esta es la única forma que los poliplejos pueden adquirir pues, se han descrito poliplejos formando placas o con forma toroidal (Santos, 2009).
- **Papel de la relación de cargas:** Esta se encuentra dada por la proporción de polímero catiónico con el ácido nucleico e influye notablemente en el tamaño de los complejos, así como en su capacidad de agregación. Experimentalmente se sabe que, en relaciones bajas, los poliplejos cuentan con un tamaño pequeño y este va incrementando a medida que la relación de cargas se va neutralizando y vuelve a reducirse en relaciones mayores. La agregación puede llegar a presentarse gracias a esta relación, y la necesidad de hacer esta observación reside en que la formación de agregados desencadena efectos tóxicos en el paciente. Debemos entender que la agregación se ve condicionada por la carga superficial de los complejos, esta carga superficial es dada por las relaciones de cargas y se mide mediante el potencial zeta. Los polímeros catiónicos permiten alcanzar valores de potencial zeta de los complejos de 20 a 40 mV lo que favorece su solubilidad y evitando de esta manera la agregación por repulsión de cargas (Santos, 2009).
- **Condiciones en la preparación de las muestras:** Otro factor que condiciona el tamaño, estructura y nivel de agregación de los complejos son las condiciones en las que estos son formulados. La razón detrás de esto consiste en que el orden y forma con la que los componentes de estos complejos interaccionan harán que esta unión ocurra de una forma favorable o no. Los factores con mayor importancia son la concentración de iones en el medio de reacción, el orden de mezcla y la dilución de

las muestras antes o después de la preparación. De manera general, al hablar de la concentración de iones, se ha observado que los poliplejos formados en solución salina son de un tamaño mayor comparado con aquellos preparados en medios de baja fuerza iónica como el agua. Debe hacerse la observación de que si se cambia la fuerza iónica del medio posterior a la formación de los complejos se puede generar la agregación de estos ya que está relacionado a un descenso en el potencial zeta, consecuencia de la presencia de electrolitos salinos que alteran la densidad de cargas positivas. Al hablar del orden de adición de los reactivos, múltiples autores observaron que la eficacia de transfección es diez veces más alta al añadir el polímero al plásmido específicamente gota a gota, la explicación detrás de esto se encuentra en la concentración del DNA y el polielectrolito, pues se observa una tendencia de agregación al superar ciertas concentraciones en muchos polímeros (Santos, 2009).

Existe una amplia gama de polímeros que en la actualidad pueden y son empleados en protocolos de formación de poliplejos, y cada uno de estos polímeros, otorgan características únicas a los complejos, hablemos ahora del quitosán, un polielectrolito que puede ser empleado para la elaboración de poliplejos destinados a múltiples aplicaciones.

6.1.5.2. Quitosán como material en el desarrollo de vectores no virales

La quitosana o quitosán es un polímero natural que es derivado de la desacetilación de la quitina, que además de ser biocompatible y biodegradable, es capaz de formar filmes con gran aplicación en la industria alimentaria y la farmacológica (Blanquicet, Flórez, González, & et al., 2015).

Este biomaterial llegó al mercado biológico alrededor de los años 90's surgiendo como la promesa de ser un excipiente farmacéutico prometedor para diversas formulaciones farmacéuticas (por ejemplo, la insulina) y un excelente agente hemostático. Ha sido usado en la entrega de vacunas, como adyuvante inmune, para la entrega de genes o péptidos, e incluso para la ingeniería de tejidos. Además de eso, su potencial antimicrobiano (antiviral, antibacterial y antifúngico) han permitido su uso como preservador en formulaciones de tipo emulsión que son administrados por vía mucosal o parenteral, también es empleado para la exacerbación de los efectos antimicrobianos de compuestos como los benzoatos (Raafat & Sahl, 2009).

A nivel de la terapia génica el quitosán actúa permitiendo la entrega de ácidos nucleicos al interior de la célula e induciendo el aumento o disminución de la expresión de proteínas mediante el uso de microRNA o siRNA, respectivamente. Las razones de este fenómeno están dadas por el siguiente mecanismo de acción: el quitosán al interactuar con el material

genético (por fuerzas electrostáticas) lo condensa, esta condensación brinda una protección contra la degradación. Una vez este complejo se forma ocurre una internalización del material genético combinado con el quitosán, y ya al interior de la célula, ocurre la salida del endolisosoma por el efecto esponja de protones, el desempaque del material genético y posterior entrada al núcleo del pDNA o al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) para el siRNA (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).

Recapitulemos un poco acerca del precursor del quitosán, la quitina. La quitina se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, siendo el componente principal de los exoesqueletos de los artrópodos, de las paredes celulares de ciertos hongos (Zigomicetos) e incluso está presente en algunas especies de algas marinas (*Chlorella spp*). Es un mucopolisacárido insoluble compuesto por unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidas por enlaces beta glucósidos (1-4) (Raafat & Sahl, 2009). En contraste, el quitosán, cuenta con unidades de beta-(1-4) D-glucosamina que son los componentes desacetilados y N-acetil-D-glucosamina que son las unidades acetiladas que están unidas por enlaces beta glucósidos (1-4), estas unidades se encuentran distribuidas al azar dentro de la molécula de quitosán, o incluso pueden no estar presentes en función del grado de acetilación o desacetilación del quitosán.

En realidad, el término “quitosán” hace referencia a un grupo heterogéneo de polímeros que cuentan con características fisicoquímicas y biológicas que permiten que esta molécula, se vea implicada en una amplia gama de aplicaciones (Raafat & Sahl, 2009). A nivel de la industria es producido mediante un procedimiento denominado desacetilación parcial de la quitina, proceso que se encuentra esquematizado en la figura 4.

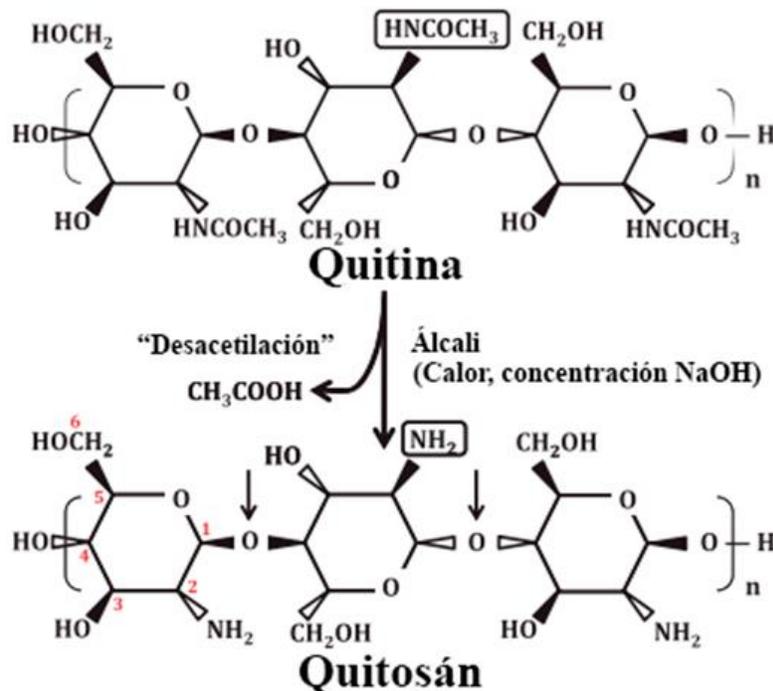


Figura 4. *Mecanismo de la transformación de la quitina en quitosán.*

Fuente: Raafat & Sahl. El paso de la quitina a quitosán se da por la hidrólisis de los grupos N-acetilo con ayuda de calor (120°C) y el uso de bases como el hidróxido de sodio o potasio, a concentraciones del 40 a 45% durante 1 a 3 horas.

Los métodos para producir quitosán (denominados quitosanólisis) son diversos e incluyen: métodos físicos (radiación ionizante o ultrasonidos), métodos químicos (hidrólisis acida o degradación oxido-reducción), e incluso métodos enzimáticos (Raafat & Sahl, 2009).

Se considera que el quitosán para ser denominado como tal, necesita contar con valores de desacetilación mayores del 50%, otros autores llegan a reportar que esto se logra a valores cercanos al 60%, aunque al presentarse una buena actividad biológica a valores de acetilación del 40% no resulta conveniente usar como valor de corte el 50%. El asunto reside en que como se mencionó anteriormente, el quitosán es considerado como un grupo amplio de polímeros, y con la finalidad de obtener quitosán con un valor específico de grado de acetilación, Baxter en el año de 1992, desarrollo un proceso que consiste en desacetilar a la quitina de manera completa y posteriormente acetilar parcialmente de manera homogénea utilizando una solución metanólica de ácido acético. Este procedimiento tiene como particularidad la extrema dificultad de la desacetilación completa de la quitina, debido a las altas condiciones heterogéneas de la reacción, además de que este drástico tratamiento hace casi imposible una ruptura parcial de los enlaces glicosídicos, y que esto a su vez, genera una disminución de la masa molecular y la distribución del compuesto (Rodríguez-Pedroso, Ramírez-Arrebato, Riverto-González, & et al., 2009).

Debido a que la obtención del quitosán a partir de la quitina proveniente de crustáceos es limitada, se ha optado por la obtención de este precursor del quitosán a partir de hongos. De estos últimos, se utiliza el micelio que es un subproducto industrial de la producción de enzimas o antibióticos. Esto se explica debido a que la membrana celular de los deuteromicetes (utilizados por los productores de estos productos) se compone de quitina (Cavazos Vallejo, 2013).

Una diferencia de la quitina y el quitosán para tener en consideración, es su solubilidad. Como se mencionó anteriormente el quitosán es la forma desacetilada de la quitina, lo que se traduce en que este es soluble en diluciones acuosas acidas. El quitosán de forma pura es insoluble en agua, en medio alcalino e incluso en solventes orgánicos. A pesar de lo anteriormente dicho, el quitosán puede ser disuelto en agua mediante neutralización con ácidos orgánicos (acético, fórmico, láctico, glutámico y málico, a concentraciones de 1-10%) o inorgánicos como el ácido clorhídrico. Hablando del uso de ácidos, el papel del pH en la disolución del quitosán se debe a los grupos amino que contiene la molécula, estos son protonados a valores de pH de 6 o menores, convirtiéndose en grupos amina los que

aumentan la repulsión intermolecular eléctrica que generan a su vez, un polisacárido poliaciónico soluble. Otra característica importante de las soluciones de quitosán es su viscosidad, la cual es dada por una serie de factores como lo es el grado de desacetilación, la concentración de quitosán, el peso molecular, pH de la solución y la fuerza iónica del medio (Raafat & Sahl, 2009).

El quitosán específicamente, cuenta con una serie de características que cumplen un rol importante en su función biológica. Entre estas características que influyen en la función biológica, encontramos el grado de acetilación (DA) y el grado de polimerización (DP). Si nos permitimos hablar de las propiedades fisicoquímicas adecuadas al momento del ensamblaje de nanopartículas destinadas a terapia génica, las características optimas son las siguientes: un bajo peso molecular, bajo DA, que los complejos que se formen cuenten con un tamaño alrededor de 100 nanómetros, un potencial zeta positivo (similar al valor del quitosán) y una alta relación de cargas (N/P) (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).

Existe una amplia evidencia de que las características biológicas del quitosán se encuentran estrechamente relacionados a su peso molecular, afectando este el tamaño de los complejos, la estabilidad de disociación de estos y en general, afectando a la eficiencia final de transfección. Se ha encontrado que el tamaño de los complejos es directamente proporcional al peso molecular del quitosán empleado, de igual forma, esta característica influye en la forma de los complejos. Por otro lado, el peso molecular del quitosán está en función de las condiciones empleadas en el proceso de desacetilación. Las condiciones de preparación del quitosán no únicamente influyen en el peso molecular, pues el grado de desacetilación es directamente proporcional al incremento en el tiempo de reacción, que influye en el grado de absorción de humedad, en la viscosidad intrínseca, su solubilidad y la distribución de carga en la cadena, siendo esta última característica la más importante (Raafat & Sahl, 2009).

Naturalmente, si el grado de desacetilación afecta la distribución de carga y este a su vez se relaciona con la eficiencia de transfección y el tamaño de las nanopartículas, el grado de acetilación al ser el complemento del grado de desacetilación influencia de manera inversamente proporcional estas propiedades. Y es que un aumento en el DA provoca la baja de la estabilidad en presencia de proteínas del suero, bajando la eficiencia de transfección en líneas celulares. La literatura indica que el valor de DA debe ser por lo menos menor al 35 %, teniéndose que, para terapia a base de siRNA se necesita un valor del 16 % cuando se está empleando quitosán de alto peso molecular. Por otra parte, se sabe que un DA de 29 % le brinda a los poliplejos una afinidad intermedia de unión con los ácidos nucleicos (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).

La importancia que tiene el quitosán como material para la construcción de vectores destinados a terapia génica, no reside únicamente en sus características físicas, ya que este

material, cuenta con una serie de propiedades biológicas que lo convierten en una importante herramienta para este fin, entre las que se encuentran su biodegradación, biocompatibilidad, bioadhesividad y una baja o nula toxicidad (Raafat & Sahl, 2009).

El quitosán es biodegradable principalmente por la susceptibilidad enzimática que este presenta, es sensible a acción de enzimas no específicas como lo son las lisozimas, quitinasas, celulasas, hemicelulasas, proteasas, lipasas y β -1,3-1,4-glucanasas. En adición, el quitosán es degradado de forma específica por las quitosanasas (quitosán N-acetilglucosamina-hidrolasas) las cuales son capaces de degradar al quitosán, pero no a la quitina, estas enzimas se encargan de catalizar la endohidrólisis de los enlaces β -(1,4)-glucosídicos entre los residuos de GlcN (Raafat & Sahl, 2009).

Una propiedad importante de cualquier biomaterial bioimplantable es que debe ser biocompatible, entendiéndose como aquel material que no afecta al hospedador y a la par no genera efectos indeseados locales o sistémicos y es tolerado de buena manera en la piel, membranas oculares y el epitelio nasal. El bajo perfil toxico que exhibe este material se encuentra en el rango de poco o nulo en estudios de toxicidad *in vivo*. Un importante aspecto por considerar en esta materia es que se encuentra contraindicado el uso de este polímero en personas con alergia a mariscos. Se han reportado la ausencia de efectos significativos en el consumo de quitosán por más de 12 semanas, aunque se debe tener precaución en el uso clínico del quitosán por largos periodos de tiempo pues puede causar cambios en la flora intestinal (Raafat & Sahl, 2009).

Por otra parte, la gran adhesión permite una interacción con el epitelio, lo que desencadena una alta eficacia al momento de administrar las nanopartículas y que estas entren en circulación sistémica (Cavazos Vallejo, 2013).

Ahora, el potencial del quitosán en la terapia génica reside en que este cuenta con diversas aminas primarias que en condiciones ligeramente ácidas son capaces de generar cargas positivas, las cuales son capaces de interactuar con ácidos nucleicos por medio de fuerzas electrostáticas. Esto tiene su razón en el valor de pKa que es de 6.5 y por ende puede servir como un “bioadhesivo” que cuenta con la capacidad de pegarse a superficies cargadas negativamente (Raafat & Sahl, 2009). La distribución de los grupos aminos dentro de la molécula de quitosán es considerada regular a razón de la alta concentración de nitrógeno dentro de la misma, molécula que alcanza valores aproximados al 7%, este valor justifica las habilidades de este biomaterial de hacer uniones con sustancias negativas entre las que se encuentran: colorantes, proteínas y por supuesto, ácidos nucleicos. En adición, la presencia de las aminas explica el comportamiento del quitosán como material adsorbente y floculante (Rodríguez-Pedroso, Ramírez-Arrebato, Riverto-González, & et al., 2009).

Actualmente, no se entiende completamente qué tipo de quitosán trabaja mejor para cada variedad de gen terapéutico o el papel que tiene el material en la conformación, forma y tamaño de los nanocomplejos (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).

Previamente se habló del papel del efecto “esponja de protones” en el escape del endolisosoma, ahora, está demostrado que el quitosán cuenta con una baja capacidad de inducir este fenómeno. Aunque, se ha encontrado que con un peso molecular del quitosán de 8 KDa y un grado de acetilación del 8 % permite que el quitosán tenga la capacidad de inducirlo, similar a la de la polietilenimina (material conocido por su alta capacidad de inducir este fenómeno, esto se da en función del número de unidades de N-glucosamina (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018). Lo que no hace más que demostrar el papel tan importante de las propiedades fisicoquímicas del quitosán al usarse como polímero para la entrega de ácidos nucleicos.

Los sistemas basados en quitosán pueden ser preparados por cinco métodos:

1. Coacervación simple: con anterioridad se denominó al quitosán como un polímero natural con carga positiva, y esta carga le confiere la propiedad de interactuar con una variedad de polímeros con carga negativa. Para el caso particular de esta reacción se da una separación de fases en donde el solvente (en donde está inmerso el quitosán) es excluido de los compuestos hidrofílicos, mediante la adición de una sal o un alcohol (Bellich, D'Angostino, Semeraro, & et al., 2016). Este procedimiento requiere un estricto control del pH, además de que las propiedades de los complejos resultantes se encuentran estrechamente relacionadas por las condiciones de reacción y las propiedades del quitosán empleado para efectuar la reacción.
2. Reticulación del quitosán: se agrega un agente de “entrecruzamiento” mediante goteo en una solución de quitosán. Se considera como un método simple de encapsulación de diferentes compuestos como llega a ser el DNA. Uno de los agentes estándar para este fin es el glutaraldehído el cual forma puentes entre dos unidades de glucosamina de la misma o diferente cadena de otro compuesto polimérico como la gelatina y la hidroxiapatita. Los grupos amino presentes en el quitosán interactúan con el grupo aldehído de este compuesto generando un enlace imino generado por una reacción de Schiff. Este proceso genera una red resistente a la disolución a valores de pH extremos, aunque este proceso es altamente tóxico debido a la presencia de aldehídos en la reacción, lo que lo convierte en un sistema bio-incompatible (Bellich, D'Angostino, Semeraro, & et al., 2016).
3. Gelación iónica: Se basa en la capacidad del quitosán de atravesar un gel gracias a la interacción con un polianión (como los ácidos nucleicos). Este método tiene como principal inconveniente el tamaño y estabilidad de los complejos, aunque esto se

puede arreglar añadiendo tripolifosfato pentasódico (TPP) (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).

4. Absorción en sistemas preformados: Se adiciona el plásmido a partículas formadas por gelación iónica (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).
5. Coacervación compleja: Esta se da al mezclar el polímero con los nucleótidos directamente en un medio acuoso. Los complejos por este método se dan por la interacción de las fuerzas electrostáticas en una solución acuosa, a pesar de la simplicidad del método existen una serie de factores que se deben ajustar en las condiciones de la mezcla, el ratio de cargas e incluso las características del quitosán. Por ejemplo, se ha encontrado que se forman muy buenos complejos adicionando el quitosán a los nucleótidos, pipeteando de arriba y abajo la mezcla e incubando durante 30 minutos (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).

6.1.5.3. Ligandos y péptidos cariofílicos como estrategias para mejorar la transfección

Previamente se definió el mecanismo para ejercer el efecto terapéutico que siguen los complejos entre el material genético terapéutico y el quitosán, pero este procedimiento no es perfecto, siendo necesario la modificación de los complejos con la finalidad de mejorarlos. Antes de hablar de estas “modificaciones” es necesario aclarar una serie de conceptos.

Como anteriormente se mencionó, la salida del endolisosoma se podría explicar por la hipótesis de la esponja de protones. Y es que, después de la internalización en el endosoma, la ruta celular a ser seguida de manera habitual es la lisosomal para degradar el contenido del endolisosoma. En las situaciones en donde esto sucede se da una baja considerable de los niveles de transfección, sucediendo para la mayoría de policationes. Pero existen una serie de biomateriales que escapan de esta situación. La hipótesis de la esponja de protones dicta que los policationes son capaces de tamponar el pH del endolisosoma y de esta manera generando que sufra un hinchamiento osmótico. El factor determinante en esta hipótesis es el grado de protonación de los grupos amina presentes en los policationes. La razón de esto es que, a pH fisiológico, materiales como el quitosán se encuentran parcialmente protonados, por lo que al hacerse la endocitosis los grupos amina captan protones del endolisosoma lo cual estaría acoplado a un flujo simultáneo de iones cloruro al interior de este, esta entrada de iones provoca el acceso masivo de agua hacia el interior, lo que, a su vez, desencadena la ruptura del endolisosoma y la liberación de los complejos (figura 5) (Santos, 2009).

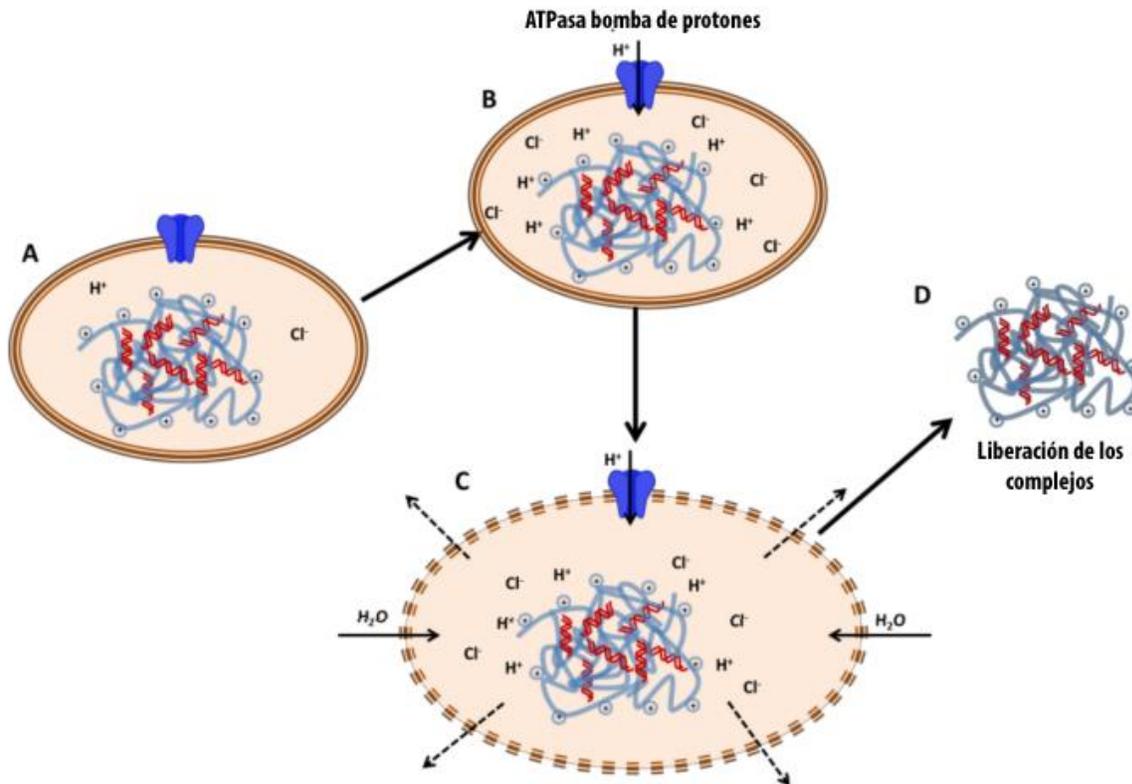


Figura 5. Efecto esponja de protones.

Imagen modificada de: Santos-Carballal, Fernández & Goycoolea. Los complejos dentro de los endosomas son protonados por la acción de la ATPasa bomba de protones (A), esta protonación causa una reducción en el pH (B); posteriormente, entran iones de cloro de manera pasiva y causan que entre agua al interior del endosoma (C) y provoca la liberación al citoplasma (D).

Al salir del endolisosoma la lógica dicta que los complejos deben disociarse del componente no nucleico (polímero catiónico) para poder ejercer su efecto modificador de la expresión génica. Existen dos posibles escenarios en función del tipo de complejo, el primero de ellos es para los lípidos catiónicos, y es que existe evidencia de que mientras el DNA se encuentra en el núcleo, estos no exhiben una localización nuclear, lo que es interpretado como que esta disociación ocurre antes de la entrada del DNA al núcleo celular. Esto es diferente para los complejos que incluyen polímeros catiónicos y al material genético terapéutico, ya que existe evidencia de que estos acompañan al ácido nucleico al núcleo e incluso son capaces de dirigirlo al mismo. Aunque para estos complejos la disociación parece ser posible en función del tamaño del ácido nucleico, siendo que, para los oligonucleótidos la disociación es total y para los plásmidos estos mayoritariamente permanecen asociados al polímero, aunque parece que esto no interfiere de manera significativa en la expresión (Santos, 2009). En el caso específico del quitosán todo parece indicar que el biomaterial se disocia del endolisosoma en el citoplasma debido a la acción de las enzimas del endolisosoma.

Para mejorar la internalización en la membrana celular, se ha intentado combinar los vectores con mecanismos de internalización celular mediada por receptores, adicionando ligandos a los vectores, tomando como pauta los mecanismos de entrada usados por virus, toxinas, nutrientes (transferrina o LDL), factores de crecimiento y hormonas (insulina, VEGF, EGF, FGF). Cualquier molécula que cuente con la habilidad de ser reconocida de manera específica, potencialmente puede ser usada como direccionamiento de vectores, estos “elementos direccionadores” pueden ser de naturaleza proteica, vitamínica, inmunológica (anticuerpos) o incluso carbohidratos. Los criterios para la selección del “ligando” son: la cantidad de receptores que reconozcan al ligando se encuentran en la célula diana, especificidad de este ligando con la célula blanco y más importante aún, la capacidad de activar la internalización (Santos, 2009).

Ahora, los vectores no virales resultan “deficientes” al transportar el material genético del citoplasma al núcleo, especialmente en células que no se encuentran en división, siendo este transporte crucial para los sistemas a base de DNA. Teniendo esto en cuenta, ¿Cómo se puede hacer uso del transporte intracelular y de esa manera fomentar la entrada nuclear del inserto? Se ha hecho uso de péptidos con secuencias de señalización nuclear (NLS) que tienen como fin solucionar este inconveniente.

Para poder entender porque estos péptidos aumentan la eficiencia en la transfección, debemos comprender porque los vectores virales si son capaces de entregar el material genético al interior del núcleo. Y es que, segmentos de aminoácidos con secuencias de localización nuclear (NLS), al unirse a receptores de transporte intracelular (importinas) facilitan el transporte a través del complejo de poros nucleares (NPC) (Bremner, Seymour, Logan, & et al., 2004).

Específicamente los péptidos con señales NLS permiten la entrada al núcleo mediante la vía “clásica” de importinas (α y β). El procedimiento de internalización al núcleo celular presenta una serie de pasos que comienzan con la formación de un complejo entre las importinas α y β , y el sustrato de las importinas (que en este escenario en particular consiste en el péptido NLS), la formación de este complejo se da por el paso de Ran de su forma GTP a GDP por acción de la enzima RanGAP1. Este complejo posteriormente se une al NPC y pasa a través del canal central y ya en su interior ocurre la disociación de este complejo trimétrico y la liberación del sustrato de las importinas, ocurriendo esto por el intercambio de la forma GDP de Ran por la forma GTP por la acción de RanGEF (Cartier & Reszka, 2002). El proceso anterior cuenta con una serie de características “control” que pueden y son usadas dentro del estudio de la internalización del material genético foráneo:

- Modificación de la afinidad de los NLS a los receptores de importinas por procesos de fosforilación (Cartier & Reszka, 2002).
- La facilidad de tener acceso a los péptidos NLS o de los factores de importación.

- Permeabilidad del NPC.
- Posibilidad de que existan señales de retención en el interior del citoplasma (Cartier & Reszka, 2002).

Ahora respondamos la pregunta, ¿Qué tan necesario resulta el aumento de la eficiencia de transfección con el uso de péptidos NLS? Pues, solo el 0.1 % del DNA desnudo consigue llegar al núcleo, mientras que los poliplejos inyectados directamente en el citoplasma solo consiguen alcanzarlo en un 1 % (esta cifra no es universal, ya que este proceso es dependiente del tamaño del inserto, de manera normal se puede seguir el ingreso nuclear del DNA en estudios *in vivo* utilizando fragmentos lineales de tamaño menor a las 1.5 kilobases) (Bremner, Seymour, Logan, & et al., 2004), puede que estas cifras por si solas no permitan entender la baja eficiencia de este proceso, pero al contrastar con la microinyección directa nuclear que presenta eficiencias de transfección del 50 al 100 %, se puede dimensionar de mejor manera la importancia de la mejora de la internalización nuclear del DNA foráneo (Cartier & Reszka, 2002). Algunos estudios han reportado un aumento en la expresión del gen en mil veces al usarse péptidos NLS (también denominados como cariofílicos). Sigue siendo un tema de debate el número de péptidos NLS necesario para incrementar la entrega nuclear, siendo defendida la idea de la presencia de un solo NLS por diversos autores, y múltiples por parte de otros (Bremner, Seymour, Logan, & et al., 2004).

El uso de secuencias NLS no solo abarca a los ácidos nucleicos, se han realizado estudios sobre la internalización de proteínas en el interior del núcleo celular mediante el uso de partículas de oro con diámetro de 170 angstroms que al ser adicionadas con proteínas cariofílicas son capaces de depositarse en el núcleo celular de manera exitosa. A su vez han sido empleados para internalizar proteínas reporteras citoplasmáticas como la β -galactosidasa o la piruvato cinasa, al ser fusionadas con péptidos NLS (Cartier & Reszka, 2002). Esta evidencia no hace más que resaltar la importancia del uso de péptidos cariofílicos para aumentar el ingreso nuclear del material genético.

Los péptidos NLS son capaces de unirse con el material genético mediante interacciones electrostáticas, puesto que los grupos fosfato presentes en los nucleótidos cuentan con una carga negativa y son capaces de interactuar con los péptidos NLS catiónicos. La presencia de aminoácidos con carga positiva en las secuencias NLS resulta crucial debido a que estos son los que interactúan con los receptores de los transportadores, en el escenario hipotético de que estos residuos se neutralizaran, volverían más complicado el reconocimiento de las cargas, ante esta situación se pueden emplear un mayor número de péptidos cariofílicos o modificar la separación entre ellos (Bremner, Seymour, Logan, & et al., 2004).

Con todo esto en cuenta, surge la pregunta, ¿Las interacciones electrostáticas son la única forma en que los péptidos cariofílicos son capaces de unirse al material genético? Bueno, existen otras dos alternativas de unión de los péptidos cariofílicos al interactuar sobre el DNA, la unión covalente y el uso de ácidos peptidonucleicos (PNA). En términos de la unión covalente es prudente resaltar el especial cuidado que debe tenerse de que esta no se de en el interior del “casete” de expresión, en cuyo caso resultaría en un bloqueo en la expresión del inserto terapéutico, generando un efecto contrario al esperado. Por otra parte, encontramos que los PNA’S resultan útiles debido a que tienen como función ser específicos de secuencia, esta particular propiedad brinda la posibilidad de controlar de manera exacta el sitio en donde se unirán al DNA y el número de PNA’S que interactúan con la secuencia (también se puede emplear como análogo de los PNA a los oligonucleótidos que son unidos covalentemente al DNA mediante el uso de un agente fotoactivo) (Cartier & Reszka, 2002).

6.1.5.4. Coacervación compleja para la formación de nanopartículas

De manera general se conoce como coacervación a la separación de fases inducida por una modificación en el ambiente como lo puede ser el pH, la temperatura, la solubilidad y la fuerza iónica. Existen dos fases en este proceso, primeramente, la fase coacervante que es rica en los coloides y otra fase que cuenta con una pequeña cantidad de ellos conocida como la fase en equilibrio. Existen dos estrategias de coacervación: La coacervación simple y la compleja. Para la coacervación simple un único polímero está implicado y los coacervados se forman mediante un mecanismo de deshidratación causado por la adición de una sal en la mezcla o por un líquido de desolvatación (conocido también como agente de coacervación). Por otra parte, en la coacervación compleja se dan interacciones iónicas entre dos (o incluso más) polímeros con cargas opuestas, de manera principal las fuerzas electrostáticas ocasionadas por las macromoléculas de cargas opuestas son aquellas que conducen la reacción. No se deben despreciar las fuerzas de van der Waals, las proteínas dipolares, las interacciones hidrofóbicas e incluso cambios conformacionales dentro de los ácidos nucleicos, cumplen un rol en la formación de los complejos (Prasad-Timilsena, Akanbi, Khalid, & et al., 2018).

Tomando en consideración todos los métodos descritos previamente para la formación de micro/nano complejos, ¿Por qué es preferible la coacervación compleja ante el resto de las metodologías? La coacervación compleja es una técnica que involucra una extrema simplicidad, por esta misma razón resulta fácil reproducir los resultados en la encapsulación, escalar los procesos a nivel industrial aunado a un muy bajo costo al ser comparado con el resto de las técnicas. Más allá del aspecto económico, este método

involucra una alta eficiencia de encapsulación (Prasad-Timilsena, Akanbi, Khalid, & et al., 2018).

La técnica de coacervación se describió por primera vez durante el año 1623, en la actualidad esta metodología se emplea para la micro o nano encapsulación de materiales con aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica, utilizándose para encapsular ingredientes alimentarios, en la agricultura (encapsulación de pesticidas, extractos de plantas, feromonas y aceites como repelentes de insectos), electrónicos e incluso encapsulación de materiales textiles. En años más recientes ha sido empleada para la purificación de macromoléculas por separación selectiva, detección de “agua dura” e incluso se han desarrollado materiales con ayuda de la atracción de los biopolímeros obteniéndose sustitos de grasas, filmes biodegradables e incluso análogos de la carne (Prasad-Timilsena, Akanbi, Khalid, & et al., 2018).

Previamente se definió a la coacervación compleja, pero resulta prudente mencionar que interacciones participan en este procedimiento y en qué orden de eventos lo hacen. Primeramente, las fuerzas de alto rango de Coulomb aportan la primera energía de enlace fuerte, esto genera que los componentes de la reacción se acerquen y permitan que los enlaces más direccionales y de corto enlace como lo son los puentes de hidrogeno se generen (Bellich, D’Angostino, Semeraro, & et al., 2016). Ahora, no basta con saber que fuerzas están involucradas, se debe hablar a detalle acerca del proceso mediante el cual los nanocomplejos son formados utilizándose la coacervación compleja. Para este fin, primero debemos entender el proceso mediante el cual el material genético se condensa por acción de moléculas catiónicas, el cual consta de dos pasos:

1. La macromolécula catiónica se une al material genético por uniones electrostáticas no específicas, esto da como resultado la neutralización de las cargas que como consecuencia reduce la repulsión dentro del nucleótido (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).
2. En cuanto se consigue una concentración adecuada del catión, empiezan a ocurrir interacciones entre el mismo nucleótido y esto condensa al material genético por un proceso impulsado entrópicamente (Santos-Carballal, Fernández, & Goycoolea, 2018).

En cierto punto del proceso de encapsulación se empieza a ver la presencia de un coacervado fino el cual otorga cierta turbidez a la mezcla de reacción, este momento es denominado como “microcoacervación”, en caso de que se continúe el procedimiento estas partículas se juntan y se convierten en partículas más grandes que como consecuencia cuentan con una densidad mayor y se precipitan formando dos fases, y a este estado se le denomina como “macrocoacervación” (Prasad-Timilsena, Akanbi, Khalid, & et al., 2018).

Existen múltiples factores que afectan al proceso de coacervación en su totalidad, por ejemplo: el peso molecular de los componentes de la reacción, la fuerza iónica del medio, la temperatura, el pH del medio de reacción, la concentración y la densidad de carga de cada uno de los polímeros. Además, estos factores son interdependientes entre sí, lo que añade complejidad al proceso. Con anterioridad se definió el papel de muchos de estos factores, pero es conveniente hablar del rol puntual en este proceso que tienen la temperatura y la concentración. Múltiples investigadores han reportado que una temperatura baja favorece la coacervación debido a que facilita las interacciones en sistemas constituidos por solventes o solutos, en contraste, para múltiples sistemas se ha encontrado que la temperatura no ejerce efecto sobre la reacción. En términos de las concentraciones de los componentes de la reacción, se ha reportado en múltiples estudios, que un exceso en la concentración de los polímeros tiene un efecto negativo para la coacervación, la explicación tras este fenómeno reside en que las altas concentraciones impiden el libre movimiento de las moléculas lo que restringe la proximidad de los polímeros e impide las interacciones (Prasad-Timilsena, Akanbi, Khalid, & et al., 2018).

Este procedimiento está influenciado por una gran cantidad de factores, por lo que es necesario optimizar cada uno de ellos para cada sistema en específico. La primera de las estrategias que están destinadas para este fin, es la evaluación de la micromovilidad electroforética de cada uno de los componentes de la reacción, el ratio de concentraciones de los componentes, incluso se debe evaluar la micromovilidad para un gradiente de valores de pH y fuerza iónica; todo lo anterior mencionado se lleva a cabo con la finalidad de conocer las condiciones óptimas de la reacción. Otra estrategia consiste en la medición del potencial zeta de los polímeros sin estar mezclados y posterior a su mezcla, esto se hace con la intención de optimizar las condiciones de la reacción, obteniéndose la reacción “óptima” cuando la diferencia de cargas entre los polímeros se encuentre en su máximo valor. También se ha registrado el uso de la dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar el tamaño de los complejos y la microscopía electrónica que además de evaluar el tamaño permite observar la forma de los complejos, sobre todo posterior a la optimización de la reacción (Prasad-Timilsena, Akanbi, Khalid, & et al., 2018).

6.1.5.5. Toxicidad de nanopartículas a base de quitosán

Desde la aparición del quitosán en el mercado mundial, se ha tenido certeza de su baja o prácticamente nula toxicidad, llevándose a cabo a lo largo de los años diversos estudios por parte de la EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) con la finalidad de averiguar los posibles efectos tóxicos que tiene este biomaterial. No fue hasta el año 1995 que este organismo promulgó una “excepción de algún requerimiento de tolerancia”, este

término hace referencia, a que este material no tiene límite de uso (como biopesticida) debido a su baja toxicidad, no presentando riesgo alguno para el medio ambiente. En términos del ser humano es bien sabido que se corre el riesgo a irritación cutánea tras una exposición fuerte y prolongada (Cavazos Vallejo, 2013).

El quitosán ha sido registrado como “GRAS” (reconocido generalmente como seguro, por sus siglas en inglés) y se ha aprobado para consumo humano en Japón, Finlandia e Italia, a su vez en el año 2009 se introdujo en la farmacopea europea y durante el año 2011 se añadió al compendio de formulación de Estados Unidos. Ha sido aprobado como apósito para heridas, reparación de cartílagos, potenciador de la absorción nasal de medicamentos, péptidos y proteínas (Bellich, D’Angostino, Semeraro, & et al., 2016).

Existe una amplia evidencia de que generalmente las nanopartículas (de cualquier material) al ser introducidas en sistemas biológicos son seguras. A pesar de esto, es necesario destacar que el grado de toxicidad se encuentra en función del tamaño de los sistemas, debido a que, al tener un menor tamaño los sistemas son más reactivos. Günter Oberdöster sometió a ratas con una exposición de partículas cuyo diámetro era de 20 nm, partículas construidas de politetrafluoroetileno durante 15 minutos, lo que desencadenó la muerte de los animales transcurridas 4 horas, esto fue contrastado con sistemas de 130 nm, siendo estos sistemas inocuos para los animales (Cavazos Vallejo, 2013).

Thai y colaboradores durante el año 2020 ejecutaron un protocolo en donde se evaluó la toxicidad de nanopartículas construidas por gelación iónica con alginato y que encapsula el fármaco lovastatina, reportando que la toxicidad generada en ratones es suficientemente baja, utilizando una máxima dosis de complejos de 300 mg/kg y no se presentaron signos anormales, nula toxicidad general o estructural en órganos fundamentales o incluso mortalidad, denotando que las nanopartículas son seguras en ratones. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) dictamina que cualquier sustancia que cuente con una DL50 mayor a los 5000 mg/kg es considerada como sustancia clase 5, es decir no tóxica, encontrándose que para este estudio que en los animales con una dosis de 5000 mg/kg no tuvieron efecto tóxico alguno por lo que resulta obvio que la DL50 es mayor a este límite (Thai, Thuy Nguyen, Thi Tach, & et al., 2020).

Las nanopartículas a base de quitosán independientemente de lo diferente que puedan llegar a ser en su naturaleza al compararse con otros sistemas construidos con polímeros catiónicos, tienen como punto en común que su toxicidad es dada por los siguientes factores:

1. Tratamientos hechos sobre la superficie de los complejos, influenciando el grado de agregación (siendo el sitio más importante de agregación los pulmones) y la carga de superficie de estos (Cavazos Vallejo, 2013).
2. Cantidad de partículas dentro del sistema biológico y distribución dentro del mismo.

3. Forma de las nanopartículas y el potencial de atracción electrostático (Cavazos Vallejo, 2013).
4. Método de formación de los poliplejos y modificaciones postsíntesis.

Múltiples estudios han reportado que los complejos formados a base de quitosán en forma de emulsiones, agregados y microesferas con la finalidad de transfectar células eucariotas, mediante diversas vías de administración, han demostrado ser una opción aparentemente inocua.

Pese a todo lo anteriormente mencionado, la mayoría de las fuentes que reportan los complejos entre ácidos nucleicos y quitosán referencian poca toxicidad o incluso nula.

6.2. Evaluación eficacia terapéutica *in vitro*

6.2.1. Transfección celular

Generalmente se hace una distinción de esta técnica en función de la naturaleza del material genético introducido, particularmente su mecanismo de acción; base a esto surgen dos clasificaciones la transfección estable y la transitoria. La principal distinción entre estas dos opciones resulta en que la transfección transitoria como su nombre lo indica solo es expresada por un periodo límite de tiempo debido a la falta de integración con el genoma de la célula, esta transfección se puede perder por factores ambientales o la división celular misma (Kyung Kim & Eberwine, 2010).

En términos de la transfección estable, está tiene como principal objetivo conseguir una transfección a largo plazo, generando clonas individuales que cuenten con el DNA integrado en el genoma celular. Esta integración es verificada mediante un cribado usando como marcador una resistencia a fármacos o la transformación morfológica, como sucede en las células CI127 al ser transfectadas utilizando vectores a base de virus del papiloma bovino. Otra alternativa consiste en adicionar un gen esencial que en una línea celular se encuentre defectuoso en esta línea celular determinada, como es el caso de las células CHO en donde la expresión del gen dihidrofolato reductasa se encuentra disminuida y es crucial la adición de nucleósidos, en las instancias en donde se utilizan vectores que cuenten con el gen DHFR ya no requieren de la adición de nucleósidos y eso permite realizar el cribado (Promega, N/A).

Para la transfección transitoria de manera general se requiere que tras la transfección las células sean monitoreadas durante un intervalo de tiempo de 24 a 72 horas, aunque esto depende de los objetivos del estudio, tipo celular y características de la expresión del inserto. Se puede optar por dos posibles protocolos de transfección el estándar y el reverso. El método estándar consiste en realizar el plateo de las células en el día 1, la transfección en el día 2 y analizarlas durante el tercer o cuarto día. En contraste, para el método

“reverso” las células son añadidas en una placa que contiene la mezcla de transfección y son analizadas durante el día 2 o 3, reduciendo de esta manera el proceso durante 1 día (Promega, N/A).

A simple vista pareciera ser que la expresión transitoria es perjudicial, teniendo la concepción que una expresión constante involucra un efecto sostenido y en consecuencia la cura completa e imperecedera de un padecimiento; pero esto no aplica en la mayoría de los escenarios en donde la expresión transitoria toma protagonismo por sus diversas ventajas:

1. No son exclusivos de hospedero: Los sistemas de expresión estable para conseguir la integración en el genoma de su organismo hospedero necesitan especificidad, que garantice que el sitio en donde la secuencia sea insertada no afecte de alguna forma la integridad del paciente y que a su vez promueva la expresión del gen transgénico. El problema de este direccionamiento es que eso hace que los sistemas “estables” sean únicos de célula diana, por lo que al querer ser transportados a otros tipos celulares u organismos tengan que rediseñarse. Esto no sucede para los sistemas transitorios, pues al no integrarse en el genoma tienen una gran flexibilidad en sus sistemas de expresión.
2. Conservación del patrimonio genético: Cuando se habla de terapia génica siempre surge el debate de la modificación del acervo genético y las prácticas de eugenesia. Debate que es aplicable en gran medida a los sistemas de expresión estable; pero con la expresión transitoria no se modifica el acervo genético de la especie pues este no solamente no es heredado, sino que además se pierde con el paso del tiempo.
3. Bajo costo y seguridad: El principal problema de los sistemas estables reside en la posibilidad de oncogénesis insercional, siendo un problema no menor. Problema que con los sistemas transitorios al no integrarse al genoma estos son incapaces de generar. Por otra parte, a estos sistemas no integrarse en el material genético requieren mucha menos investigación para su desarrollo y un control de calidad resulta menos riguroso, que con un menor esfuerzo garantiza la inocuidad de los sistemas reduciendo enormemente no solo costos de desarrollo, sino también de producción (Noguera & Fermín, 2013).
4. Tratamiento temporal: No todas las enfermedades a ser tratadas por estrategias de terapia génica son congénitas, una gran mayoría de estas tienen un origen diferente. Normalmente la expresión estable no resulta perjudicial a menos que el efecto terapéutico sea tóxico o de alguna manera contraproducente para el paciente, como lo son los sistemas suicidas. Para el caso particular de los sistemas suicidas se requiere que la expresión sea lo más específica de tipo celular y no duradera para

no desencadenar efectos perjudiciales en el paciente por la acción de la proteína transgénica o por el efecto espectador.

Existe una terminología asociada a la transfección que hace distinciones de este procedimiento en función del tipo celular o incluso el procedimiento empleado:

- Transducción: es definida como el uso de transferencia de DNA mediado por virus, particularmente bacteriófagos en el interior de una célula bacteriana.
- Transformación: aplica a la entrada de ácidos nucleicos mediante mecanismos no virales en el interior de bacterias, células eucariotas no animales o células de plantas.
- Transfección: consta de la introducción de ácidos nucleicos en células eucarióticas, particularmente las de origen animal.

Como cualquier método que implique el uso de modelos de estudio biológicos, existe una serie de factores que condicionan en gran medida la eficiencia y las condiciones de transfección:

- Contaminación de la línea celular: la presencia de cualquier organismo ajeno al sujeto experimental puede significar desde simples interferencias al momento de la lectura de los resultados o directamente eliminar al sujeto de estudio (Promega, N/A).
- Número de pases de la línea celular: Las características celulares son susceptibles a cambiar con el paso del tiempo, por lo que la respuesta a la transfección varía conforme el número de pases crece, provocando así la decaída en los niveles de expresión, por esta razón es recomendable utilizar un número de pases bajo (menos de 50) (Promega, N/A).
- Confluencia: Resulta como una regla general el uso de cultivos celulares con un grado de confluencia de 40 al 80%, naturalmente esto se encuentra en función de las condiciones de estudio y de la línea celular empleada. Una baja confluencia (número pequeño de células) provoca que no se cuente con el contacto célula a célula que se precisa para el desarrollo de ciertas funciones celulares, siendo vital esta unión para diversas líneas celulares. Para el caso contrario, muchas células desencadenan en una inhibición del crecimiento precisamente debido al contacto, generando que las células se vuelvan resistentes al DNA extranjero puesto que las células en división absorben mejor al DNA foráneo más que las quiescentes (en reposo postmitótico) (Promega, N/A).
- Estado general de la célula: En caso de que las células se encuentren comprometidas de alguna manera, deben ser descartadas y resembrar en un medio de reciente preparación o en su defecto de un stock de medio salido del congelador, se prefiere el medio fresco debido a la presencia de probables componentes del medio

inestables. En caso de que el medio no cuente con todos los factores necesarios para el crecimiento, el cultivo puede dañarse y afectar la transfección (Promega, N/A).

- Tipo de línea celular: El tipo de línea celular influye en gran medida no solo las condiciones de mantenimiento del medio de cultivo, condicionando esta característica el tiempo, las condiciones en el que los vectores deben interactuar con las células y la masa de DNA necesaria para alcanzar valores adecuados de transfección (Promega, N/A).
- Presencia de suero en el medio de cultivo: Existe información diversa (y en algunos casos contradictoria) acerca de la influencia sobre la transfección que tiene la presencia de suero en el medio de cultivo. La razón detrás de esto se encuentra en los componentes de este, sobre todo para los vectores construidos a base de interacciones electrostáticas, debido a la existencia de polianiones en el suero que desestabilizan los complejos a tal grado de desensamblarlos, además diversas biomoléculas contenidas en esta matriz son capaces de interactuar con los complejos, llegando a generar interacciones altamente perjudiciales o beneficiosas, según sea el caso. Diversos protocolos en donde se usan complejos a base de DNA se recomienda estrictamente la ausencia de suero (Shah, Sakthivel, Toth, & et al., 2000) y otros sugieren vital que el suero esté presente (Acosta Torres, Arenas Arrocena, García Contreras, & et al., 2018) (invitrogen, 2015).
- Calidad y cantidad del ácido nucleico: Cuando se hace uso de DNA como inserto este debe estar libre de la interferencia de RNA, proteínas, químicos o incluso microorganismos, ya que cualquier contaminación puede desencadenar una falla en el vector e incluso su total inactivación. Es recomendable que el inserto este disuelto en agua libre de nucleasas a una concentración de DNA recomendada por diversos autores de 0.2 a 1 miligramos por mililitro o 0.2 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, aunque como se definió previamente, la concentración se encuentra en función del tipo de DNA, metodología de transfección, confluencia del cultivo y la misma línea celular (Promega, N/A).

6.2.2. Viabilidad celular

El paso normal tras la realización de una transfección celular consiste en asegurarse de que el inserto haya tenido la capacidad de escapar del endolisosoma y posteriormente llegar al núcleo para poder iniciar con el dogma central de la biología molecular. Esto se puede realizar mediante diferentes procedimientos de origen molecular que tengan como finalidad detectar uno de los productos generados como consecuencia de la transfección (por ejemplo, el mRNA o la proteína terapéutica) aunque la presencia del mRNA no significa

necesariamente la traducción de este y la subsecuente generación de títulos de la proteína terapéutica, incluso la presencia de la proteína no se traduce en la generación del efecto terapéutico. Es por este motivo que resulta práctico el uso de episomas que cuenten con un gen reportero que notifique de la traducción del inserto, como es el caso de la proteína verde fluorescente. De manera general, los ensayos para determinar la presencia del gen reportero son llevados a cabo después de 1 a 3 días de realizada la transfección, aunque el tiempo óptimo para su realización debe ser determinado de forma empírica para cada experimento.

Pero ¿Qué sucede en el caso de pHSV-TK1 que no genera una señal fluorescente? Para el caso particular de nuestro gen terapéutico resulta conveniente determinar si las células están sufriendo el efecto terapéutico (muerte celular) mediante una serie de ensayos que tienen como fin el de determinar el estado vital de las células, conocidos como ensayos de viabilidad.

Los ensayos de viabilidad celular son usados generalmente para determinar el efecto de diversos compuestos en la proliferación celular o para evaluar su propia citotoxicidad (Riss, Moravec, Niles, & et al., 2021). Estos ensayos no tienen solo la finalidad de garantizar que existan células muertas, sino que buscan dar una medida estimada de la cantidad de estas, lo que se conoce como viabilidad celular.

Estas pruebas se fundamentan en la presencia de un producto que solo se encuentra en células vivas, la acción de enzimas o proteasas que actúan en función de la viabilidad celular e incluso se puede medir la reducción en la concentración de un substrato determinado.

Estas técnicas son usadas con la finalidad de evaluar las características en función de la salud o la integridad de las células, optimización de las condiciones experimentales, o la supervisión de la supervivencia celular tras la exposición a diversos tratamientos. Estos ensayos expresan sus resultados mediante distintos parámetros en función de los objetivos específicos de cada experimento. A continuación, se enlistan los más utilizados:

- Viabilidad celular: Objetivamente este parámetro busca determinar el número de células sanas en una muestra sin hacer distinción de células en división o fuera de ella. La principal metodología se basa en el uso de colorantes como el yoduro de propidio, medición de la actividad metabólica o en su defecto los niveles de ATP en las “células sanas” (Cell Signaling TECHNOLOGY, N/R).
- Proliferación celular: Este término hace referencia al incremento del número de células, lo que sucede durante el último paso de la división celular, la citocinesis. Los métodos que emplean este parámetro directamente cuentan las células en dos diferentes tiempos, se basan en la detección de marcadores de la replicación del material genético o de la división celular midiéndose con ayuda de citometría de

flujo, emplean inmunofluorescencia, técnicas avanzadas de imagen o ELISA (Cell Signaling TECHNOLOGY, N/R).

- Toxicidad celular: Se genera por la acción de un compuesto capaz de dañar o matar a las células, aunque no debe obviarse que existen factores como el estrés que pueden condicionar este efecto e incluso el papel de la respuesta inmune (especialmente en ensayos que tienen como finalidad evaluar la capacidad citotóxica por parte de las células T). Esta capacidad citotóxica puede ser medida mediante el análisis de la pérdida de integridad de la membrana celular o la presencia de diversos marcadores de muerte celular. Aunque normalmente los procedimientos destinados a medir este parámetro se sustentan en el conteo de células vivas y muertas o en su defecto en la evolución de la integridad de la membrana celular con ayuda de la medición de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Cell Signaling TECHNOLOGY, N/R).

Estos son algunos de los ensayos de viabilidad celular más comúnmente empleados:

- Ensayo de ATP para células viables.
- Determinación de múltiples proteasas.
- Ensayos de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).
- Ensayo de viabilidad por reducción de la resazurina.
- Ensayo de reducción de MTT.

6.2.2.1. Ensayo de reducción de MTT

Existen múltiples ensayos de viabilidad celular basados en la reducción de compuestos entre los que se encuentra la reducción de la resazurina o los que hacen uso de sales de tetrazolio, hablemos un poco más acerca de estos últimos.

Diversas sales de tetrazolio han sido empleadas para evaluar la viabilidad celular, por ejemplo, MTT, MTS, XTT y WST-1 (por mencionar algunas). Estos compuestos pueden dividirse en dos categorías en función de su carga y por ende su capacidad de penetrar la membrana celular, dentro del grupo de las sales cargadas positivamente (aquellas capaces de penetrar la membrana celular) se encuentra el MTT, mientras que en el grupo de aquellas sales cargadas negativamente encontramos a WST-1, XTT y MTS las cuales de manera general son empleadas con aceptores de electrones intermedios que pueden transferirlos desde el citoplasma o la membrana plasmática hacia el espacio extracelular con la finalidad de facilitar la reducción de las sales de tetrazolio convirtiéndolas en formazán (compuesto colorido) (Riss, Moravec, Niles, & et al., 2021).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado acerca de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, pareciera inútil el uso de las sales de tetrazolio de carga

negativa, pero es que estas permiten la formación de productos solubles en el medio de cultivo, a diferencia de los productos insolubles de las sales con carga positiva. Ahora, ¿Qué necesidad resuelve la formación de productos coloridos solubles? Permiten simplificar la metodología ya que no resulta necesaria la adición del reactivo que solubiliza al formazán. El mecanismo general (para las sales negativas) consiste en el uso de aceptadores de electrones intermedios como el PMS (fenazina metil sulfato) o el PES (fenazina etil sulfato) los cuales penetran la membrana, son reducidos en el citoplasma y salen de la célula para convertir las sales de tetrazolio en formazán (Riss, Moravec, Niles, & et al., 2021).

Una de las herramientas más versátiles para evaluar la viabilidad celular, la encontramos en el ensayo de reducción de MTT, reacción originada por la reducción de la sal de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio de bromuro (MTT). Precisamente el uso de esta sal ha permitido que el procedimiento se haya podido automatizar a raíz de que en su utilización no es necesario lavado o tratamiento especial alguno. Esta sal pasa de una coloración ligeramente amarilla a una completamente azul al ser reducida. A nivel de mecanismo, esta reacción ocurre en el citoplasma y se extiende a la mitocondria o a la membrana celular. Al reducirse el MTT se generan cristales de formazán que son de color púrpura oscuro (figura 6), la absorción de estos cristales solubilizados se da a los 570 a 590 nm, utilizándose como referencia la lectura de 650 nm. La reducción se encuentra dada por la concentración de NADH y NADPH. La linealidad de este ensayo llega hasta 5×10^4 - 10×10^4 células (Stoddart, 2011).

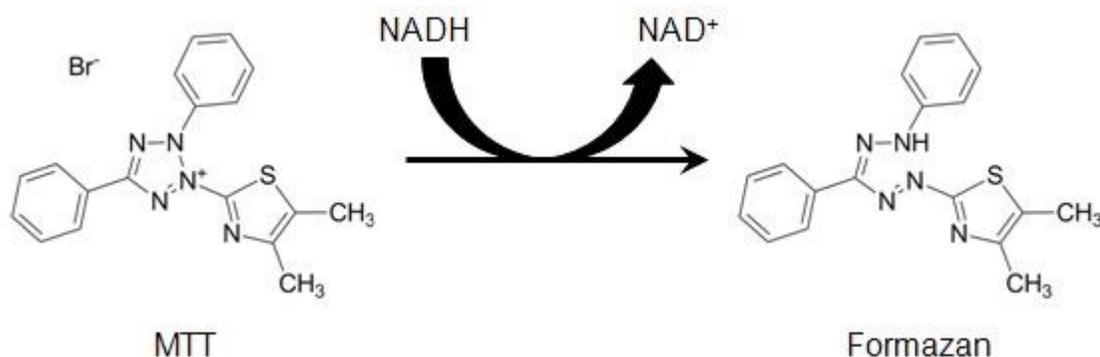


Figura 6. Mecanismo de la reducción de MTT en formazán.

Imagen recuperada de: Riss & Colaboradores, 2021.

Previamente se mencionó que el formazán resultante de la reducción del MTT se acumula como precipitados insolubles que se depositan cerca de la superficie celular o en el medio de cultivo, esto hace que sea obligatorio solubilizarlos para llevar a cabo la lectura de las absorbancias. A nivel técnico los procedimientos de solubilización buscan a su vez estabilizar el color del formazán, evitar la evaporación de este y reducir la interferencia del

rojo de fenol (presente en el medio de cultivo). Algunos reactivos empleados para este fin son: DMSO, dimetilformamida, SDS, isopropanol acidificado (empleado para provocar un vire del medio a amarillo que interfiere en menor medida con la medición) y combinaciones de detergentes y solventes orgánicos (Riss, Moravec, Niles, & et al., 2021).

7. Metodología

7.1. Preparación del quitosán para su utilización

El quitosán fue obtenido a partir del exoesqueleto de camarón pulverizado por el método reportado en la patente de Miranda-Castro del año 2000 (México Patente nº 293022, 2000). Su peso molecular fue de 20.6 kDa y cuenta con un nivel de acetilación que oscila entre el 85-90 %. Su producción y posterior caracterización se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la unidad de posgrados de la Facultad de Estudios Superior Cuautitlán Campo 1 de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se generó un stock de quitosán a una concentración de 1 % p/v el cual fue disuelto en ácido acético al 1 % y ajustado a un pH de 5.5 (anexo 1).

7.2. Generación de bacterias competentes

7.2.1. Formación de bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5α

Las bacterias fueron propagadas en caldo LB (DIFCO™) y se obtuvo a partir de este proceso el botón bacteriano, el cual fue resuspendido en cloruro de calcio 100 mM. Se formaron alícuotas con glicerol al 20% para su congelación y posterior uso.

7.2.2. Generación de bacterias competentes de *Escherichia coli* TOP10

Estas bacterias competentes fueron proporcionadas mediante una colaboración con el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) con ayuda de la Dra. Jessica Filisola.

7.3. Transformación del plásmido pSELECT-zeo-HSV1tk en *Escherichia coli*

7.3.1. Transformación de bacterias *Escherichia coli* DH5α y TOP10.

Por alícuota de bacterias competentes se agregaron 2 µL del plásmido pHSV-TK1 (pSELECT-zeo-HSV1tk de InvivoGen) y se sometió a cada alícuota a un baño de hielo, seguido de un choque térmico a 42°C y seguido nuevamente por un baño de hielo. Luego, se inoculó una placa de agar LB suplementado con el antibiótico zeocina (InvivoGen) [25 mg/mL] y se incubó durante 24 horas, para una posterior resiembra por dilución americana.

7.3.2. Propagación de las bacterias transformadas.

En un litro de caldo LB con zeocina se inoculó una colonia de bacterias transformadas (apartado 7.3.1 de la metodología). Estas bacterias fueron incubadas con agitación de 250 rpm a 37°C durante un periodo mínimo de 16 horas.

7.4. Extracción y purificación del plásmido.

7.4.1. Extracción mediante lisis alcalina.

Fueron centrifugados 1.5 mL de caldo de cultivo inoculado a 14,000 rpm por 5 minutos. La pastilla se conservó y fue resuspendida en la solución de lisis I, se adiciono la solución II y por último se agregó la solución III (el contenido de las soluciones se especifica en el anexo 1) y se centrifugó la muestra, conservándose el sobrenadante, al cual se le adiciono etanol absoluto frio y se dejó reposar a -20°C. Se hizo otra centrifugación a las mismas condiciones, se agregó etanol al 70% y se repitió la centrifugación. La pastilla se resuspendió en agua inyectable con RNasa, y pasados 30 minutos se inactivo la enzima.

7.4.2. Extracción por mega kit QIAGEN ®.

Para realizar la extracción se utilizó el kit comercial QIAGEN ® Plasmid Mega Kit, esta metodología se basa en una extracción por lisis alcalina y su purificación por el uso de una columna de intercambio aniónico por flujo de gravedad. Se siguieron las instrucciones del proveedor para obtener la pastilla de DNA. La pastilla obtenida de este procedimiento se dejó secar y se disolvió en agua libre de nucleasas.

7.4.3. Recuperación de las muestras a partir de gel de agarosa.

Se corrió un gel de electroforesis con agarosa al 1% a 121 milivolts durante 20 minutos. Dentro de este gel la banda de interés (aquella que contenía la isoforma del plásmido deseada) fue recortada y se colocó en un microtubo. Para la extracción del plásmido se utilizó el kit de extracción de gel QIAquick ® de QIAGEN y se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante.

7.4.4. Tratamiento de las muestras por precipitación salina (Salting out).

A las muestras que fueron obtenidas en el apartado 7.4.2 se les adiciono RNasa a cada una, se incubaron a 37°C y se añadió SDS 10% seguido de NaCl 5 M. La mezcla se centrifugo a 10,000 rpm a 4°C por 10 minutos y se conservó el sobrenadante al cual se le añadió isopropanol y se dejaron reposar durante 5 días. Se centrifugó nuevamente y en esta ocasión se preservó la pastilla y se agregó etanol al 70%. Se repitió nuevamente la centrifugación y se conservó la pastilla que fue resuspendida con agua libre de nucleasas.

7.5. Cuantificación del plásmido

Con el uso de un espectrofotómetro EPOCH ® localizado en el laboratorio L521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 UNAM, se realizó la cuantificación de pDNA contenido en las muestras.

7.6. Restricciones enzimáticas con HindIII y EcoRI

Las digestiones se realizaron con las enzimas HindIII y EcoRI de la marca FastGene®, siguiéndose el protocolo normal del fabricante. Fueron usados 0.4 µL de cada enzima y 0.9 µL de plásmido alcanzándose una masa episomal de 3 µg. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 60 minutos.

7.7. Evaluación de integridad del plásmido

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Dentro del gel se cargaron 2 µL del plásmido por pocillo, y la electroforesis se corrió durante 15 minutos a 121 milivolts.

7.8. Ensayos de retardamiento del plásmido con péptido cariofílico

El plásmido 100 ng/ µL se mezcló con los péptidos cariofílicos correspondientes a diferentes concentraciones (P1: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 µM. P2: 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60 µM) manteniéndose una relación de volumen 1 a 1 (los volúmenes utilizados en este ensayo se detallan en el anexo 2). La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos. Posterior a la agitación, los sistemas fueron sometidos a una electroforesis a 121 milivolts por 30 minutos.

La secuencia de los péptidos empleados se muestra a continuación:

Tabla 3. Características de los péptidos cariofílicos empleados en la formación de las nanopartículas.

Denominación	Secuencia	Longitud
Péptido 1	CGGGP KKKRK VED	13 residuos
Péptido 2	PA AKRV KLD	9 residuos

Los aminoácidos subrayados de color amarillo son aquellos que cuentan con una carga positiva. Las letras K representan los residuos de lisina, mientras que la letra R representa a la arginina.

7.9. Ensayos de retención del plásmido-péptido cariofílico con quitosán

Para estos ensayos se prepararon complejos entre el plásmido, el péptido 1 (0.15 µM) y el péptido 2 (0.5 µM). Estos complejos se mezclaron a su vez con quitosán a diferentes concentraciones (0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16 %) (anexo 2) manteniéndose la relación de volumen 1:1:1 entre todos los componentes. Tras la adición del quitosán a los complejos se llevó a cabo una agitación por 30 minutos. Las muestras se cargaron en un gel para realizar una electroforesis a 121 milivolts por 30 minutos.

7.10. Formación de las nanopartículas mediante coacervación compleja

Se mezcló la dilución de plásmido (100 ng/µL) diluido en sulfato de sodio 25 mM (anexo 1), con la solución de péptido cariofílico a la concentración seleccionada

aforada con agua libre de nucleasas, y se mezcló en vortex durante 30 minutos. Por último, se adicionó la solución de quitosán 0.16% aforada con ácido acético al 1% y la agitación se reanuda por 30 minutos más.

7.11. Determinación de potencial zeta y tamaño de partícula.

Estas determinaciones fueron llevadas a cabo en colaboración de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campus 4 UNAM dentro de las instalaciones de la unidad de investigación multidisciplinaria L14-A1 con el apoyo del doctor Abraham Méndez Albores. El equipo empleado para este fin es el Malvern ZetaSizer Pro utilizándose una celda capilar DTS1070, realizando las mediciones a temperatura ambiente (25°C) (los volúmenes de complejo empleados se mencionan en el anexo 3). Las distribuciones de tamaño y potencial zeta fueron ajustadas en una función de correlación por algoritmos del propio equipo.

7.12. Microscopía electrónica de barrido para forma de partícula

Las microfotografías fueron tomadas por colaboración de la Centro de Física Aplicada y Tecnologías avanzadas-UNAM en el laboratorio de caracterización de materiales a cargo de la M. en C. Alicia del Real López. Fue utilizado el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6060LV usándose 20 KeV. El tratamiento que recibieron las muestras fue la colocación de una capa de oro ionizante tras el secado de estas (los volúmenes de complejos empleados se mencionan en el anexo 3).

7.13. Estandarización de las condiciones de transfección

Estos ensayos fueron realizados de la siguiente manera: cuando se alcanzó una confluencia de al menos 60 % se colocaron los complejos con una masa de 10 µg de DNA, y se dejaron en contacto con las células por al menos 16 horas, posterior a eso se llevó a cabo un lavado del medio y se incubaron por 48 horas más, transcurrido este tiempo se llevó a cabo la fijación y tinción con faloidina rodamina y DAPI.

7.14. Ensayo de seguimiento de internalización de nanopartículas

Usando plásmido marcado previamente con yoduro de propidio se ensamblaron nanopartículas como se establece en el apartado “7.10. Formación de las nanopartículas mediante coacervación compleja”. Los complejos fueron usados como tratamiento en las líneas celulares (HeLa y SiHa) dejando que actuaran durante 15, 30 y 60 minutos. Las células se fijaron con paraformaldehído y se tiñeron con DAPI para ser observados en el microscopio de fluorescencia (Zeiss® Axios cope 40 fluorescence microscope) ubicado en el Laboratorio de Servicios de Análisis de Propóleos ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 UNAM a cargo del doctor Tonatiuh Cruz Sánchez.

7.15. Ensayos de viabilidad celular para evaluar funcionalidad biológica

7.15.1. Curva de sensibilidad al ganciclovir en células HeLa y SiHa

En una placa de 96 pozos se sembraron 5,000 células por pozo y se colocaron por triplicado concentraciones de ganciclovir (InvivoGen) (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 µg/mL). Los sistemas se dejaron incubar por 48 horas a 37°C y 5% CO₂, pasado este tiempo se midió la viabilidad celular empleando el kit comercial CyQUANT™ MTT Cell Proliferation Assay Kit de Invitrogen, leyéndose las absorbancias a 570 nm en un lector para microplacas de ELISA BIO-RAD Model 550.

7.15.2. Ensayo de reducción de MTT para evaluar viabilidad celular

Se colocaron 2 µg de masa de DNA manteniendo el tratamiento durante 16 horas, pasado ese tiempo se cambió el medio de cultivo y se adicionó GCV 50 µg/mL continuando la incubación por 48 horas. Se siguió el protocolo rápido del kit CyQUANT™ MTT Cell Proliferation Assay Kit, este protocolo consistió en el remplazo del medio de cultivo, la incubación del MTT, luego se procedió a incubar 4 horas a 37°C, se removió el medio y se añadió DMSO a cada pocillo y se incubo por 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 570 y 595 nm.

7.16. Determinación de niveles de expresión de las nanopartículas mediante RT-PCR

7.16.1. Ensayo de transfección para obtención de mRNA

Fueron sembradas 1x10⁶ células en cajas Petri, a las 24 horas se colocó el tratamiento con una masa de DNA de 28.7 µg, a las 16 horas se realizó un cambio de medio de cultivo y 48 horas después se extrajo el mRNA siguiendo el protocolo del kit GeneJET RNA Purification Kit de Thermo Scientific.

7.16.2. Obtención de RNA de las muestras

Se siguió el protocolo de purificación de RNA a partir de cultivo celular de células de mamífero del kit comercial Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit®. El principio que sigue el kit consiste en la lisis de las células por medio de un buffer, este mismo buffer contiene tiocianato de guanidina que protege al RNA de las RNasas endógenas. Esta sal en adición del etanol provoca que el RNA se una a una membrana de sílice y al bajar la fuerza iónica el RNA puede eluir.

7.16.3. Cuantificación de RNA en las muestras

Se colocaron las muestras obtenidas en el apartado “7.13.1. Obtención de RNA de las muestras” del procedimiento en el espectrofotómetro EPOCH®. Dentro del programa del equipo se seleccionó el protocolo para cuantificar ssRNA. Los datos fueron registrados para ser asentados en la tabla 19.

7.16.4. Obtención de CDNA

Se obtuvo el cDNA usando el kit M-MLV Reverse Transcriptase de la marca Invitrogen®. Preparándose dos mezclas de reacción:

Mezcla 1		Mezcla 2	
Componente	Volumen	Componente	Volumen
Oligo DT 0.5 µg/ µL	1 µL	Master mix	12 µL
dnTPs 10 mM	1 µL	Buffer first strand 5X	4 µL
Muestra	2 µL	DTT	2 µL
Agua libre de nucleasas	12 µL		

La mezcla 1 se colocó 5 minutos a 65°C posteriormente a un baño de hielo, luego se añadió la mezcla 2 y se incubó dos minutos a 37°C y nuevamente a baño de hielo y por último se colocó 1 µL de enzima y se dejó 50 minutos a 37°C. La enzima fue inactivada a 70°C por 15 minutos.

7.16.5. Construcción de los primers y análisis bioinformático.

Los primers fueron diseñados utilizando la herramienta bioinformática Primer-Blast del NCBI, usándose la base de datos Refseq mRNA con filtros de búsqueda para productos inespecíficos de *Homo sapiens*; posteriormente se evaluaron las interacciones entre primers con OligoAnalyzer™ del IDT (la secuencia, así como los valores para la formación de interacciones están registrados en el anexo 6). Los oligos fueron mandados a sintetizar con T4 Oligo.

7.16.6. PCR de gradiente T para optimizar la temperatura de fusión (tm) de los cebadores

La reacción fue llevada a cabo en el termociclador Eppendorf Mastercycler® gradient. Para la realización de la reacción se realizó el siguiente protocolo.

Tabla 4. Programa de PCR de gradiente T utilizado para la optimización de la tm.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg	25
Alineamiento	Ta: 53°C G: ±10°C	30 seg	
Elongación	72°C	45 seg	
Elongación final	72°C	7 min	
Mantener	4°C	Indefinido	1

Los amplicones resultantes fueron evaluados en un gel de electroforesis cargado con marcador de peso molecular, un control de plásmido sin procesar y fueron sometidos a una electroforesis a 96 mV por 23 minutos.

7.16.7. RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa fue llevada a cabo con el kit Roche Titan One Tube RT-PCR System[®], usándose el siguiente programa:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Preincubación	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg	25
Alineamiento	57°C	30 seg	
Elongación	72°C	45 seg	
Elongación final	72°C	7 min	1
Mantener	4°C	Indefinido	1

7.16.8. Evaluación del amplificado:

Se preparo un gel de electroforesis a condiciones estándar y se cargó con las muestras, entre ellas un control que contenía un marcador de peso molecular y se dejó la electroforesis a 121 milivolts por 30 minutos.

8. Resultados

8.1. Propagación del plásmido pHSV-TK1

Tras la recepción de la alícuota comercial que contenía el plásmido pSELECT-zeo-HSV1tk, esta fue resuspendida en un volumen de agua inyectable para llevarlo a una concentración de 10 ng/μL. A esta solución se le determinó la concentración mediante espectrofotometría y su integridad fue evaluada por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, los resultados de esto están asentados en la tabla 5 y la figura 7, respectivamente.

Tabla 5. Concentración del stock de plásmido pHSV-TK resuspendido.

	Lectura 1	Lectura 2
Abs 260 nm	0.012	0.008
Abs 280 nm	0.006	0.003
Relación 260/280	2.018	2.394
[ng/μL]	11.566	8.046

La concentración promedio obtenida fue de 9.806 ng/μL lo que ratifica la información proporcionada por InvivoGen[®].

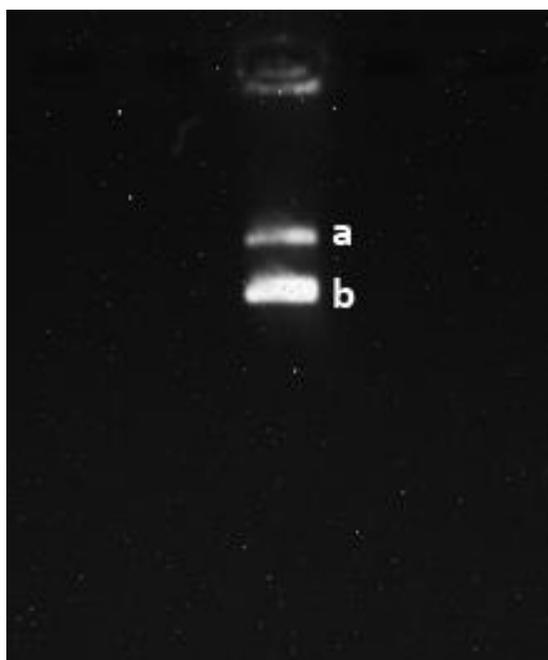


Figura 7. *Electroforesis en gel de agarosa 1% para la evaluación de integridad del stock del plásmido.*

El gel de electroforesis presenta dos bandas las cuales corresponden: a la forma relajada del plásmido (a) y a la forma superenrollada del plásmido (b) siendo esta ultima la predominante.

A partir de la solución stock de plásmido se realizó la transformación de las bacterias de *Escherichia coli DH5α* conforme se indica en la metodología en el apartado “7.3.1. Transformación de bacterias *Escherichia coli DH5α*” y se le extrajo el plásmido acorde a la sección “7.4.2. Extracción por mega kit QIAGEN®”, las concentraciones de las muestras obtenidas se encuentran asentadas en la tabla 6.

Tabla 6. *Solución de plásmido a partir de la purificación por el mega kit de QIAGEN.*

	Alícuota 1		Alícuota 2		Alícuota 3		Alícuota 4		Alícuota 5		Alícuota 6	
	Lec 1	Lec 2										
Relación 260/280	2.15	1.74	2.13	1.61	1.76	1.98	2.13	2.15	2.39	1.97	2.22	1.85
[ng/μL]	13.8	12.6	15.9	10.5	14.6	14.6	16.2	15.4	24.1	22.1	10.9	10.8

Las concentraciones de plásmido obtenidas no contaban con la concentración necesaria para la realización de las siguientes etapas del procedimiento, además de que la relación a 260/280 nm para determinadas alícuotas parecía señalar contaminación con RNA al estas encontrarse por fuera del intervalo de referencia (1.8-2.0).

A estas muestras se les corrió una electroforesis en gel de agarosa 1% con la finalidad de evaluar la integridad del plásmido extraído (figura 8).

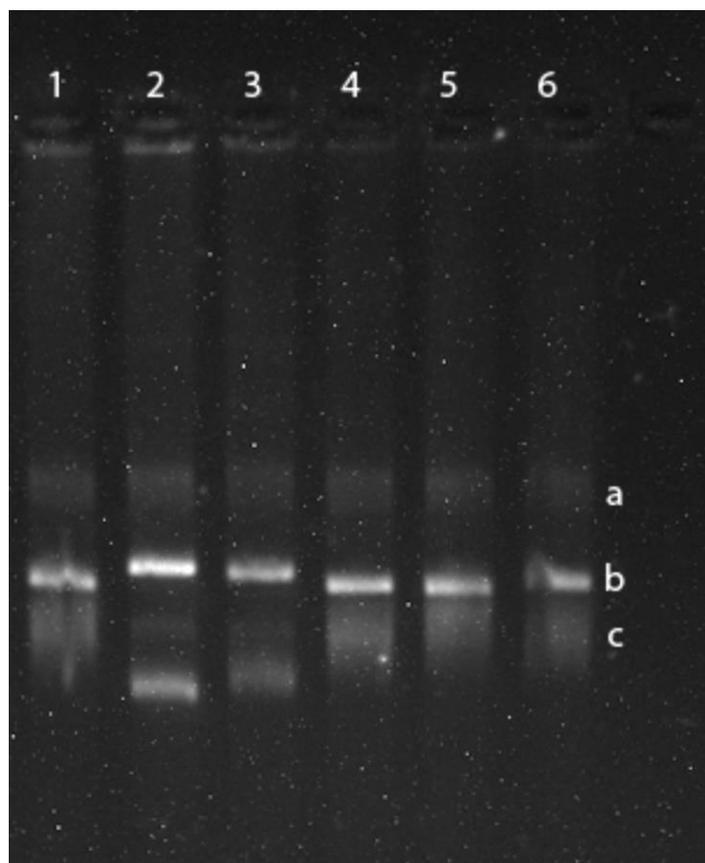


Figura 8. *Electroforesis de las soluciones purificadas de plásmido.*

En la parte superior de la figura se encuentra señalado que muestra fue cargada en cada uno de los pocillos. La banda señalada con la letra a, corresponde a la forma lineal. La banda b está mucho más definida y esta puede corresponder a una forma del plásmido enrollada sin llegar a ser superenrollada. Por último, la banda c tiene un comportamiento similar al de la banda a y se puede interpretar como diferentes grados de enrollamiento del plásmido.

A raíz del bajo rendimiento obtenido se decidió mezclar las muestras de los plásmidos con la finalidad de que después de desecarlas en una estufa a 40°C y se lleve a una concentración mayor al haber sido resuspendida en agua libre de nucleasas. Los resultados de concentración y de integridad de esta solución se encuentran en la tabla 7 y la figura 9.

Tabla 7. *Concentración de plásmido de DNA concentrado.*

	Lectura 1	Lectura 2
Relación 260/280	1.739	1.728
[ng/μL]	89.145	98.413

La concentración esperada para la solución de plásmido correspondía a 100 ng/ μ L, las discrepancias en concentraciones son a raíz de las variaciones de las medidas de la concentración de las muestras a partir de las cuales se preparó esta solución.

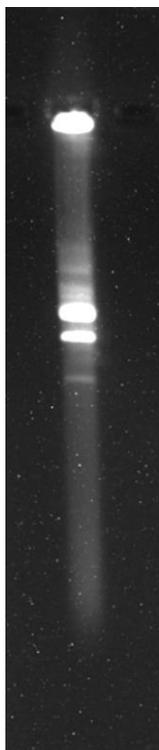


Figura 9. *Electroforesis de la muestra de plásmido concentrado.*

Se visualiza un barrido de fondo en la muestra, aunque se resalta la presencia de múltiples bandas que corresponden a isoformas del plásmido, por esta situación se descartó la misma.

Dada la presencia de bandas no identificadas y una probable degradación se optó por aumentar el tiempo de incubación de la propagación de las bacterias, debido a que al pasarse las 17 horas el caldo de cultivo no contaba con una turbidez considerable. Por ende, el tiempo de incubación fue incrementado hasta 23 horas, aunque la turbidez se había alcanzado alrededor de las 20 horas de incubación. Se tomaron alícuotas de 1.5 mL de caldo de cultivo a las 21, 22 y 23 horas de incubación, y a estas alícuotas se les realizó lisis alcalina para extraer el plásmido, como está indicado en la metodología, las concentraciones obtenidas y el gel de electroforesis se encuentran en la tabla 8 y la figura 10, respectivamente.

Tabla 8. Concentración de plásmido extraído mediante lisis alcalina a diversos tiempos de incubación.

	Sistema 1 21 hrs incubación		Sistema 2 21 hrs incubación		Sistema 1 22 hrs incubación		Sistema 2 22 hrs incubación		Sistema 1 23 hrs incubación		Sistema 2 23 hrs incubación	
	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2
Relación 260/280	2.12	2.10	2.14	2.14	2.09	2.11	2.11	2.13	2.14	2.12	2.18	2.17
[ng/ μ L]	732. 907	714. 147	1068 .01	1047 .9	796. 083	762. 203	1003 .32	1010 .65	821. 995	824. 232	1219 .17	1208 .76

Se observa una notable diferencia en concentraciones entre el sistema 1 y el sistema 2. Lo anteriormente dicho se confirma debido a que el sistema 2 presentaba una turbidez mayor con respecto al sistema 1.

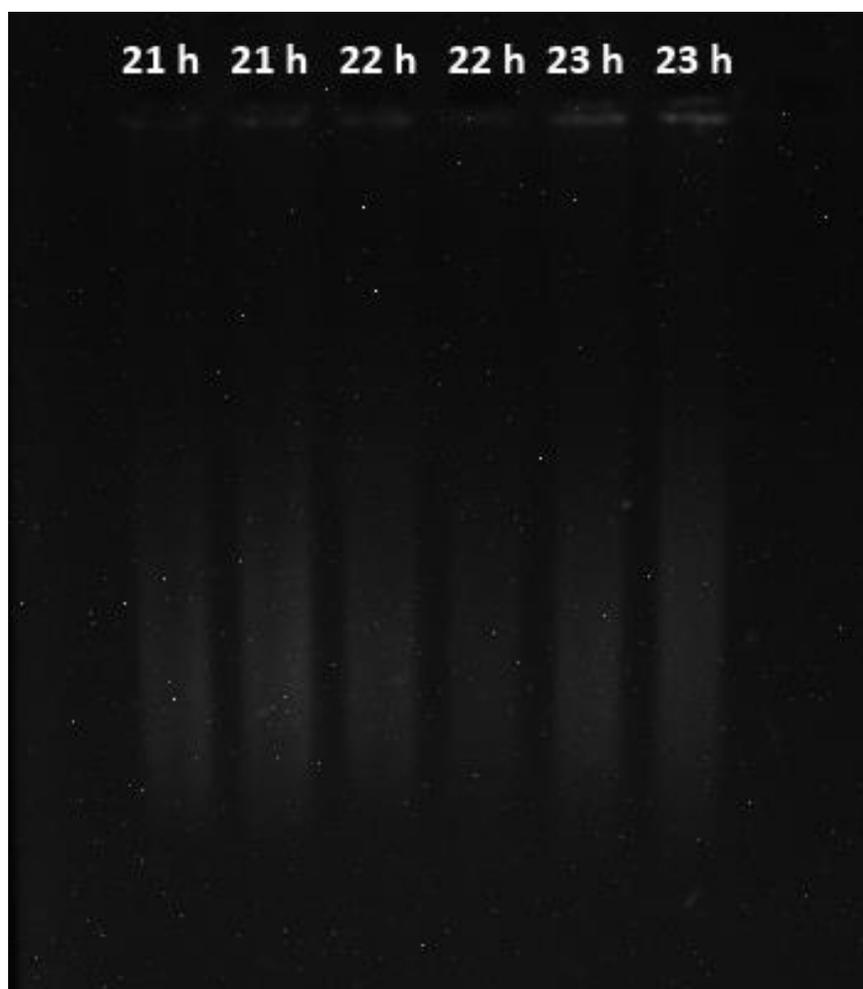


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de las lisis alcalinas en distintos tiempos de incubación. Se observó un barrido uniforme a lo largo del gel de electroforesis.

Al obtenerse concentraciones elevadas de plásmido por medio de la lisis alcalina, se decidió continuar con la extracción con el mega kit QIAGEN a pesar de que el gel de electroforesis no era claro, las concentraciones obtenidas (tabla 9) fueron considerablemente menores a las obtenidas de la lisis alcalina del mismo caldo de cultivo, y el gel de electroforesis presentaba el mismo comportamiento mostrado en el gel anterior.

Tabla 9. Concentraciones de plásmido obtenido mediante mega kit QIAGEN.

	Alícuota 1		Alícuota 2		Alícuota 3		Alícuota 4		Alícuota 5		Alícuota 6	
	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2
Relación 260/280	1.87	1.84	1.85	1.86	1.89	1.87	1.93	1.94	1.95	1.91	1.90	1.89
[ng/μL]	51.3 31	45.1 72	365. 171	353. 016	268. 108	252. 644	61.8 75	72.2 08	25.6 76	29.9 47	443. 449	438. 917

Ante esta situación se decidió cambiar la cepa bacteriana a ser transformada escogiéndose la cepa de *Escherichia coli* TOP10. Estas bacterias fueron transformadas y propagadas en 1 litro de caldo de cultivo. De este caldo de cultivo se tomaron dos alícuotas de 1.5 mL y fueron sometidas a lisis alcalina para extraer el plásmido obteniéndose concentraciones adecuadas (> 200 ng/μL) (tabla 10) y teniendo una buena integridad (figura 11).

Tabla 10. Concentración plásmido de TOP10 obtenidas mediante lisis alcalina.

	Alícuota 1		Alícuota 2	
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 1	Lectura 2
Relación 260/280	1.239	1.25	1.991	2.001
[ng/μL]	3636.67	3633.26	3410.68	3407

Para la alícuota 1 la relación 260/280 fue muy baja lo que indica contaminación por proteínas.

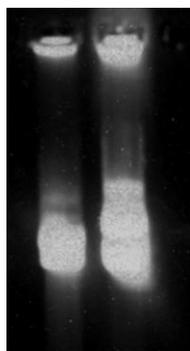


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1% del plásmido obtenido mediante lisis alcalina.

El patrón tan intenso de tinción se debe a la alta concentración de plásmido contenido en las muestras. A su vez, el ligero barrido que se observa en el gel se adjudica a la concentración del

plásmido. La retención del pDNA en los pozos puede atribuirse a la presencia de proteínas, lo cual correlaciona con los valores de A260/280 reportados en la tabla 10.

Posteriormente se extrajo el plásmido con el mega kit QIAGEN® y las concentraciones fueron favorables (tabla 11) aunque las relaciones 260/280 indican una contaminación por proteínas lo que se comprueba con el gel de electroforesis mostrado en la figura 12.

Tabla 11. Resultados de la cuantificación de pHSV-1tk proveniente de las bacterias TOP10.

	Alícuota 1		Alícuota 2		Alícuota 3		Alícuota 4		Alícuota 5		Alícuota 6	
	Lec 1	Lec 2										
Relación 260/280	1.25	1.64	1.48	1.94	1.12	1.28	1.23	1.24	1.89	1.91	1.13	1.13
[ng/μL]	3700	3583	3667	2350	3668	3639	3691	3681	3032	2975	3675	3640
	.21	.72	.93	.92	.46	.82	.29	.72	.74	.9	.38	.79

Las relaciones a 260/280 se encuentran debajo de los valores de referencia (1.8-2.0) lo que parece indicar contaminación con proteínas.

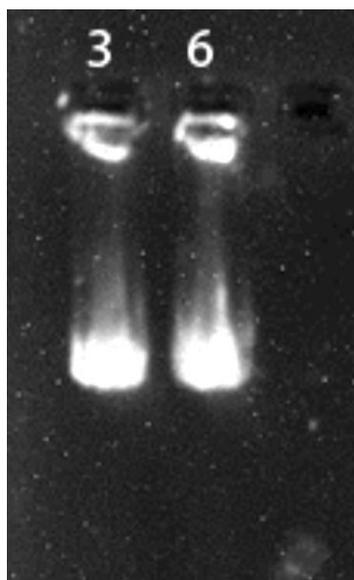


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1% de pHSV-1tk purificado a partir de las bacterias TOP10 de las alícuotas 3 y 6 (tabla 11)

Dentro del gel no se observaron las bandas correspondientes a las isoformas del plásmido, viéndose en su lugar una única banda con un patrón intenso de tinción.

La presencia de proteínas en la muestra se trató primeramente mediante una extracción en gel de agarosa de las bandas correspondientes a las isoformas de interés del plásmido. A estos fragmentos de gel extraído fueron sometidos a un kit de extracción de material

genético a partir de gel de agarosa. Al determinar la concentración (tabla 12) la relación 260/280 de la muestra extraída presento un valor optimo.

Tabla 12. Purificación de DNA mediante el kit QIAQuick Gel Extraction Kit a partir de gel de agarosa

1%.

	Lectura 1	Lectura 2
Abs 260 nm	0.208	0.138
Abs 280 nm	0.107	0.071
Relación 260/280	1.938	1.962
[ng/ μ L]	207.984	138.419

En paralelo se realizó un protocolo de precipitación salina o *salting out* empleando cloruro de sodio, cuya finalidad era precisamente la de eliminar las proteínas contenidas en las muestras de manera más práctica, si bien es cierto que no se había comprobado en ese punto que la presencia de proteínas fuera capaz de interferir en el proceso de formación de los nanocomplejos, era necesario eliminar la mayor cantidad de las proteínas contenidas en las muestras. Tras este procedimiento se observó una mejoría en la relación 260/280.

Tabla 13. Cuantificación de las muestras después de realizar precipitación salina.

	Alícuota 1		Alícuota 2		Alícuota 3		Alícuota 4		Alícuota 5		Alícuota 6	
	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2	Lec 1	Lec 2
Relación 260/280	1.44	1.87	1.90	1.84	1.45	1.45	1.74	1.75	1.45	1.45	1.14	1.12
[ng/ μ L]	3635 .91	3110 .48	2891 ,96	2684 ,92	3679 .43	3637 .4	3438 .4	3441 .78	3678 .3	3659 .41	3639 .38	3665 .74

La precipitación salina fue realizada en dos tandas, haciéndose primeramente para las muestras 3 y 5. Después de que se les determinara su concentración se evaluó la integridad mediante un gel de electroforesis (figura 13). Posteriormente, se les realizó este tratamiento al resto de las muestras, corriéndose igualmente una electroforesis para evaluar su integridad y pureza (figura 14).

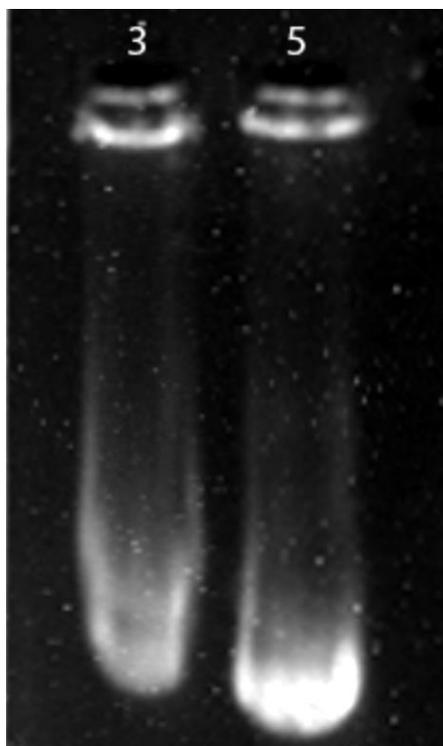


Figura 13. *Electroforesis de muestras 3 y 5 (Tabla 13) después de realizarse la precipitación salina. La migración ligeramente irregular se atribuye a la gran cantidad de pDNA sujeto a migración.*

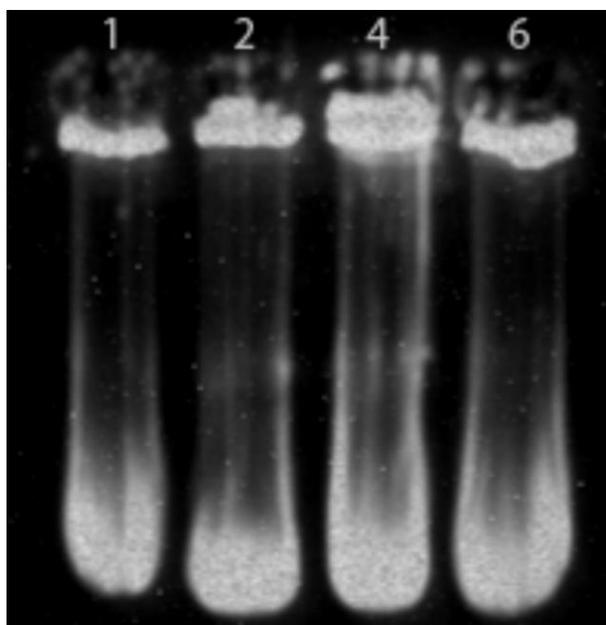


Figura 14. *Electroforesis en gel de agarosa 1% de las muestras, 1, 2, 4 y 6 (Tabla 13) después de hacerse la precipitación salina.*

Una vez las muestras ya contaban con las concentraciones y purezas adecuadas para trabajar se realizó una digestión enzimática con la finalidad de asegurar la integridad del

plásmido, se realizó por duplicado una digestión con la enzima EcoRI para linealizar el plásmido y una doble digestión con EcoRI y HindIII, esta digestión se muestra en la figura 15.

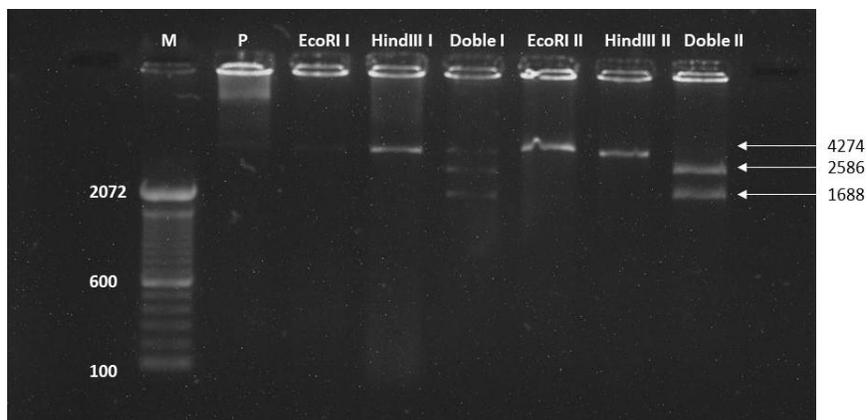


Figura 15. Restricción enzimática del plásmido pHSV-TK1 con EcoRI y HindIII. Marcador de peso molecular (M) (Thermofisher), plásmido pHSV-TK (P), plásmido linealizado con HindIII (HindIII I y II) y plásmido doblemente digerido con EcoRI y HindIII (doble).

8.2. Ensayos de retención y retardamiento de las nanopartículas.

Con la finalidad de evaluar si la presencia de proteínas interfería al momento de hacer los ensayos de retardamiento/retención, se realizó un ensayo de “retardamiento” con el péptido cariofílico “1” a una concentración de 0.2 μ M (concentración determinada como óptima para el plásmido pEGFP el cual es un plásmido de tamaño similar a pHSV-TK) y las alícuotas de plásmido obtenido por: lisis alcalina, mega kit, muestra utilizada para la extracción de gel por medio de kit y la alícuota generada tras la purificación a partir del gel de agarosa (figura 16).

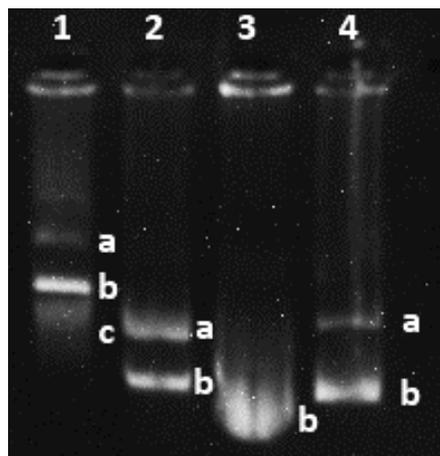


Figura 16. Ensayo de retardamiento con la finalidad de evaluar la interferencia por proteínas. Las muestras están cargadas en el siguiente orden: 1) Lisis alcalina, 2) Mega Kit QIAGEN, 3) Muestra 3 utilizada para realizar la extracción del gel y 4) Muestra purificada por el kit de extracción del gel.

Isoforma lineal del plásmido (a), forma enrollada del plásmido (b) y distintos grados de enrollamiento del plásmido (c). En lo referente a los resultados se observa un comportamiento similar entre la muestra obtenida por Mega Kit y la extraída a partir del gel, las cuales a su vez son comparables con el plásmido del fabricante (Figura 7).

Los resultados anteriores demuestran que la presencia de proteínas no afecta la interacción electrostática entre el plásmido y el péptido cariofílico. Estas muestras ya se consideraban aptas para realizar los ensayos de retardamiento entre la muestra del plásmido (muestra 3) diluido a una concentración de 100 ng/μL y los péptidos 1 y 2, generándose el gel esquematizado en la figura 17.

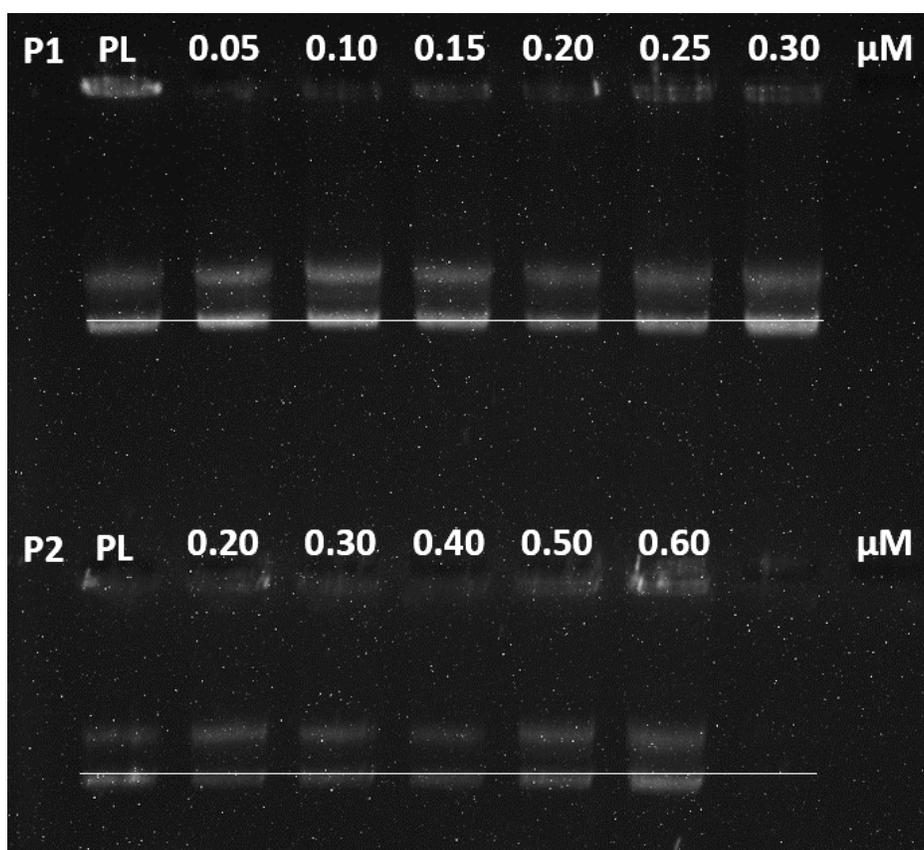


Figura 17. *Ensayo de retardamiento entre el plásmido pHSV-TK y los péptidos cariofílicos 1 y 2.* En la figura se muestra en la primera fila el ensayo de retardamiento entre el péptido cariofílico 1 (P1), mientras que en la segunda fila se encuentra el ensayo del péptido cariofílico 2 (P2). La línea se localiza en el límite superior de la banda de la isoforma enrollada del plásmido libre a una concentración 100 ng/μL (PL).

Posteriormente, se realizó el ensayo de retención siendo empleadas las concentraciones de 0.10 μM para el péptido 1 y 0.4 μM para el péptido 2. Se prepararon soluciones entre la

dilución del plásmido (100 ng/ μ L) y las concentraciones seleccionadas de los péptidos, mezclándose estas con diferentes concentraciones de quitosán corriéndose en ensayo de retención (figura 18).

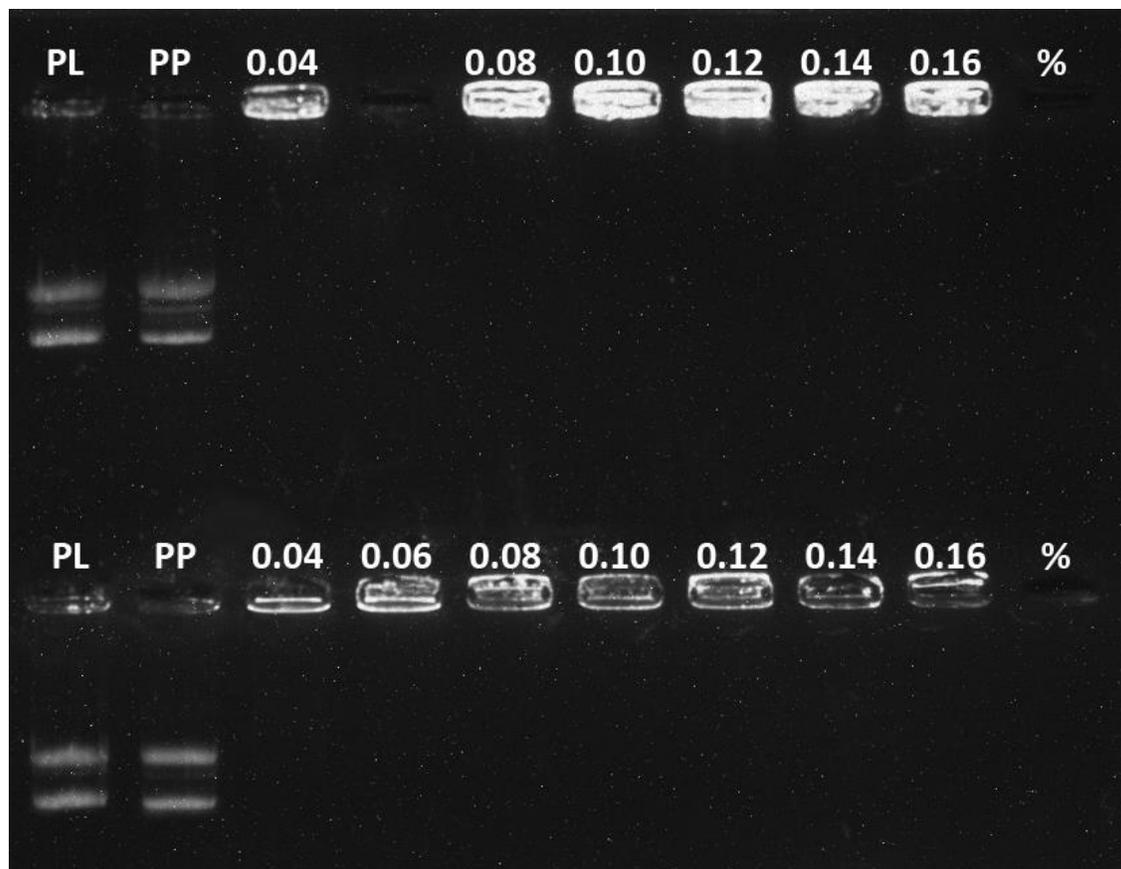


Figura 18. *Ensayo de retención de los complejos pDNA/péptido cariofílico y quitosán.*

En el carril marcado como PL se cargó la solución de pDNA [100 ng/ μ L], el carril PP contiene una mezcla de pDNA y el péptido cariofílico (péptido 1 en la primera fila y el péptido 2 en la segunda), después de estos carriles se cargaron las preparaciones con las diferentes concentraciones de quitosán (porcentuales). En la fila 1 todas las muestras contenían péptido 1 y en la fila 2 las muestras se prepararon con el péptido 2.

Tras este ensayo se decidió aumentar ligeramente las concentraciones de trabajo de los péptidos cariofílicos, usándose 0.15 μ M y 0.5 μ M para los péptidos 1 y 2, respectivamente. A su vez, se aumentaron las concentraciones empleadas del quitosán para este ensayo, usándose una concentración de hasta 0.20 %, este ensayo está asentado en la figura 19.

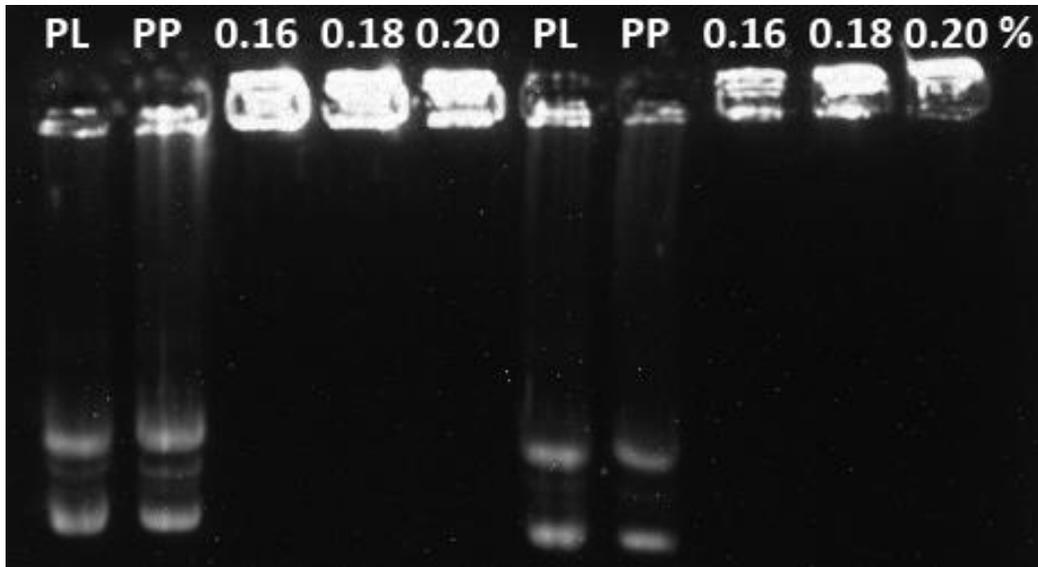


Figura 19. *Ensayo de retención con las concentraciones aumentadas de quitosán.*

En los pocillos marcados con la letra M se cargaron controles de pDNA a una concentración de 100 ng/ μ L, en los pocillos P se colocó un control de pDNA/péptido con las nuevas concentraciones de los péptidos.

La concentración que se escogió de quitosán correspondía a 0.16 %. Con la finalidad de garantizar la correcta formación de los complejos, se determinó el pH de las muestras, siendo este de 4.5. Este pH se considera debajo del valor deseado y podía comprometer a las nanopartículas, por lo cual se hizo un experimento, en el que se decidió cambiar la concentración del ácido acético utilizado para el aforo de las soluciones de quitosán, usándose a 0.1 % (previamente se usaba 1%). Al hacerse este cambio el pH de las muestras era de 7. Se corrió un gel utilizándose la muestra con concentración de 0.16 % de quitosán de pH 4.5 y pH 7 (figura 20).

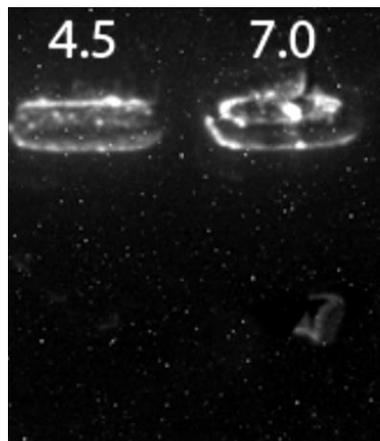


Figura 20. *Efecto del pH en la retención del pDNA.*

No se observan diferencias entre ambos pocillos.

8.3. Eficiencia de acoplamiento del ligando GRP a los nanocomplejos

Con el objetivo de determinar si la reacción de unión entre el GRP con puentes disulfuro y las nanopartículas unidas al SPDP fue exitosa y en qué medida, se hizo un barrido espectrofotométrico UV-Visible desde los 300 a los 800 nm (figura 21).

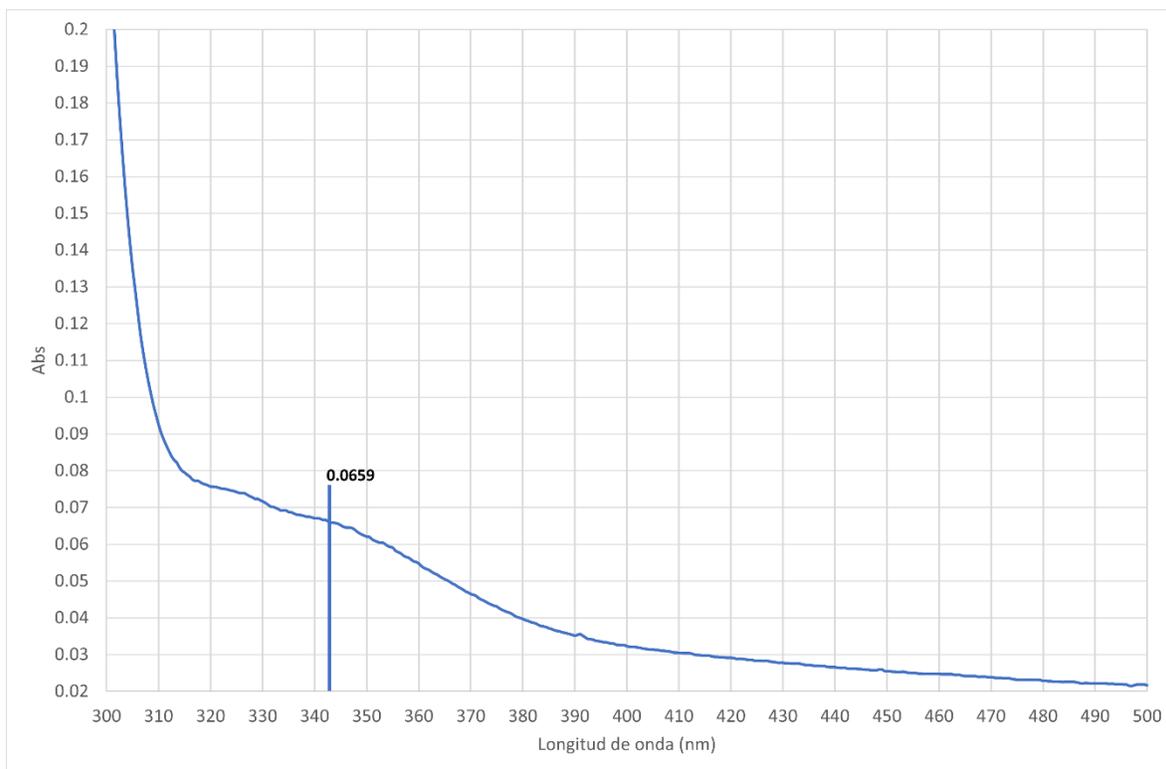


Figura 21. Barrido espectral (300-800 nm) de los complejos entre nanopartículas y GRP.

La lectura de absorbancia a 343 nm (0.0659) se utilizó para determinar el porcentaje de eficiencia de reacción (anexo 5), siendo este de 59.92%, valor considerado como adecuado.

8.4. Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas obtenido a partir de dispersión dinámica de la luz (DLS).

Se realizaron en total cuatro determinaciones de tamaño y potencial zeta de los complejos, en cada una de las sesiones se analizaron complejos de reciente formación (menor a 24 horas), procurando que estos complejos fueran diluidos en agua libre de nucleasas. Para la primera lectura se diluyeron 500 μ L de nanopartículas y se llevaron a un volumen de 1 mL, mientras que para el resto de las mediciones se diluyeron 250 μ L de complejos al mismo volumen de aforo. En la figura 22 se muestran las gráficas resultantes de las

determinaciones de tamaño de partícula, mientras que en la figura 23 están localizadas las mediciones del potencial zeta. En la figura 24 se registra la determinación de tamaño y potencial zeta para los sistemas con GRP. En adición en la tabla 14 se registraron los índices de polidispersión (medida de dispersión en cada uno de los sistemas).

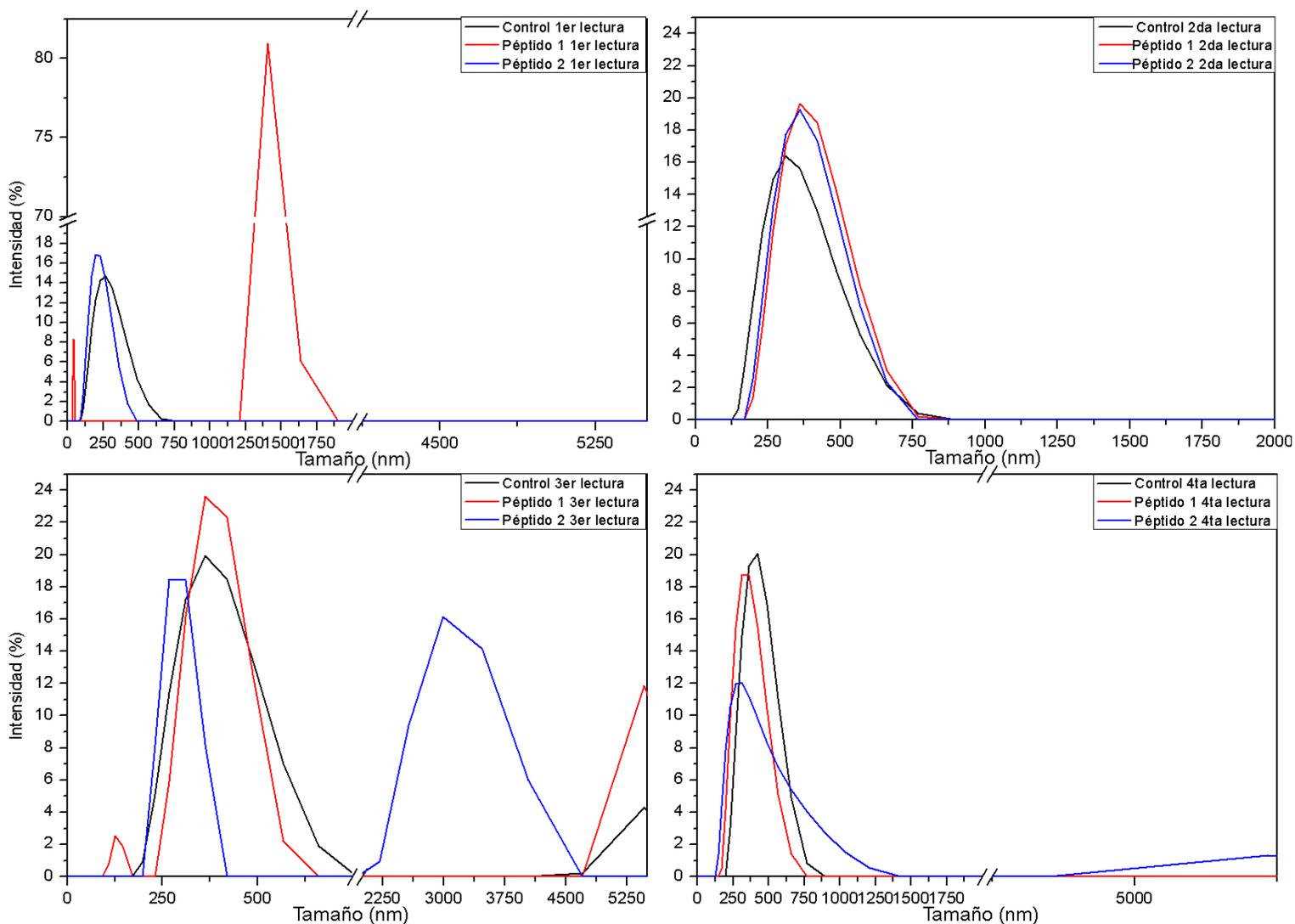


Figura 22. Gráfico de las determinaciones de tamaño de los complejos.

El tamaño promedio para las muestras proporcionado por el equipo fue: Primera lectura, Control 273 nm, nanopartículas con péptido 1 1420 nm y nanopartículas con péptido 2 220 nm. Segunda lectura, Control 342 nm, péptido 1 388 nm y péptido 2 374 nm. Tercera lectura, Control 382.7 nm, péptido 1 385.4 nm y péptido 2 291 nm. Cuarta lectura, Control 416 nm, péptido 1 353.7 nm y péptido 2 399.5 nm.

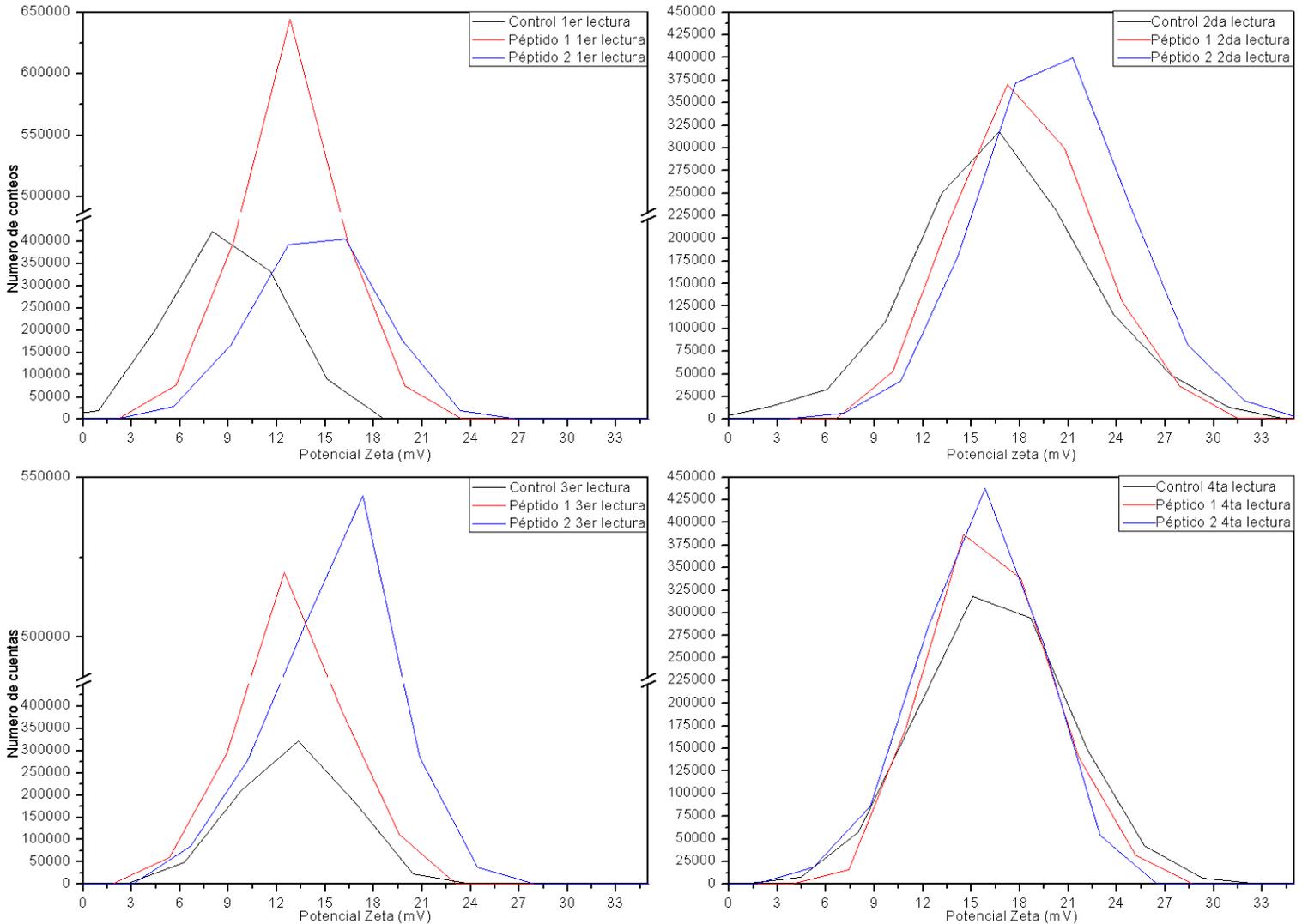


Figura 23. Gráfico de las mediciones de potencial zeta de las diferentes muestras.

El potencial zeta promedio para las muestras proporcionado por el equipo fue: Primera lectura, Control 8.93 mV, nanopartículas con péptido 1 12.83 mV y nanopartículas con péptido 2 14.47 mV. Segunda lectura, Control 16.86 mV, péptido 1 18.35 mV y péptido 2 20.15 mV. Tercera lectura, Control 12.97 mV, péptido 1 12.97 mV y péptido 2 215.34 mV. Cuarta lectura, Control 16.49 mV, péptido 1 16.19 mV y péptido 2 15.44 mV.

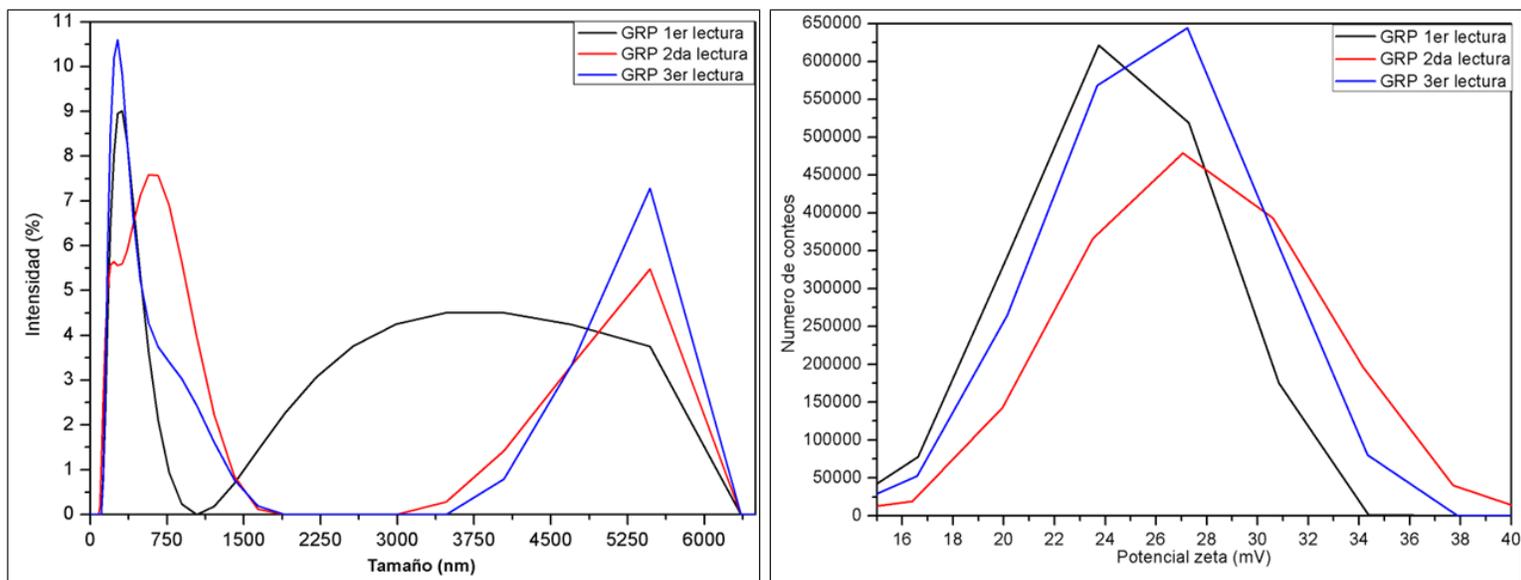


Figura 24. Determinación de tamaño y potencial zeta de complejos formulados con GRP.

Tamaño (izquierda) y potencial zeta (derecha). Valores representativos de tamaño y potencial zeta para cada lectura: Línea negra: 332.7 nm y 24.49 mV; Línea roja: 405.6 nm y 25.91 mV; Línea azul: 601.9 y 27.46 mV.

Tabla 14. Índices de polidispersión de cada uno de los sistemas en las diferentes mediciones.

Medición	Control	Péptido 1	Péptido 2	GRP
Primera	0.232	1.99	0.28	0.4812
Segunda	0.116	0.0511	0.0742	0.5931
Tercera	0.6143	1.0380	0.999	0.5918
Cuarta	0.8969	0.641	0.6523	

El valor de corte para el índice de polidispersión (IPD) es de 0.5 en donde los sistemas por debajo de este valor son considerados como sistemas monodispersos y aquellos que superan el límite se denominan polidispersos.

Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis estadístico t de student de dos colas para muestras que cuentan con varianzas desiguales, los valores promedio, intervalo de confianza, P de dos colas, así como la interpretación de la comparación de cada uno de los sistemas al ser comparados entre sí para los diferentes parámetros se encuentran representados en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados prueba t de student para datos con varianzas desiguales.

Muestra	Tamaño	P(T<=t)	Interpretación	Potencial Z (mV)	P(T<=t)	Interpretación	IPD	P(T<=t)	Interpretación
Control	353.43 ± 60.33	0.53 3123 278	No Diferencia significativa	13.81 ± 3.62	0.441 1845 6	No Diferencia significativa	0.32 ± 0.21	0.755 3767 15	No Diferencia significativa
Péptido 1	375.70 ± 21.61			15.84 ± 3.06			0.44 ± 0.22		
Control	353.43 ± 60.33	0.55 1306 181	No Diferencia significativa	13.81 ± 3.62	0.310 8813	No Diferencia significativa	0.32 ± 0.21	0.605 2255 22	No Diferencia significativa
Péptido 2	321.13 ± 80.16			16.35 ± 2.52			0.45 ± 0.39		
Control	353.43 ± 60.33	0.35 7713 122	No Diferencia significativa	13.81 ± 3.62	0.003 9841 7	Diferencia significativa	0.32 ± 0.21	0.107 6813 42	No Diferencia significativa
GRP	446.73 ± 157.56			25.95 ± 1.68			0.56 ± 0.07		
Péptido 1	375.70 ± 21.61	0.28 7977 17	No Diferencia significativa	15.84 ± 3.06	0.812 2570 8	No Diferencia	0.44 ± 0.22	0.981 2021 96	No Diferencia significativa
Péptido 2	321.13 ± 80.16			16.35 ± 2.52			0.45 ± 0.39		
Péptido 1	375.70 ± 21.61	0.47 3653 03	No Diferencia	15.84 ± 3.06	0.010 8443 6	Diferencia significativa	0.44 ± 0.22	0.737 6196 43	No Diferencia significativa
GRP	446.73 ± 157.56			25.95 ± 1.68			0.56 ± 0.07		
Péptido 2	321.13 ± 80.16	0.25 7987 725	No Diferencia significativa	16.35 ± 2.52	0.001 5758 8	Diferencia significativa	0.45 ± 0.39	0.627 4575 02	No Diferencia significativa
GRP	446.73 ± 157.56			25.95 ± 1.68			0.56 ± 0.07		

Las tablas detalladas del análisis estadístico se encuentran en el anexo 7.

8.5. Estabilidad de las nanopartículas en función del tiempo

Los sistemas utilizados para la segunda y la cuarta dispersión dinámica de la luz fueron seleccionados para llevar a cabo estudios de estabilidad de las nanopartículas a lo largo del tiempo. Para este fin, se repitieron las determinaciones al haber transcurrido un mes (1 mes y nueve días) (muestras cuarta medición) y a los tres meses (tres meses y seis días) (muestras segunda medición) de haberse preparado las nanopartículas. A continuación, se muestran las gráficas de cada uno de los sistemas conforme el transcurso del tiempo.

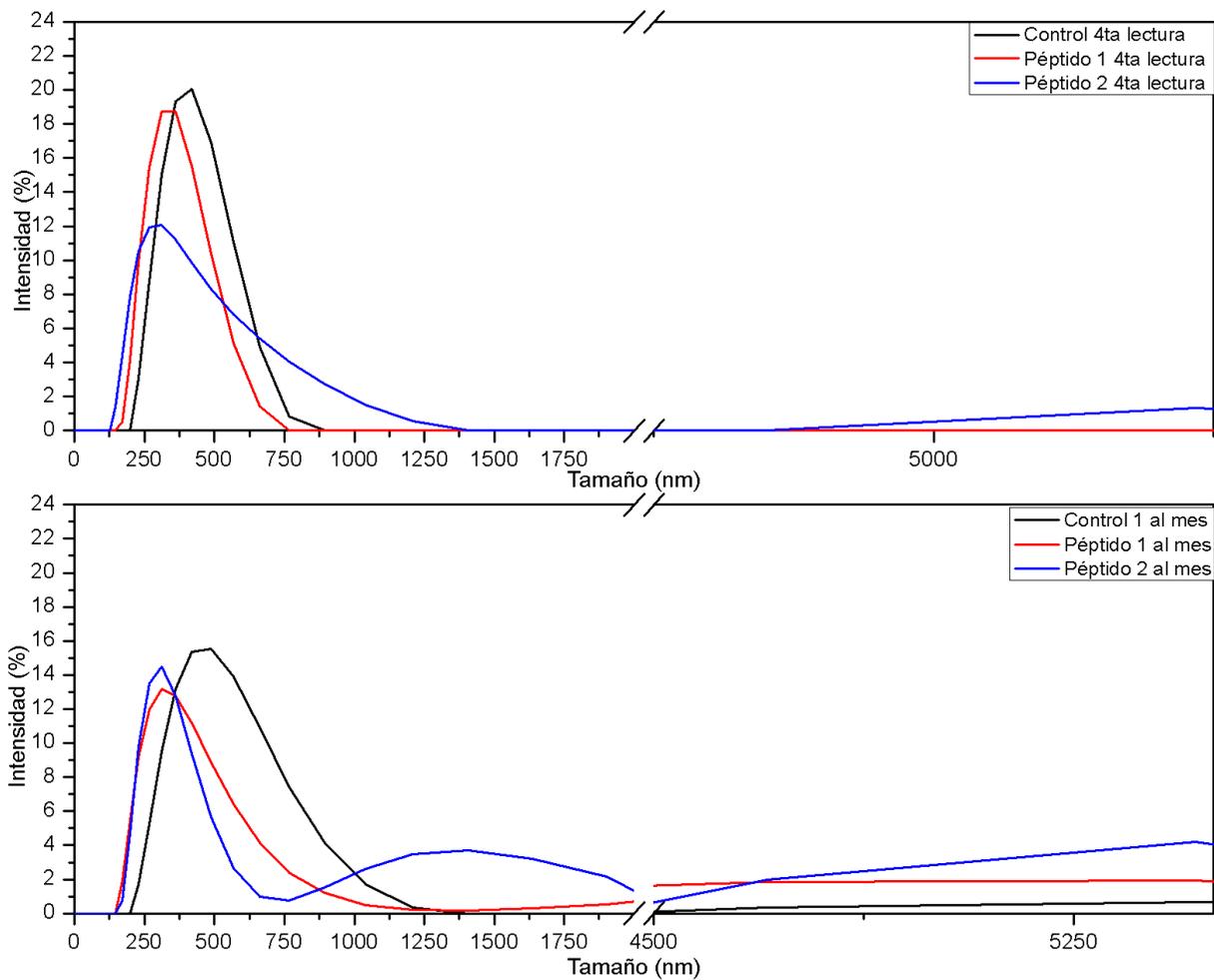


Figura 25. Gráfico de tamaño de los complejos al mes de la preparación de las muestras.

El gráfico superior es la medición del tamaño de cada una de las condiciones experimentales a menos de 24 horas de su formación, mientras que en el gráfico inferior se localiza la determinación transcurrida un mes de la preparación. Los valores máximos de intensidad de localizan para los sistemas de reciente síntesis en: Control 416 nm, péptido 1 353.7 nm y péptido 2 399.5 nm. Al mes sus valores fueron de 508 nm, 388.4 y 337.9, respectivamente.

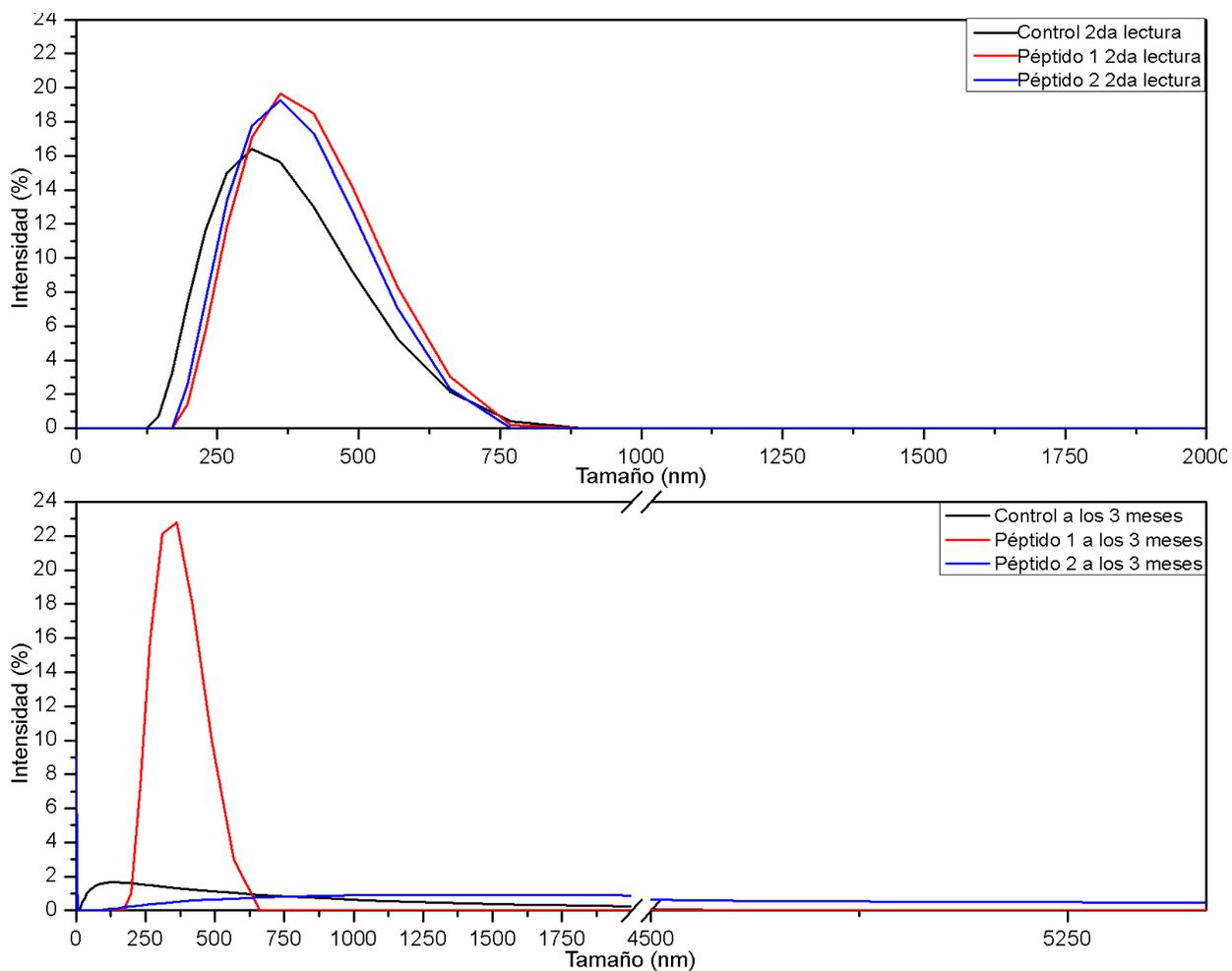


Figura 26. Gráfico de tamaño de los complejos a los tres meses de la preparación de las muestras. El gráfico superior corresponde a la determinación realizada tras la síntesis y el gráfico inferior a la llevada a cabo a los tres meses. Los valores de tamaño originales y a los tres meses fueron: control 342 nm y 1.255 nm, péptido 1 388 nm y 353.4 nm y para el péptido 2 374 nm y 1.548 nm.

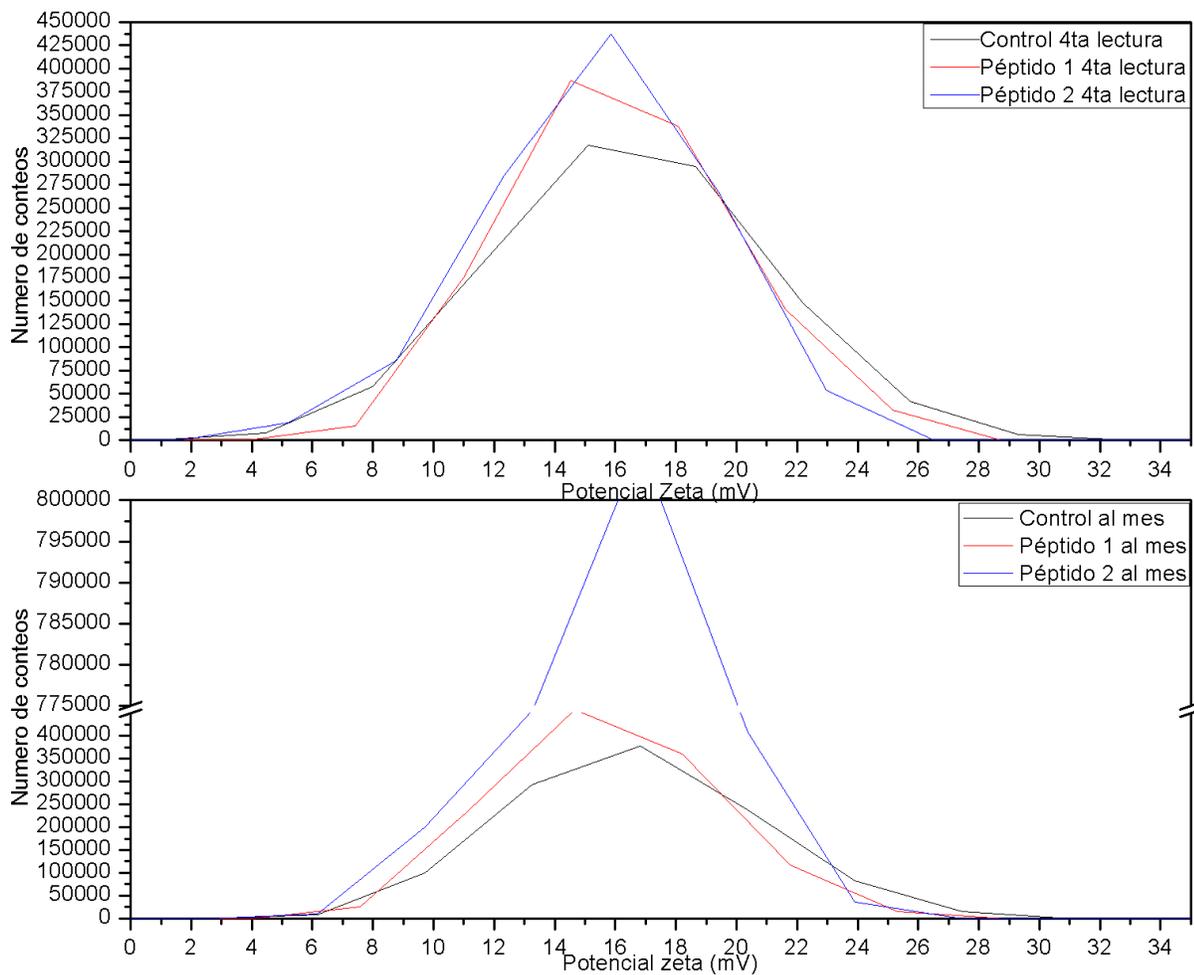


Figura 27. Gráfico del potencial zeta de los sistemas tras el transcurso de un mes.

El promedio de potencial zeta proporcionados por el equipo tras la síntesis y al mes para cada una de las condiciones experimentales corresponde: control 16.49 mV y 16.57 mV, péptido 1 16.19 mV y 15.69 mV, y péptido 2 15.44 mV y 15.85 mV.

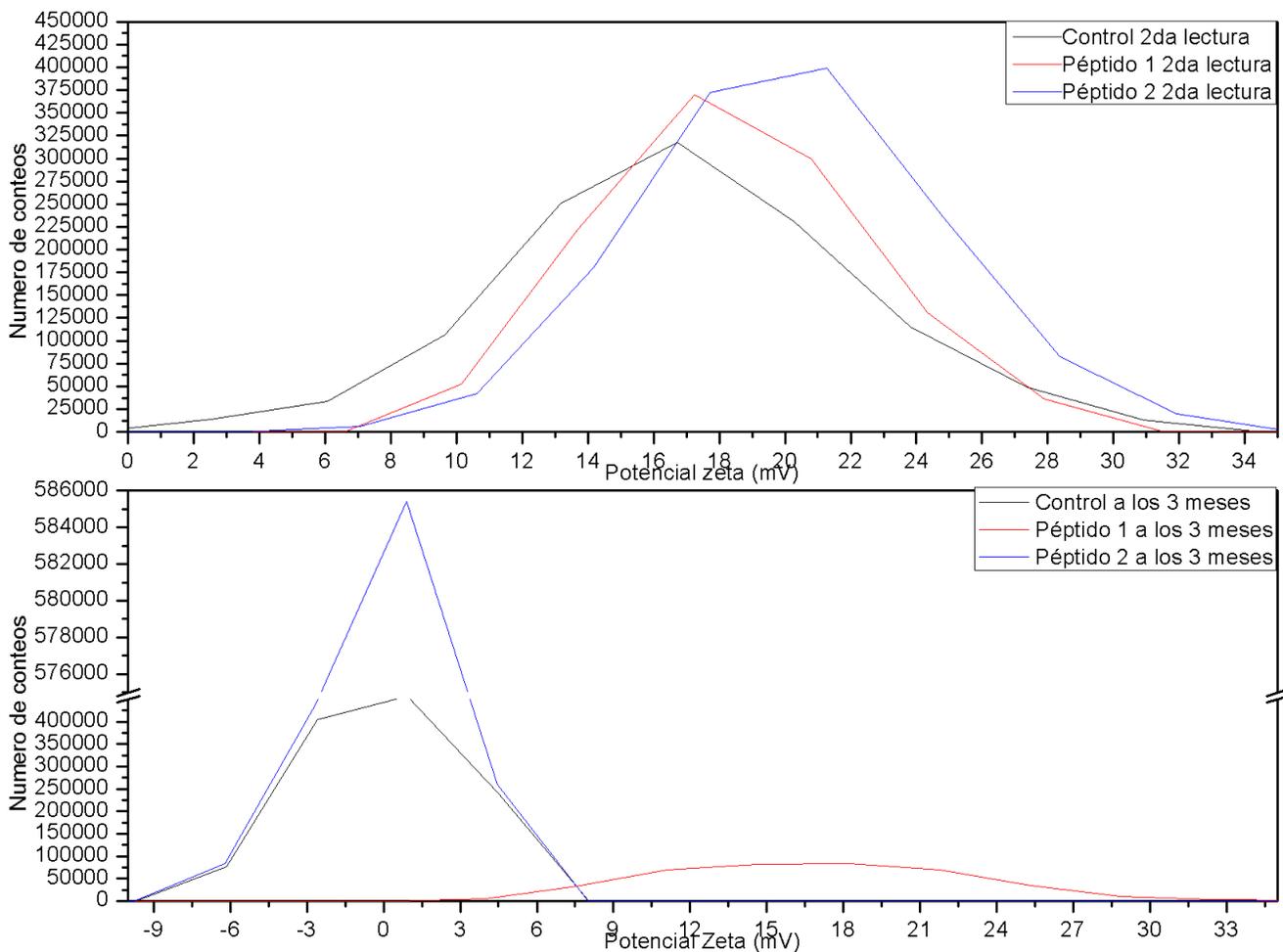


Figura 28. Gráfico del potencial zeta de los sistemas tras el transcurso de tres meses. El promedio de potencial zeta tras la síntesis y a los tres meses fue para: control 16.86 mV y 0.05 mV, péptido 1 18.35 mV y 16.86 mV, y péptido 2 20.15 mV y -0.002 mV.

Tabla 16. Índices de polidispersión de los sistemas en función del tiempo

	Control	Péptido 1	Péptido 2
Estabilidad tras un mes			
Original	0.3274	0.2233	0.4322
Posteriormente	0.17	0.2923	0.5118
Estabilidad tras tres meses			
Original	0.1160	0.0511	0.0742
Posteriormente	0.3772	0.0301	0.3808

8.6. Microscopia electrónica de barrido para observar los nanocomplejos

Tras la obtención de resultados de potencial y tamaño favorables, se procedió a realizar la toma de microfotografías del sistema preparado con el péptido cariofílico 2 por parte del CFATA Juriquilla. Se tomaron diversas microfotografías con diferentes aumentos las cuales están esquematizadas en la figura 29.

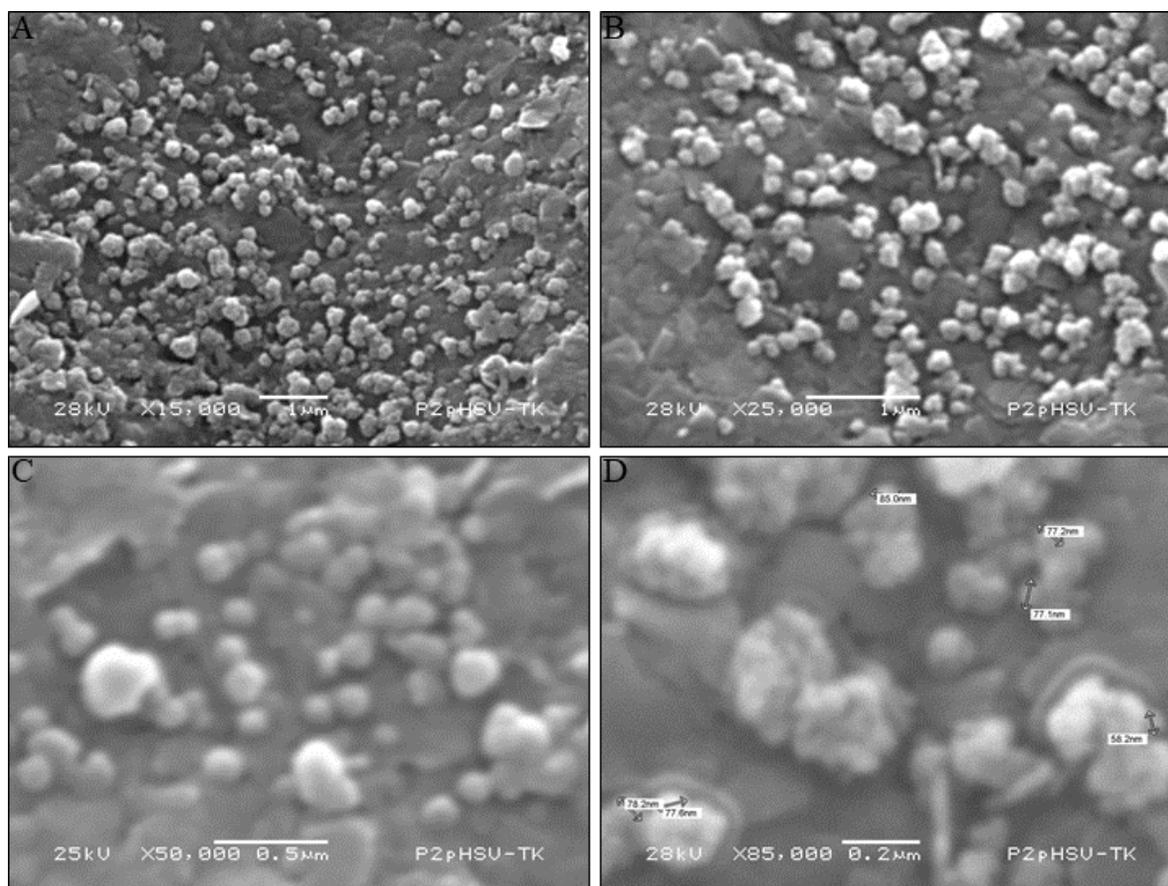


Figura 29. Microfotografías de las nanopartículas tomadas por microscopia electrónica de barrido. Microfotografía a 15,000 x, B) 25,000 x, C) 50,000 x y D) 85,000 x. Se observan complejos cuyo tamaño ronda los 60-85 nm.

8.7. Estandarización de las condiciones de transfección

Tras haberse formulado los sistemas de nanopartículas con las mejores características físicas, se realizaron ensayos de transfección con plásmidos codificantes para la proteína verde fluorescente (pEGFP y pQBI25) con la finalidad de encontrar las condiciones que facilitarían la internalización, como el número de células, el tiempo de tratamiento y la

presencia o ausencia de suero fetal bovino, en la figura 30 se reporta el efecto del suero, siendo esta la condición más efectiva para los sistemas a base de quitosán.

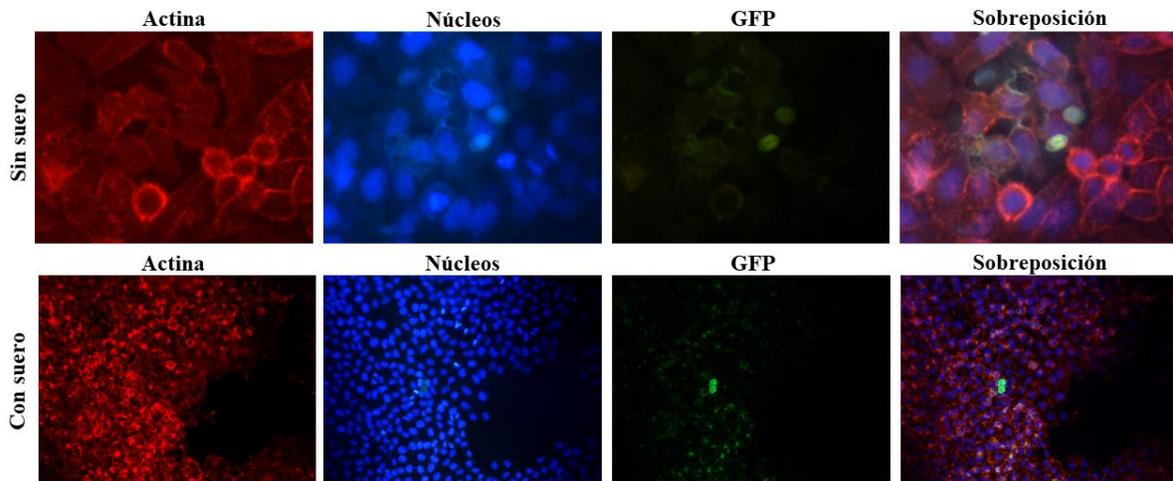


Figura 30. *Expresión de GFP con y sin suero evaluada por microscopía de fluorescencia.* Transfección de nanopartículas entre el plásmido pEGFP y quitosán de bajo peso molecular (20.6 KDA), las fotografías de la muestra sin suero tienen un aumento 40X, mientras que las que tienen suero 20X. A pesar de que con presencia o no de suero se observa fluorescencia se visualiza una mayor expresión de la proteína en presencia de suero.

8.8. Ensayo de seguimiento de nanopartículas con la finalidad de evaluar su internalización

Previo a los ensayos de viabilidad celular se tomó la decisión de garantizar si las nanopartículas contaban con la capacidad de entrar a la célula, con esta finalidad se marcó el plásmido pHSV-TK con yoduro de propidio y se fijaron los sistemas a los 15, 30 y 60 minutos. Para los sistemas que no contaban con péptido cariofílico se observó que no existía internalización visible en los tres tiempos (figura 31).

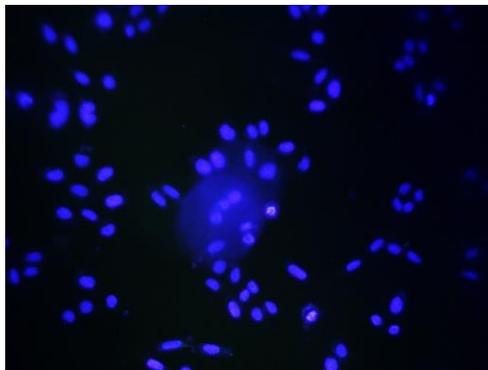


Figura 31. *Microfotografía de un campo de células del sistema con nanopartículas sin péptido cariofílico.*
Filtro DAPI, aumento 20X.

Aquellos sistemas que fueron preparados usándose el péptido cariofílico 1 si presentaron internalización en los tres tiempos tal cual se muestra en la siguiente figura.

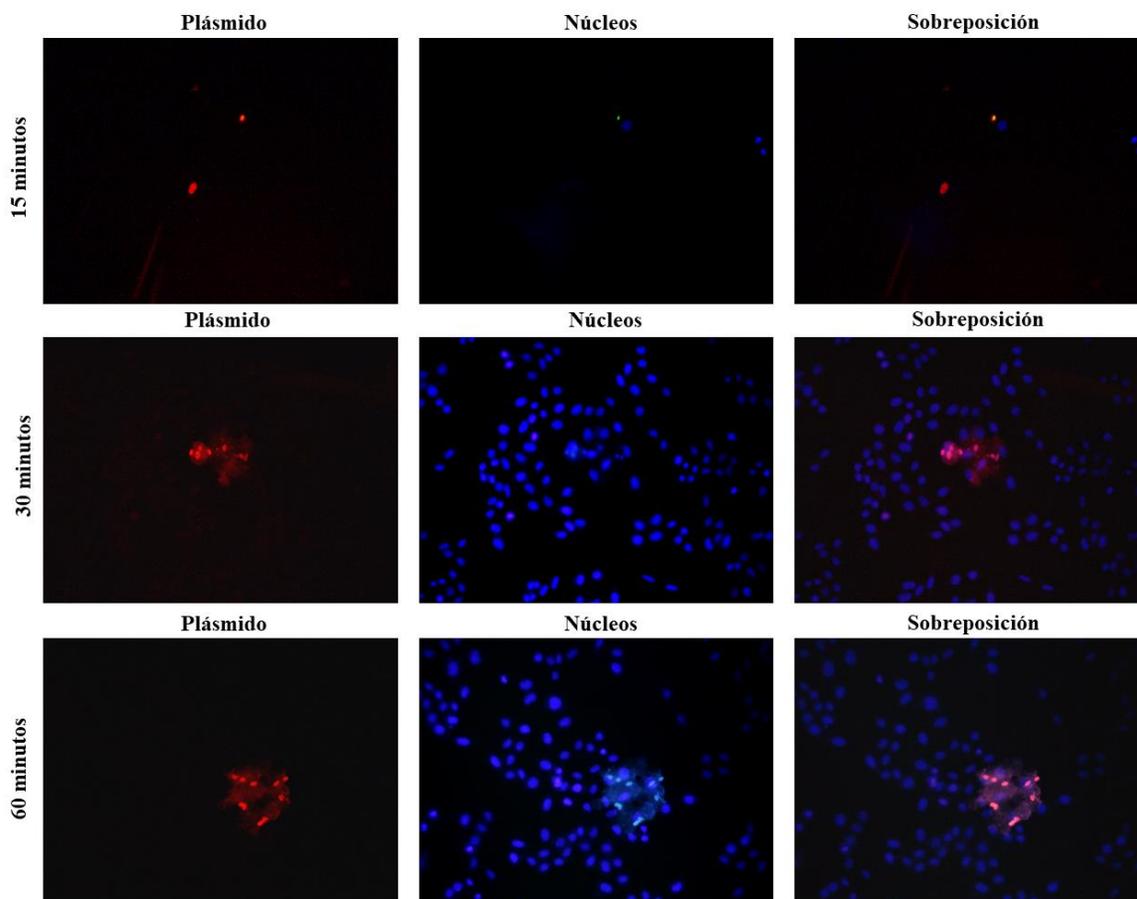


Figura 32. *Internalización de las nanopartículas con el péptido cariofílico 1 en células SiHa a lo largo del tiempo.*

A) Microfotografía a los 15 minutos. B) Microfotografía a los 30 minutos. C) Microfotografía a 60 minutos.

En contraste, para las nanopartículas que contienen el péptido cariofílico 2 se presentó internalización a la media hora y a la hora del contacto de las células con el tratamiento.

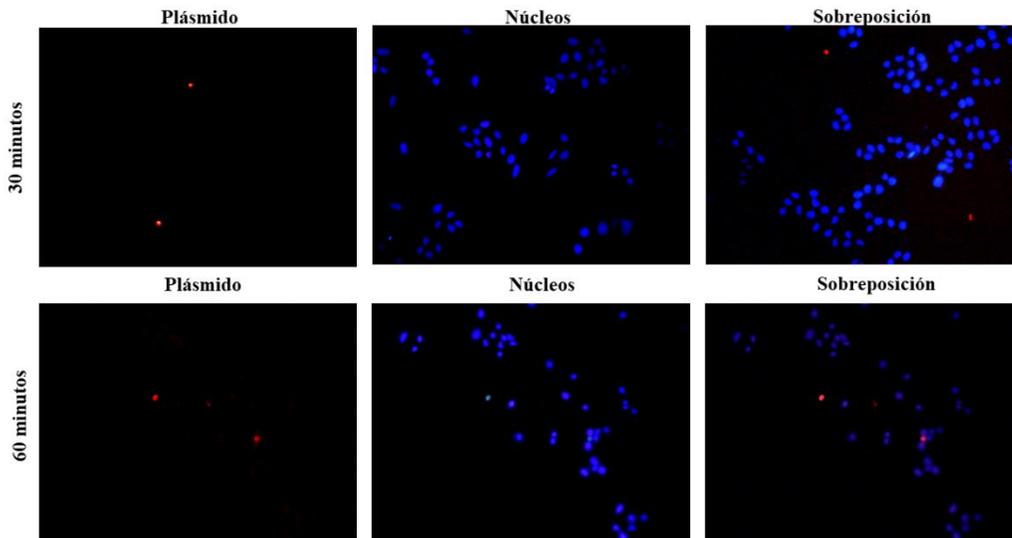


Figura 33. *Internalización de las nanopartículas con el péptido cariofílico 2 en células SiHa a lo largo del tiempo.*

Por último, se llevó a cabo la internalización en otro modelo celular, siendo ahora en la línea celular HeLa, con la finalidad de determinar si el cambio de línea celular afectaba el tiempo de internalización de los sistemas, evaluándose los sistemas sin péptido [control] a los 15 minutos, péptido 1 a la media hora y el péptido 2 a la media hora (figura 34).

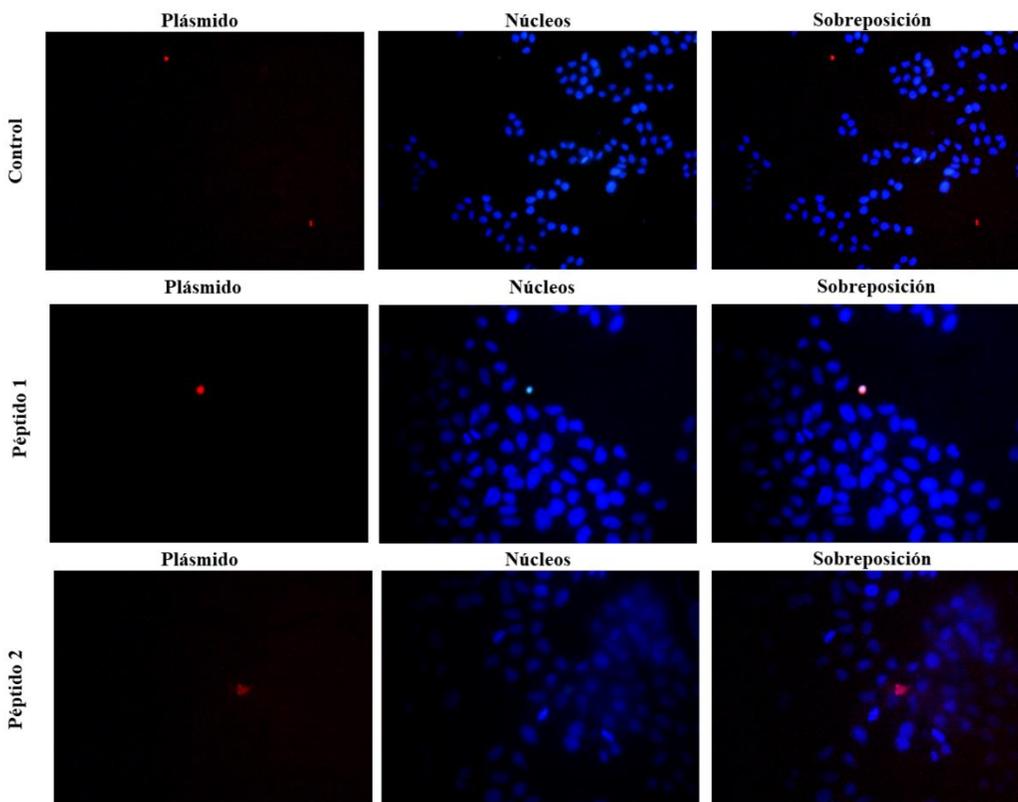


Figura 34. *Internalización de las nanopartículas en la línea celular HeLa.*

1) Células con nanopartículas “control” a los 15 minutos. 2) Células con nanopartículas que contienen el péptido 1 a la media hora. 3) Células con nanopartículas con el péptido 2 a la media hora.

8.9. Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT

8.9.1. Ensayo de sensibilidad al ganciclovir

Con la finalidad de determinar que concentración de ganciclovir (GCV) podría usarse que fuera adecuada para que la timidina cinasa pudiera fosforilar el compuesto pero sin que afectara la viabilidad celular se evaluó la sensibilidad de las líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa y SiHa) sometiendo a las células a una curva de concentraciones crecientes de GCV y tras 48 horas de tratamiento se llevó un ensayo de reducción de MTT leyendo sus absorbancias a 570 nm, obteniéndose los siguientes resultados.

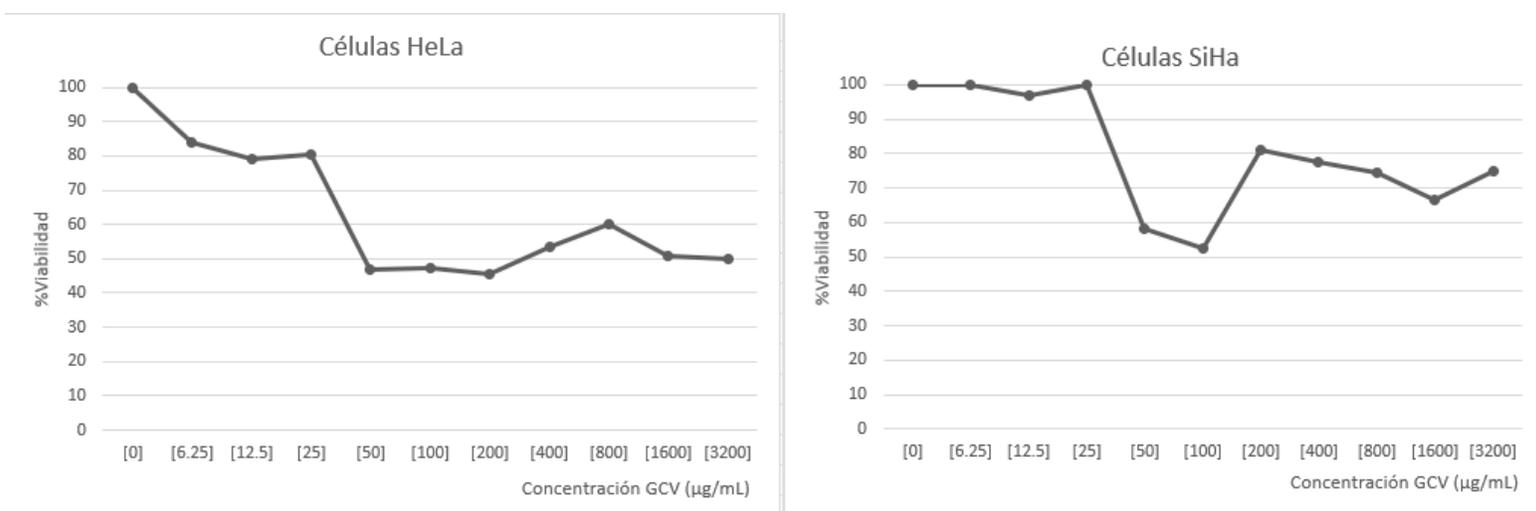


Figura 35. *Sensibilidad de líneas celulares de cáncer cervicouterino a diferentes concentraciones de GCV.*

La concentración de trabajo seleccionada fue de 50 µg/mL.

8.9.2. Determinación del efecto de los sistemas en la viabilidad celular

Una vez determinada la concentración de trabajo de GCV, las células fueron sometidas a los diversos tratamientos, usándose una n de tres, evaluándose las siguientes condiciones: control de peróxido, control de células sin tratamiento, uso de nanopartículas entre quitosán/pDNA (NoP), nanopartículas quitosán/pDNA/Péptido cariofílico 2 (P2) y Quitosán/pDNA/Péptido 2/GRP (GRP) tanto en ausencia y presencia de GCV. A

continuación, se muestra las viabilidades promedio de cada condición (figura 36) y su respectivo análisis estadístico (tabla 17).

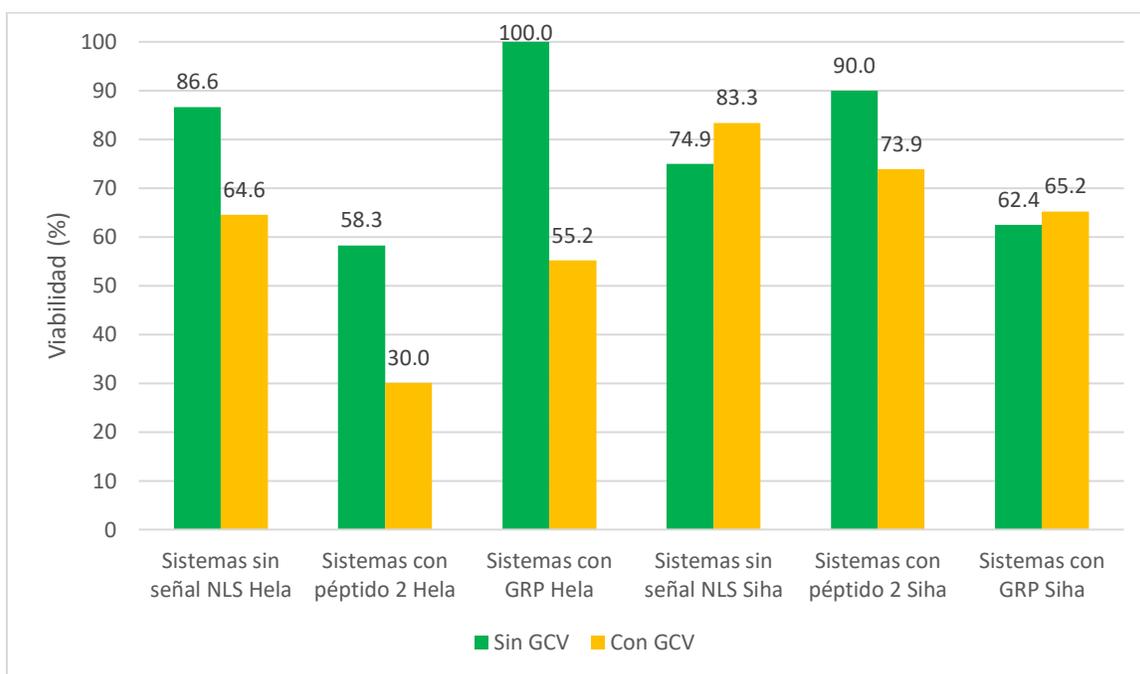


Figura 36. Porcentaje promedio de viabilidad de cada una de las condiciones experimentales en las líneas celulares SiHa y HeLa.

Viabilidad determinada por ensayo de reducción de MTT leído a 595 nm.

Tabla 17. Resultados prueba *t* de student para datos con varianzas desiguales del porcentaje de viabilidad.

Sistema	Viabilidad	P(T<=t)	Interpretación	Sistema	Viabilidad	P(T<=t)	Interpretación	Sistema	Viabilidad	P(T<=t)	Interpretación
NoP NoT HeLa	86.64 ± 15.13	0.03 9011 6	Diferencia significativa	NoP NoT HeLa	86.64 ± 15.13	0.024 3069 6	Diferencia significativa	NoP SiT HeLa	64.55 ± 6.40	0.001 4386 39	Diferencia significativa
NoP SiT HeLa	64.55 ± 6.40			P2 No T HeLa	58.27 ± 12.81			P2 Si T HeLa	30.03 ± 8.19		
P2 NoT HeLa	58.27 ± 12.81	0.01 7883 98	Diferencia significativa	NoP NoT HeLa	86.64 ± 15.13	0.147 9473 8	No diferencia significativa	NoP SiT HeLa	64.55 ± 6.40	0.163 2124 4	No diferencia significativa
P2 SiT HeLa	30.03 ± 8.19			GRP NoT HeLa	100 ± 16.28			GRP SiT HeLa	55.16 ± 14.37		

GRP NoT HeLa	100 ± 16.28	0.00 7601 55	Diferencia significativa	P2 NoT HeLa	58.27 ± 12.81	0.008 2463 5	Diferencia significativa	P2 Si T HeLa	30.03 ± 8.19	0.029 3510 7	Diferencia significativa
GRP SiT HeLa	55.16 ± 14.37			GRP NoT HeLa	100 ± 16.28			GRP SiT HeLa	55.16 ± 14.37		
NoP NoT SiHa	74.93 ± 11.19	0.14 0864 45	No diferencia significativa	NoP NoT SiHa	74.93 ± 11.19	0.049 7473 6	Diferencia significativa	NoP SiT SiHa	83.33 ± 1.35	0.000 5040 8	Diferencia significativa
NoP SiT SiHa	83.33 ± 1.35			P2 NoT SiHa	90.01 ± 8.13			P2 SiT SiHa	73.87 ±1.68		
P2 NoT SiHa	90.01 ± 8.13	0.03 1240 527	Diferencia significativa	NoP NoT SiHa	74.93 ± 11.19	0.084 3291 7	No diferencia significativa	NoP SiT SiHa	83.33 ± 1.35	0.014 7515 4	Diferencia significativa
P2 SiT SiHa	73.87 ±1.68			GRP NoT SiHa	62.43 ± 2.96			GRP SiT SiHa	65.21 ± 6.09		
GRP NoT SiHa	62.43 ± 2.96	0.24 0216 37	No diferencia significativa	P2 NoT SiHa	90.01 ± 8.13	0.004 1351 7	Diferencia significativa	P2 SiT SiHa	73.87 ±1.68	0.057 5637 1	No diferencia significativa
GRP SiT SiHa	65.21 ± 6.09			GRP NoT SiHa	62.43 ± 2.96			GRP SiT SiHa	65.21 ± 6.09		

Las tablas detalladas de la prueba t de student se localizan en el anexo 8.

Se volvió a realizar otro ensayo de viabilidad agregando una serie de sistemas que contengan únicamente GCV a la concentración de trabajo (control GCV) y aumentando la n a 5 pocillos por condición.

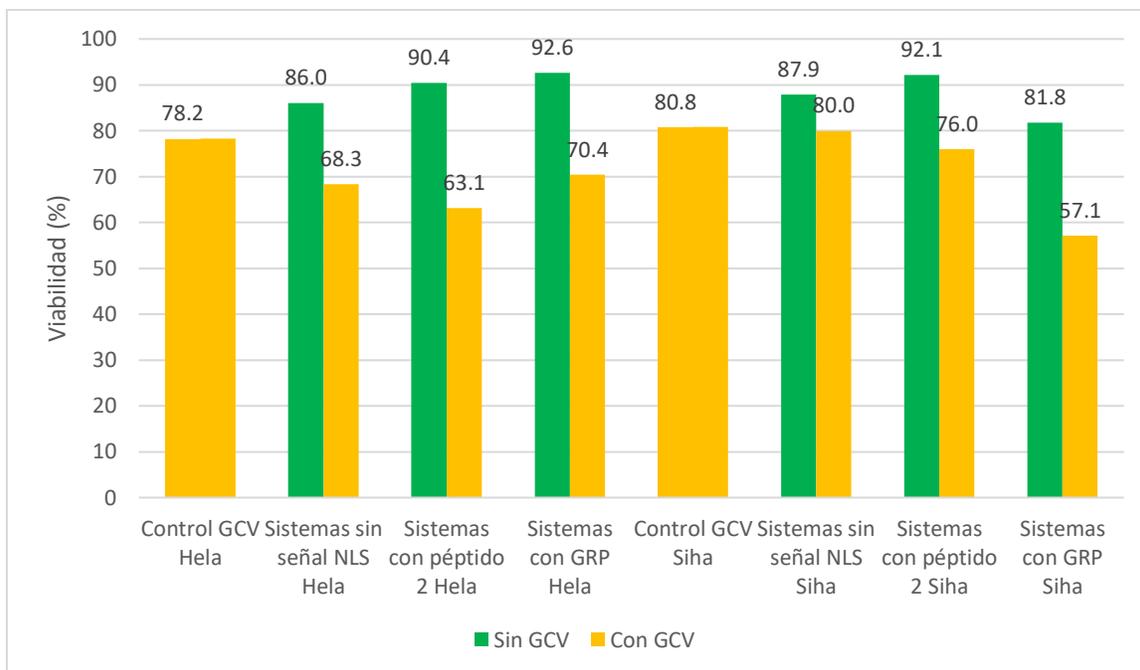


Figura 37. Segundo ensayo de reducción de MTT para cada una de las condiciones experimentales en células HeLa y SiHa.

Tabla 18. Resultados prueba *t* de student para datos con varianzas desiguales del porcentaje de viabilidad.

Sistema	Viabilidad	P(T<=t)	Interpretación	Sistema	Viabilidad	P(T<=t)	Interpretación	Sistema	Viabilidad	P(T<=t)	Interpretación
NoP NoT HeLa	86.03 ± 7.68	0.004046612	Diferencia significativa	NoP NoT HeLa	86.03 ± 7.68	0.267817015	No diferencia significativa	NoP SiT HeLa	68.30 ± 2.82	0.092208187	No diferencia significativa
NoP SiT HeLa	68.30 ± 2.82			P2 NoT HeLa	90.41 ± 10.68			P2 SiT HeLa	63.09 ± 6.19		
P2 NoT HeLa	90.41 ± 10.68	0.002452378	Diferencia significativa	NoP NoT HeLa	86.03 ± 7.68	0.19884697	No diferencia significativa	NoP SiT HeLa	68.30 ± 2.82	0.246172431	No diferencia significativa
P2 SiT HeLa	63.09 ± 6.19			GRP NoT HeLa	92.64 ± 12.16			GRP SiT HeLa	70.39 ± 4.83		
GRP NoT HeLa	92.64 ± 12.16	0.010348323	Diferencia	P2 NoT HeLa	90.41 ± 10.68	0.396751967	No diferencia	P2 SiT HeLa	63.09 ± 6.19	0.053152624	No diferencia

GRP SiT HeLa	70.39 ± 4.83		significa tiva	GRP NoT HeLa	92.64 ± 12.16		significa tiva	GRP SiT HeLa	70.39 ± 4.83		significa tiva
NoP NoT SiHa	87.93 ± 10.85	0.12 4661 802	No diferenc ia significa tiva	NoP NoT SiHa	87.93 ± 10.85	0.264 6179 38	No diferenc ia significa tiva	NoP SiT SiHa	79.95 ± 5.72	0.137 2496 29	No diferenc ia significa tiva
NoP SiT SiHa	79.95 ± 5.72			P2 NoT SiHa	92.12 ± 5.78			P2 SiT SiHa	75.96 ± 3.09		
P2 NoT SiHa	92.12 ± 5.78	0.00 1458 921	Diferen cia significa tiva	NoP NoT SiHa	87.93 ± 10.85	0.195 5936 17	No diferenc ia significa tiva	NoP SiT SiHa	79.95 ± 5.72	0.000 2432 1	Diferen cia significa tiva
P2 SiT SiHa	75.96 ± 3.09			GRP NoT SiHa	81.77 ± 7.53			GRP SiT SiHa	57.14 ± 5.48		
GRP NoT SiHa	81.77 ± 7.53	0.00 0639 543	Diferen cia significa tiva	P2 NoT SiHa	92.12 ± 5.78	0.032 6564 09	Diferen cia significa tiva	P2 SiT SiHa	75.96 ± 3.09	0.000 5463 62	Diferen cia significa tiva
GRP SiT SiHa	57.14 ± 5.48			GRP NoT SiHa	81.77 ± 7.53			GRP SiT SiHa	57.14 ± 5.48		
GCV HeLa	78.24 ± 1.16	0.00 0694 13	Diferen cia significa tiva	GCV HeLa	78.24 ± 1.16	0.018 1333 76	Diferen cia significa tiva	GCV SiHa	80.79 ± 3.77	0.044 2298 76	Diferen cia significa tiva
NoP SiT HeLa	68.30 ± 2.82			GRP SiT HeLa	70.39 ± 4.83			P2 SiT SiHa	75.96 ± 3.09		
GCV HeLa	78.24 ± 1.16	0.00 4606 498	Diferen cia significa tiva	GCV SiHa	80.79 ± 3.77	0.408 7956 36	No diferenc ia significa tiva	GCV SiHa	80.79 ± 3.77	0.000 1093 46	Diferen cia significa tiva
P2 SiT HeLa	63.09 ± 6.19			NoP SiT SiHa	79.95 ± 5.72			GRP SiT SiHa	57.14 ± 5.48		

8.10. Evaluación de niveles de expresión de la timidina cinasa mediante RT-PCR

8.10.1. Optimización de la tm de reacción

Con la finalidad de determinar la temperatura óptima de alineamiento de los primer se llevó a cabo una PCR de gradiente de temperatura considerando una TA de 53°C y un gradiente $\pm 10^\circ\text{C}$. Para esta reacción se usó la alícuota "5" (tabla 13) de plásmido como molde para

los cebadores y se reveló el producto de la reacción mediante una electroforesis (figura 38 y 39).

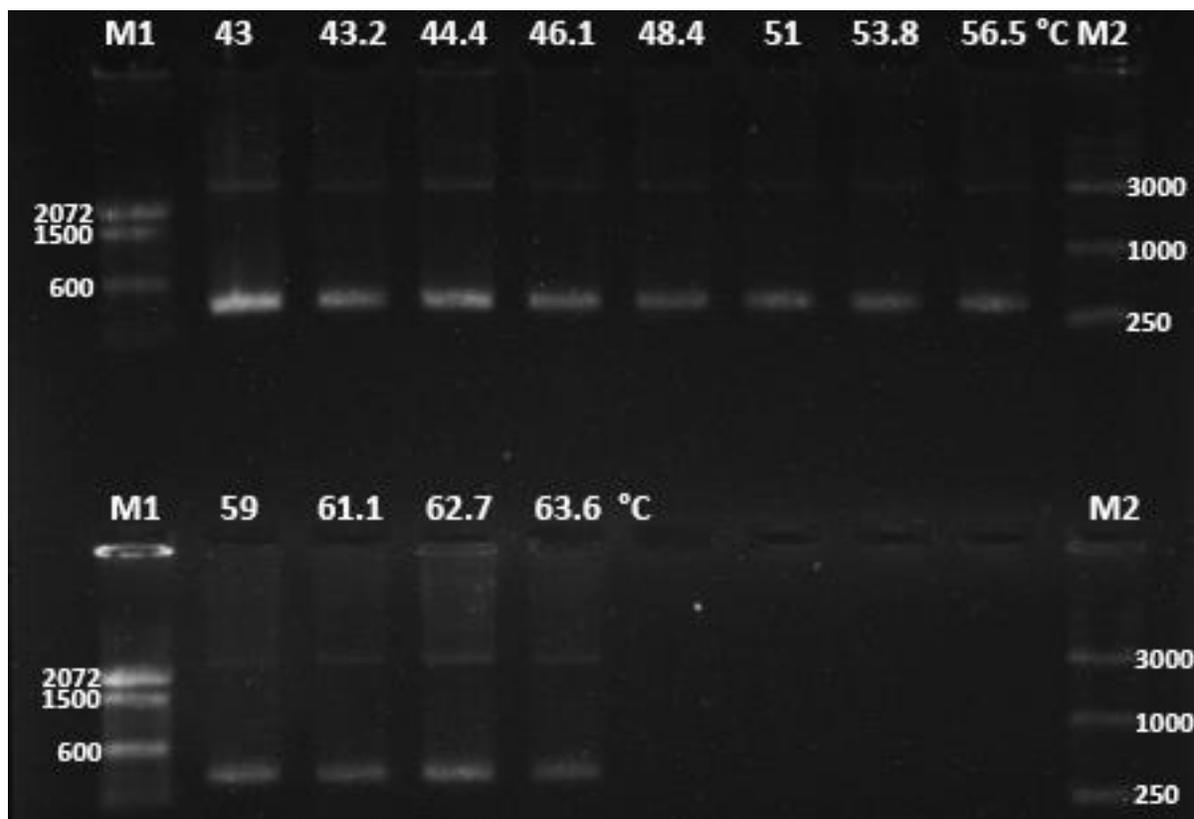


Figura 38. *Electroforesis PCR gradiente T primers HSV-TK*

Gel optimización T_m de primers pHSVTK no HS. M1 (izquierda): Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (InvivoGen). M2 (derecha): Marcador de peso molecular de 10,000 pares de bases (GoldBio).

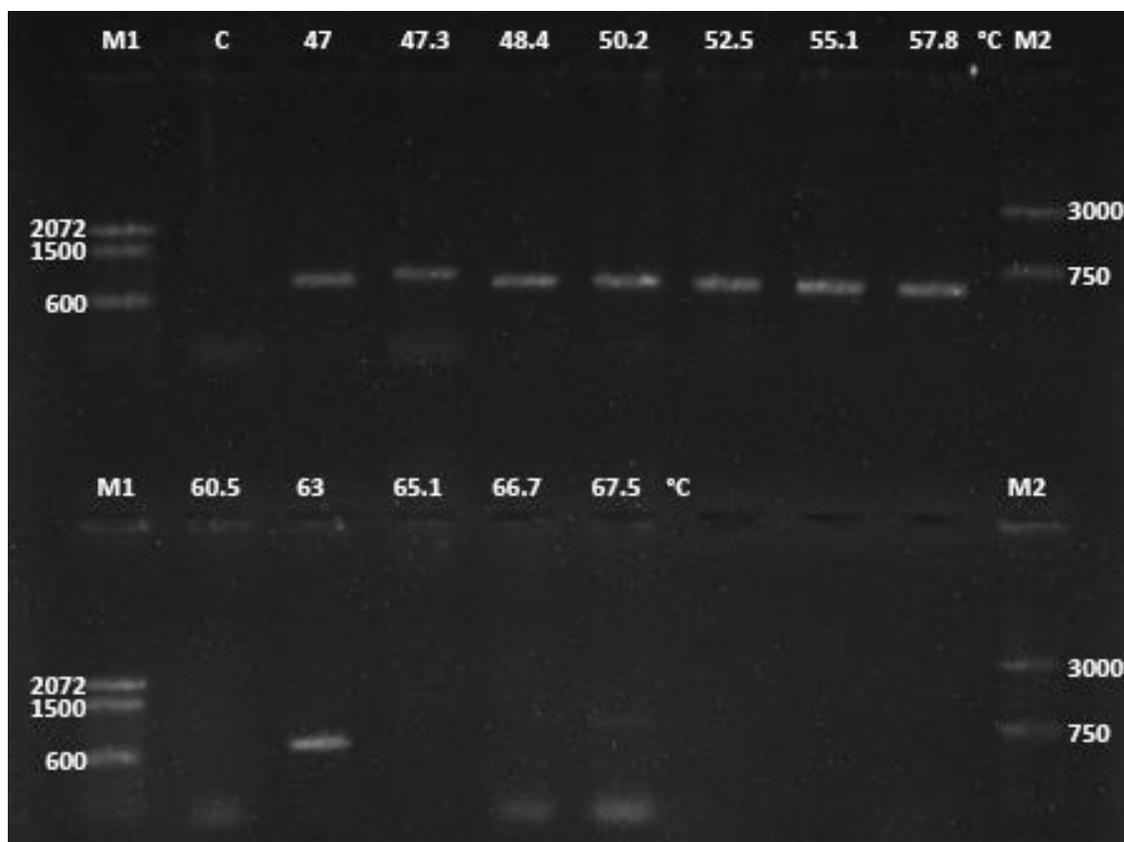


Figura 39. *Electroforesis gradiente T primers actina*

Gel optimización tm de primers de actina. M1 (izquierda): Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (InvivoGen). M2 (derecha): Marcador de peso molecular de 10,000 pares de bases (GoldBio). Control sin cDNA (C).

8.10.2. Cuantificación y evaluación del RNA extraído de las células

Se cuantificó la concentración del RNA extraído para cada una de las condiciones experimentales (tabla 19), a partir de estas alícuotas y usando el kit M-MLC Reverse Transcriptase de Invitrogen[®] se obtuvo cDNA midiéndose de igual manera su concentración y relación 260/280 (tabla 20).

Tabla 19. *Concentración y relación 260/280 del RNA extraído de las líneas celulares HeLa y SiHa.*

Muestra	Concentración (ng/μL)	260/280
HeLa control	390.8	2.03
HeLa No P	449.4	2.04
HeLa P2	439.9	2.04
SiHa control	372.2	2.04
SiHa No P	378.5	2.03
SiHa P2	363.9	2.04

Tabla 20. Concentración y relación 260/280 del cDNA obtenido a partir del RNA.

Muestra	Concentración (ng/μL)	260/280
HeLa control	963.1	1.79
HeLa No P	919.2	1.77
HeLa P2	938.2	1.80
SiHa control	727.5	1.79
SiHa No P	664.8	1.77
SiHa P2	845.4	1.78

8.10.3. Reacción de cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).

Cada una de las alícuotas de DNA fue diluida a una concentración aproximada de 100 ng/μL. Para cada reacción se colocaron 12.5 μL de Master Mix, 1 μL de cada cebador, 1 μL de dilución de DNA y se aforo cada sistema a un volumen de 25 μL con agua libre de nucleasas. Estos sistemas fueron sometidos al programa de RT-PCR y se corrió una electroforesis en gel de agarosa 1 % para evaluar la expresión (figura 40).



Figura 40. rtPCR de los sistemas.

M1 (izquierda): Marcador de 100 pb (InvivoGen). cDNA: control con únicamente cDNA. s/cDNA: Control sin cDNA con master mix. C-HeLa: control negativo HeLa (sin tratamiento). P2 HeLa: Células HeLa con nanopartículas con péptido 2. NoP HeLa: nanopartículas sin péptido en células HeLa. C-SiHa: control negativo SiHa (sin tratamiento). P2 SiHa: Células SiHa con nanopartículas con péptido 2. NoP SiHa: nanopartículas sin péptido en células SiHa. M2 (Derecha): Marcador 10,000 pb

(GoldBio). Los amplicones dentro de las líneas blancas corresponden a β -actina y los localizados debajo de ellas se relacionan a HSVTK.

9. Discusión

9.1. Propagación del plásmido

La propagación del plásmido en bacterias constituyó el primer objetivo a cumplir, pues este procedimiento permitiría obtener plásmido HSVTK en concentraciones elevadas y a la vez, un banco de trabajo que fuera capaz de generar más bacterias para su posterior propagación. Para poder realizar esto, se evaluó la integridad de pHSV-TK como se muestra en la figura 7; en la electroforesis se visualizan dos elementos principalmente, 1) plásmido enrollado y 2) plásmido super enrollado. Los plásmidos de DNA son capaces de adoptar 3 conformaciones topológicas: plásmido circular, plásmido enrollado y super enrollado (Padilla Peña, Diez Dapena, Martínez Galisteo, & et al., 2006). Los plásmidos bacterianos generalmente se encuentran negativamente superenrollados siendo esta su forma más habitual en la naturaleza, el episoma adquiere esta conformación por la acción de las topoisomerasas. El motivo detrás de esto, además de generar la forma más estable del episoma se encuentra en que esta conformación facilita la separación de las cadenas al momento de la replicación (Cebrián Castillo, 2015).

La primera transformación bacteriana llevada a cabo en bacterias *Escherichia coli* DH5 α se realizó siguiendo el procedimiento indicado en la tercera edición del “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” de Sambrook. Tras la propagación de una colonia transformada y el posterior aislamiento del plásmido a partir de esta, fueron obtenidos valores de concentración (tabla 6) de 15.12 ± 2.41 ng/ μ L y valores de relación 260/280 de 2.01 ± 0.13 , estos valores de concentración estaban muy lejos de los valores deseados de concentración (siendo necesaria una concentración mínima de las muestras de 300 ng/ μ L para poder llevar a cabo los ensayos de retardamiento y retención, ya que en estos se diluye la concentración de DNA al formularse los sistemas) y en límites preocupantes de relación 260/280 (el intervalo normal oscila entre 1.8-2.0) ya que indica una potencial contaminación con RNA en las muestras. Estas muestras fueron analizadas mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (figura 8) en la cual se observan tres bandas (no todas bien definidas), con alturas similares para todas las muestras. De estas tres bandas se hacen las siguientes observaciones: la banda *b* cuenta con una resolución e intensidad mayor que las otras dos, la banda *a* presenta una migración igual para todas las muestras y la banda C es la banda menos definida, sin contar que para las muestras 2 y 3 se presentan discontinuidades dentro de esta. La banda *b*, corresponde a la forma superenrollada del plásmido ya que esta se localiza justo debajo de la banda que representa la forma circular abierta (banda *a*) y

cuenta con una definición e intensidad que garantizan la presencia de una conformación topológica sin degradación o desnaturalización alguna, además de que el kit comercial empleado proporciona un mayor rendimiento para esta conformación topológica del episoma, de ahí la mayor intensidad. La banda *c* localizada debajo de la banda *b*, cuenta con una definición mucho menor y se localiza muy cerca de la banda *b*, esto sucede ya que esta banda representa la desnaturalización del plásmido superenrollado, por lo que cuenta con un corrimiento electroforético un poco mayor a esta isoforma y a su vez explica la escasa resolución. Por último, la banda *a* según el fabricante puede significar dos cosas, contaminación con DNA genómico bacteriano o la forma circular abierta del episoma, se descarta la contaminación con DNA genómico debido a que si ese fuera el caso la migración de esta banda sería mucho menor y se encontraría más separada de la banda *b*, por lo tanto, corresponde a la forma circular abierta del plásmido. La escasa resolución e intensidad que tiene esta banda puede deberse a que esta conformación de igual manera se encuentra desnaturalizada por lo que la definición de la banda es mucho menor, respecto a la intensidad, se debe recordar que este kit da prioridad al aislamiento de la forma superenrollada por ende la concentración de la isoforma circular abierta es menor en contraste con la superenrollada.

Con anterioridad se hizo mención de que la concentración del plásmido debía ser de al menos de 300 ng/ μ L, para alcanzar esta concentración se mezclaron las muestras contenedoras del plásmido y fue secada para resuspender en un volumen de agua fijo y así aumentar la concentración (tabla 7), de esta solución se generó el gel que se muestra en la figura 9, en este gel se observan una gran variedad de bandas con un amplio barrido de fondo, por lo que se descartó definitivamente el uso de esta muestra concentrada. Una posible explicación de este fenómeno se encuentra en que las condiciones de secado de las alícuotas no fueron las adecuadas generando una desnaturalización parcial de la muestra, siendo parcial ya que a pesar del barrido de fondo aún se observan bandas de isoformas definidas.

La densidad óptica es un gran indicador de las condiciones en términos de “biomasa” del cultivo, esto resulta importante debido a que de esta biomasa va a provenir el plásmido, los valores de referencia varían demasiado en función del autor, por ejemplo, el Doctor Michael J. Benedik indica que para cultivos de *Escherichia coli* los valores de densidad óptica (DO) a 600 nm deben ser de aproximadamente 1.5-1.8, esta densidad óptica es fácilmente visible incluso sin el uso de un espectrofotómetro ya que la turbidez en el matraz de cultivo es elevada. Específicamente, las transformaciones que empleaban la cepa DH5 α no presentaron el olor característico ni una densidad óptica elevada obteniéndose valores de DO de 0.4 sin necesidad de diluir la alícuota de cultivo, siendo solo un poco mayor a los valores de referencia de alícuotas diluidas 1 en 10 que son de 0.2-0.35 (Zymo Research,

2022). Ante esta situación se desarrolló un experimento en donde se evaluó el efecto sobre la concentración episomal que tendría el aumentar el tiempo de cultivo hasta 23 horas. A las 21, 22 y 23 horas se tomaron alícuotas de 1.5 mL de medio de cultivo y se extrajo el plásmido mediante lisis alcalina, destacándose el aumento en la turbidez del medio, pero no una mejoría significativa en el olor de los sistemas. A estas alícuotas se les determinó la concentración (tabla 8) viéndose un aumento considerable respecto a las anteriores transformaciones que fueron realizadas con un tiempo de 16 horas, así como una progresión en términos de concentración conforme el paso de las horas de incubación, aunque a su vez un aumento considerable en la relación 260/280 que es de 2.13 ± 0.015 , incluso este valor es elevado al ser comparado con la extracción realizada posteriormente empleando el mega kit de QIAGEN®, que se encuentra dentro de valores de referencia. Para darle una explicación a esto es necesario hablar del fundamento que sigue la lisis alcalina, el método se basa en la alta resistencia al pH del DNA tanto episomal como cromosómico. Se aplica una solución de SDS y NaOH que genera la lisis celular y la desnaturalización del material genético. La neutralización con acetato potásico permite que el DNA episomal vuelva a su conformación superenrollada y se mantenga soluble mientras que el material cromosómico y las proteínas precipiten en un complejo entre el potasio y el SDS que es eliminado por centrifugación (Coll, Coque, Domínguez, & et al., 2005). Este método pese a su capacidad de precipitar el DNA genómico no es eficiente respecto a la eliminación del RNA, puesto que tanto el RNA y el plásmido son capaces de “renaturalizarse” por su pequeño tamaño el cual evita la formación de reasociaciones aleatorias intracatenarias que son las que provocan que el DNA genómico precipite al neutralizarse el medio (Prieto Álamo, López Barea, & Pueyo de la Cuesta, 2006). Después de la lisis alcalina se procedió a extraer el plásmido utilizando el mega kit QIAGEN® obteniéndose concentraciones (tabla 9) diferentes a las obtenidas por lisis alcalina, esto debido a que la centrifugación empleada para la extracción depende de muchos factores entre los que se encuentra la biomasa presente en el sistema, que al ser tan elevada las condiciones de centrifugación resultaron insuficientes para poder separar todo el material genético cromosómico por lo que en la extracción por lisis alcalina aún se encontraba DNA genómico que se observa en la figura 10 en donde se visualiza una banda de DNA que está localizada inmediatamente a los pocillos. Dentro de esta misma figura se visualiza un amplio barrido en todas las muestras que representa una degradación del DNA dada por el aumento en el tiempo de propagación ya que un aumento en este tiempo puede llevar a la pérdida de “viabilidad” del sistema y una degradación del plásmido (Sambrook & Russell, 2001). Además de lo anteriormente mencionado se ha demostrado que el aumento del tiempo de incubación (mayor a 18 horas) genera contaminación con DNA genómico (Zymo Research, 2022). En adición, la relación 260/280 para la extracción mediante kit comercial

mejoro demasiado no encontrándose RNA en estos sistemas ya que este kit evita el aislamiento tanto de material genético cromosómico y de RNA.

Tomando en consideración los resultados obtenidos en la propagación del plásmido en la cepa de *Escherichia coli* DH5 α se decidió propagar el plásmido en la cepa *Escherichia coli* TOP10, de esta propagación primero se extrajo el plásmido por el método de lisis alcalina obteniéndose concentraciones favorables (tabla 10), aunque una relación 260/280 debajo de los valores de referencia con un valor promedio de 1.62 ± 0.42 lo que habla de contaminación de las alícuotas con proteínas; posterior a la lisis alcalina se extrajo el plásmido empleando el mega kit QIAGEN® en donde de igual manera se obtuvieron concentraciones muy elevadas de plásmido (tabla 11) visualizándose también mediante la relación 260/280 (1.44 ± 0.18) una contaminación con proteínas.

El motivo detrás de la infructífera propagación del plásmido en una cepa y su éxito en otra depende de tres factores principales: las diferencias entre las cepas, las condiciones del medio de cultivo y el antibiótico de selección.

Tanto la cepa DH5 α como la cepa TOP10 son herramientas de rutina para la clonación de plásmidos en el laboratorio siendo consideradas como “fácilmente intercambiables” entre sí. A nivel genómico las diferencias entre cepas son muy pequeñas, pero a pesar de esto, en términos de características estas bacterias cuentan con atributos a considerar. Primeramente, ambas cepas cuentan mutaciones en el gen *recA1* y el gen *endA*, estas mutaciones garantizan la estabilidad del episoma al eliminar la integración genómica y la acción de endonucleasas inespecíficas (Journal of Biological Methods, 2007) (OpenWetWare, 2021). En adición, *E. coli* TOP10 cuenta con una resistencia innata al antibiótico Estreptomina, mientras que la cepa DH5 α puede o no presentar resistencia a la bleomicina y en consecuencia resistencia al antibiótico de selección zeocina. Resulta que, existen subcepas de DH5 α (por ejemplo, DH5 α F'1Q) que cuentan con el transposón Tn5 completo, realmente el gen importante dentro de este transposón es el gen *Th5* siendo este el que confiere la resistencia a la bleomicina (ThermoFisher SCIENTIFIC, 2002). Otra diferencia entre estas cepas reside en la eficiencia de transformación (número de células que después de la transformación contendrán el inserto de interés), puesto que DH5 α cuenta con una eficiencia de transformación de 1×10^6 , mientras que TOP10 alcanza 1×10^9 (invitrogen, 2016), esta diferencia no suele ser un inconveniente ya que el valor deseado para una transformación se encuentra comprendido entre $1 \times 10^{6-8}$ (Zymo Research, 2019) (Kroemer, N/R), pero si es recomendable optar siempre por una cepa con una mayor eficiencia sobre todo cuando existen dificultades en la transformación. La eficiencia no solo se ve comprometida por cuestiones genéticas y es que el almacenamiento de las bacterias competentes juega un rol completamente importante para la eficiencia de transformación, sin contar la calidad de los reactivos, el método de “competencia” y la temperatura también

cumplen roles vitales en este factor. Hablando más a detalle del almacenaje, se reporta de manera general que condiciones inadecuadas de almacenaje (temperaturas mayores a los -80°C) son capaces de reducir la eficiencia de transformación en un 90% tras solo un día de almacenaje a -20°C (New ENGLAND BioLabs INC, N/A) (Zymo Research, 2019). Se debe hacer la distinción en este factor ya que para la cepa DH5 el almacenaje consistió en diversos días a -20°C , mientras que para TOP10 si fue a -80°C y el descongelamiento, así como todo el trabajo se llevó en hielo. Esta “sensibilidad” a la temperatura está relacionada enormemente con el proceso de competencia, pues al abrir ya sea de manera química o física poros en la membrana celular (Zymo Research, 2019) las bacterias son más susceptibles a la temperatura al no contar ya con su membrana celular integra.

En términos de las condiciones de cultivo, existen dos factores determinantes que son capaces de condicionar una transformación exitosa: presencia de bacterias satélites y el sobreplaqueo. Las “colonias satélites” son bacterias que crecen alrededor de células transformadas, aprovechándose de que estas redujeron la concentración de antibiótico en la placa, estas colonias con normalidad aparecen tras 16 horas del “plaqueo” (BIOTED, 2017) (ThermoFisher SCIENTIFIC, N/R), normalmente se visualizan como pequeñas colonias alrededor de colonias más grandes. Se debe hacer la observación de que para la cepa DH5 α el crecimiento en placa se hacía por periodos no mínimos de 24 horas, ya que las colonias presentes antes de este tiempo eran muy pequeñas y poco numerosas. Normalmente para solucionar el problema de las colonias satélites existen alternativas, tales como el “White/blue screening”, el uso de antibióticos equivalentes más estables, evaluar la concentración y temperatura del antibiótico, la degradación de este por condiciones del medio o reducir el tiempo de incubación a menos de 16 horas (caso imposible para DH5 α) (Kroemer, Troubleshooting: Satellite Colonies, N/R). El sobreplaqueo o el sembrar un gran número de bacterias en la placa, lleva a una degradación más rápida del antibiótico (ThermoFisher SCIENTIFIC, N/R) y como consecuencia una aparición más rápida de las colonias satélite es muy probable que en DH5 α se diera un sobreplaqueo puesto que a diferencia de TOP10, se realizó una preincubación de las bacterias de DH5 α transformadas a 37°C durante una hora. Ahora, las colonias satélites o en general las bacterias no transformadas constituyen un problema y es que estas van a crecer y desarrollarse a la par de las bacterias transformadas, llegando al punto de que cuando comience la fase estacionaria la concentración de plásmido será aún lo suficientemente baja debido al agotamiento de los recursos.

La zeocina y en particularidad su eficacia esta determinadas por, el pH (7.5 hasta 8 debe ser el pH de trabajo, valores mayores inhiben su actividad), la concentración de sales (el medio de cultivo no debe tener >110 mM de sal), la luz (el antibiótico es fotosensible) y su concentración (ThermoFisher SCIENTIFIC, 2002). De estos factores no existe ninguno que

sea diferente para ninguna de las cepas empleadas, pese a esto se debe hacer la aclaración, de que la zeocina (un antibiótico de trabajo no tan frecuente) es conocido por no ser 100% efectivo, recomendándose en muchos casos duplicar la concentración de antibiótico en caldo de cultivo a costo de aumentar ligeramente el tiempo de propagación. Múltiples investigadores recomiendan concentraciones mayores a los 40 mg/mL para alcanzar el efecto en caldo de cultivo (la concentración empleada fue de 25 mg/mL), esta baja concentración es capaz de suscitar la presencia de bacterias no transformadas en el medio de propagación.

Con base en todo esto: La cepa DH5 α debido a las condiciones de almacenamiento habría perdido gran parte de su eficiencia de transformación, lo que explica el pequeño tamaño de las colonias en placa, así como su lento crecimiento respecto a TOP10 que además de haber sido almacenada de manera adecuada es mucho más eficiente en comparación. El excesivo tiempo en placa de DH5 α , así como un potencial sobreplaqueo genero la presencia de bacterias no transformadas en el inóculo de la propagación, para TOP10, este inóculo estuvo más “puro” debido a que las colonias eran mucho más grandes siendo fácilmente distinguibles con respecto a las colonias satélite. Las bacterias no transformadas no murieron al ser pasadas al caldo de cultivo por la baja concentración del antibiótico, creciendo a la par de las bacterias no transformadas y agotando los recursos del medio. El comportamiento de la propagación en DH5 α , solo puede ser explicado por la presencia de bacterias no transformadas ya que, aunque el inóculo de bacterias transformadas fuera menor, en teoría si este estaba “limpio”, con más tiempo de incubación (experimento a diferentes tiempos de incubación) las concentraciones serían equiparables respecto a TOP10, y aunque aumentaron considerablemente tras el aumento del tiempo, no llegaron a ser similares, y el comportamiento del gel (figura 10) demuestra que el cultivo estaba entrando en la fase de muerte, de ahí el barrido electroforético, lo que significa que los recursos del medio se encontraban agotados.

Posterior a la propagación, se llevó a cabo una digestión enzimática (figura 15) que tenía como finalidad, 1) Garantizar la presencia del plásmido, 2) Evaluar la integridad de este. La digestión involucro dos enzimas, EcoRI (sitio de corte 1934) y HindIII (sitio de corte 3956). Para esta digestión se contemplaron dos digestiones simples con cada una de las enzimas para linealizar el plásmido (4274 pb) y una digestión doble para obtener dos fragmentos de 2586 y 1688 pb. Las bandas de electroforesis obtenidas para ambas digestiones coinciden con el tamaño de plásmido deseado por lo que se puede decir que el episoma se encuentra íntegro.

Es necesario que la extracción del plásmido no solo proporcione a este en concentraciones elevadas, teniendo una importancia equivalente la calidad y la pureza de este. Generalmente, los kits comerciales permiten la separación de la mayoría de los

componentes celulares, aunque no pueden evitar completamente la presencia de proteínas u otros componentes, y cuando se habla de la extracción sin el uso de estos kits también se debe contemplar la probable contaminación con químicos como el fenol o etanol (Armbrecht, 2013). Esto es importante debido a que el proceso de formación de los complejos entre el DNA y el quitosán se basa en interacciones electrostáticas entre ambos biopolímeros, para que esta interacción se dé es necesario que ambos componentes se encuentren “libres” de cualquier interacción inespecífica que pueda afectar las fuerzas electrostáticas.

Las muestras finales obtenidas en la propagación del plásmido contaban con una contaminación remarcable de proteínas. Esta contaminación representaba un inconveniente ya que diversas proteínas son capaces de interactuar con el DNA y de esa manera afectar su carga. Las proteínas se asocian con el DNA mediante cuatro tipos de uniones: interacciones dipolares (puentes de hidrogeno), efectos entrópicos (interacciones hidrofóbicas), fuerzas de dispersión y uniones electrostáticas (Volz, 2020). Aunque normalmente se cree que las proteínas se unen de manera específica de secuencia, pueden llegar a suscitarse uniones no específicas (más débiles en comparación). Por otra parte, el origen de las proteínas dentro de la muestra se debe a una “sobrecarga” de biomasa en la lisis alcalina, ya que la biomasa del caldo de cultivo era demasiada para las condiciones del kit, el fabricante recomienda en estos casos, reducir el volumen del medio de cultivo o el aumento de los buffers de la lisis alcalina (P1, P2 y P3) (QIAGEN, 2021), por lo que es probable que las proteínas presentes en las alícuotas de plásmido no sean capaces de interactuar con el mismo ya que su presencia está más bien influenciada por las condiciones de la extracción y no por afinidad. A pesar de esto, las muestras fueron tratadas por dos metodologías diferentes que eliminarían mayormente la interferencia por proteínas, la extracción a partir de gel de agarosa y la precipitación salina. Respecto a las relaciones 260/280 para la extracción por kit y por precipitación salina (tabla 12 y 13, respectivamente) se obtuvo una mejoría más pronunciada mediante el uso del kit comercial, ya que para la precipitación salina si se mejoraron las relaciones, pero no para todas las muestras, conservándose para algunas de ellas valores no óptimos. Por otro lado, no debe despreciarse el efecto en términos de la concentración y es que el inconveniente del kit es la obtención de pequeñas concentraciones de DNA (menores a las mínimas necesarias), mientras que la precipitación salina no afecta demasiado las concentraciones de las muestras. Ante estos resultados se llevó a cabo un procedimiento en donde se evaluaba la interferencia potencial que podrían tener las proteínas sobre la interacción del DNA con el péptido cariofílico 1 (que interactúa electrostáticamente con el DNA) a una concentración de 0.2 μM (determinada como “óptima” para un plásmido de tamaño similar a pHSVTK) y como consecuencia generando cambios en el retardamiento dentro del gel (figura 16),

observándose que no existe diferencia alguna entre el retardamiento de las muestras obtenidas por el mega kit (sin tratamiento) y la muestra extraída del gel de agarosa, determinándose de esta manera que las proteínas presentes en la muestra no eran capaces de interactuar de ninguna manera con el DNA. Como precaución todas las alícuotas de trabajo fueron sometidas a precipitación salina. En adición, la muestra cargada en el pocillo 1 (figura 16) exhibe una migración diferente debido a que la lisis alcalina es un procedimiento más agresivo y por ende afecta el grado de enrollamiento del plásmido lo que se refleja en la menor migración respecto a la obtenida por Megaprep.

9.2. Determinación de las relaciones de los componentes de los nanocomplejos

Nuestros nanosistemas diseñados para terapia génica consisten esencialmente en tres componentes: Péptidos con señales NLS o “cariofílicos” que tienen como finalidad facilitar el paso del episoma través del complejo de poros nucleares, el quitosán que constituye al polímero catiónico que está encargado de “encapsular” al material genético (mejor dicho el trabajo de este material consiste en compactar el episoma) permitiendo su paso a través de la membrana celular y el escape del endolisosoma, y por último y más importante, el inserto que va destinado a cumplir la función “terapéutica” en la célula hospedadora (apoptosis).

En primera instancia, los péptidos cariofílicos usados en este proyecto fueron dos. Estos péptidos fueron adquiridos de manera comercial de la marca LifeTein™. La secuencia de estos péptidos resulta crucial para que estos sean capaces de interactuar con el DNA, en particular se debe prestar especial interés a aquellos aminoácidos que presenten una carga positiva, pues serán estos los que cuenten con la capacidad de interactuar con el mismo mediante uniones electrostáticas.

El quitosán empleado para la formación de los complejos, como se mencionó en el apartado de la metodología es de obtención propia, particularmente fue sintetizado por la Dra. Patricia Miranda, por un método de su propia autoría (México Patente nº 293022, 2000). Las características de especial interés de este reactivo son su peso molecular de 20.6 kDa y su grado de desacetilación el cual oscilaba alrededor del 85-90%. Este reactivo se manejó en stocks del 1% ajustados a un valor de pH de 5.5, este valor de pH es importante no solo para conservar soluble al quitosán sino también para preservar la integridad del plásmido, ya que Arango & Colaboradores en el año 2006 llevaron a cabo un estudio en donde se evaluaba el efecto que tenía el pH al interactuar con el material genético y sobre la influencia de los cambios de pH sobre complejos a base de neurotensina y poli-L-lisina ya formados, encontrándose mediante una electroforesis, que en valores ácidos y básicos de pH el material genético sufre una desnaturalización y afecta la formación de los complejos,

llegando a tal grado que para el DNA en solitario a valores aproximados de pH de 4.5 se pierden las isoformas del episoma y se cuenta con una única banda que migra mucho más, mientras que para el efecto sobre los complejos ya formados, valores entre 7.2-6.0 generan que se observe plásmido libre en el gel de electroforesis, lo cual en los valores de formación de los complejos (7.4) no es observado, a valores entre 5.7-5.1 el plásmido libre deja de ser visualizado la electroforesis, mientras que a valores inferiores los complejos simplemente desaparecen.

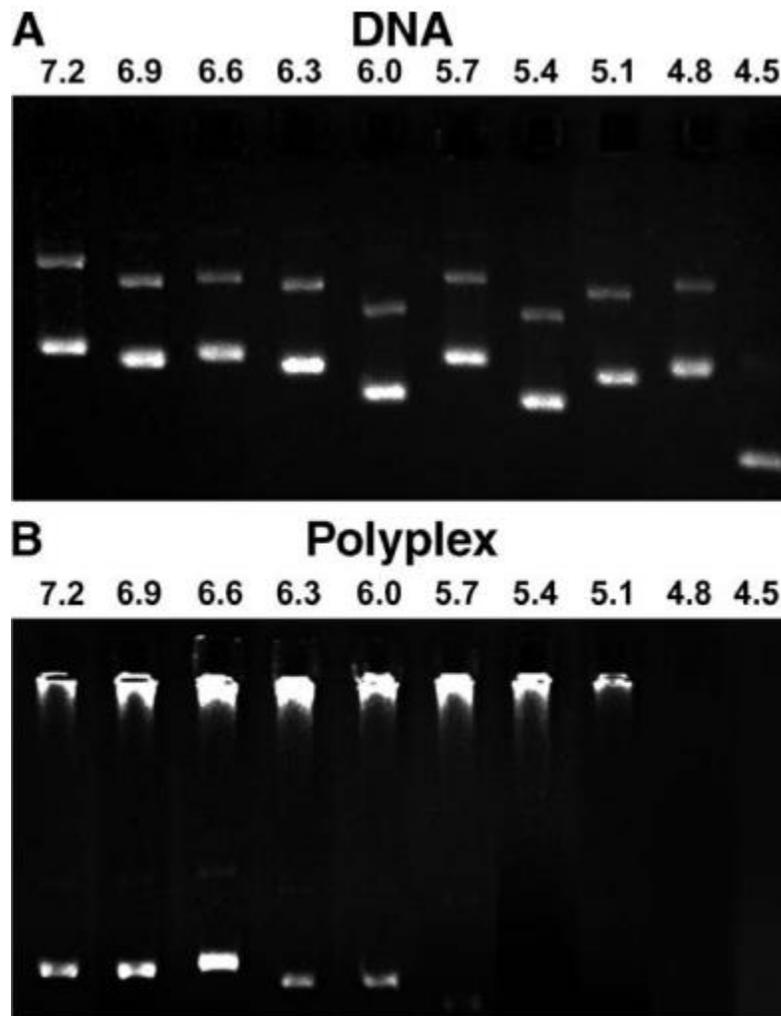


Figura 41. Efecto del pH sobre la retención del DNA y la formación de complejos con neurotensina. Fuente: Arango-Rodríguez & Colaboradores, 2006. Gel de agarosa 0.8 %, y se corrió a 80 mV.

Es necesario entender qué sucede sobre el material genético y por qué sucede esta variación en la movilidad electroforética. Dentro de la molécula de DNA existen dos enlaces que son cruciales en este fenómeno, primero tenemos los puentes de hidrógeno que se dan entre cada una de las hebras que componen al DNA y por otro lado los enlaces N-glucosídico

que son los que conectan las bases nitrogenadas a la azúcar dentro de una misma hebra de material genético, en términos de energía de enlace, los enlaces N-glucosídico son mucho más fuertes que los puentes de hidrógeno debido a que estos últimos son interacciones intermoleculares débiles, mientras que los enlaces N-glucosídico son enlaces covalentes fuertes. Teniendo esto en cuenta, existen dos escenarios posibles para el efecto que tiene el pH, la desnaturalización y la depurinización. La desnaturalización por acción del pH ocurre en valores elevados, ya que el aumento en los grupos hidroxilo presentes en el medio afecta a la estabilidad de los puentes de hidrógeno desencadenando una separación entre las cadenas que componen al DNA. Este proceso es reversible al neutralizarse los valores de pH. Mientras que la depurinización ocurre cuando se elimina el enlace N-glucosídico que existe entre la base nitrogenada y el azúcar, lo que genera que se pierdan residuos de adenina o guanina (bases púricas) (Mena Enríquez, Flores Contreras, Sandoval Rodríguez, & et al., 2016). En términos de valores de pH, se ha encontrado que generalmente el DNA es estable entre valores de 5 a 9, y conforme se acerca a la alcalinidad es susceptible a la desnaturalización; para valores inferiores a 5 el material genético es propenso a la depurinización y la ruptura de los enlaces fosfodiéster; por último, la depurinización igual puede ocurrir en valores muy elevados de pH (Bioquest Inc, 2021). Además, los polímeros catiónicos son capaces de unirse al DNA, mediante interacciones electrostáticas facilitadas por su carga positiva, esta carga positiva de los polímeros se ve influenciada por las variaciones en el pH, ya que normalmente estos materiales cuentan con aminas primarias que en condiciones ligeramente ácidas son capaces de generar las cargas positivas, las cuales son capaces de interactuar con los ácidos nucleicos (Raafat & Sahl, 2009). Por ende, al hacerse variaciones en los niveles de pH, la cantidad de cargas positivas puede llegar a verse afectada. Es por este motivo que se comienza a liberar el DNA que se encontraba interactuando con la poli-L-lisina conforme los valores de DNA van disminuyendo, sin contar el papel del pH sobre el DNA en sí, la desaparición completa de los complejos en el pocillo a valores elevados se relaciona con la completa desnaturalización de la cadena de DNA y su subsecuente separación del polímero.

Esta información fue demostrada de manera experimental para el quitosán como polímero catiónico, ya que como demostró Olivo durante el año 2022, complejos con el plásmido pEGFP-N1 codificante para la proteína verde fluorescente y quitosán, se observó que al realizarse una dispersión dinámica de la luz (DLS) en sistemas que contaban con un valor aproximado de pH de 4.5 se observaban lecturas de tamaño de partícula mayores a los 800 nm, el cual es muy elevado al compararse con los complejos realizados a pH 5.5 (valor normal de formulación de los complejos). Al notarse esta variación en el valor deseado de pH se realizó un ensayo de retención a diferentes valores de pH tal cual es mostrado en la figura 20, deduciéndose que a pesar de que no exista un efecto aparente en la retención

del plásmido por parte del quitosán, estas variaciones en el pH afectan el tamaño y carga de superficie de los complejos.

Cuando se habla de coacervación compleja existen demasiados factores que pueden influir al momento de tener complejos cuya forma y tamaño sean “adecuados”, entre estos factores se encuentra la relación quitosán/DNA y la fuerza iónica del medio. Los complejos a base de quitosán pueden presentar conformaciones: toroidales, de bastón, forma de placa y esféricas. Ahora, dentro de estas conformaciones se tiene una especial predilección por la forma “esférica”, que aparte de los motivos definidos con anterioridad en este trabajo, esta forma ejerce un efecto protector sobre la acción de la DNAsa (Liu, Molas, Grossmann, & et al., 2011). Teniendo esto en cuenta las diluciones de plásmido a 100 ng/μL fueron preparadas en sulfato de sodio 25 milimolar. La decisión de añadir el sulfato de sodio se basa en los resultados reportados por Trejo durante el año 2012, en donde nanopartículas construidas con el plásmido pEGFP y quitosán formuladas por el mismo proceso de coacervación compleja empleado en este trabajo formaban una “placa” al ser observadas por SEM. Indicando que la formación de esta placa se da por el aparente exceso en el quitosán y descartando la disminución de quitosán por los resultados de retención electroforética. Por este motivo y a manera de favorecer la conformación esférica se aumentó la fuerza iónica y en consecuencia la cantidad de contraiones negativos que neutralizarían las cargas “excesivas del quitosán”, esta hipótesis se demuestra al hacerse la comparación de las microfotografías antes y después de la adición del sulfato de sodio (Trejo, 2022).

A raíz de que la interacción entre el plásmido, los péptidos cariofílicos y el quitosán se da por interacciones electrostáticas, es crucial ajustar la relación entre los componentes con la finalidad de evitar dos posibles escenarios: 1) La no completa encapsulación del episoma y por consecuencia la ineffectividad del efecto protector sobre nucleasas y otros componentes extracelulares. 2) Un exceso en las cargas positivas en la matriz, resultando en conformaciones topológicas diferentes a esferas y una baja captación celular. Los ensayos de retardamiento y retención tienen como fin el de ajustar las concentraciones de los péptidos y el quitosán, respectivamente para evitar estos resultados.

Existe mucha información respecto a la concentración (y la forma de determinarla) a la que deben estar los péptidos cariofílicos, estando está en función de la longitud del episoma y el proceso mismo al que van a ser sometidos los complejos, ya que, por ejemplo, existen protocolos en donde se busca la condensación completa del DNA usándose únicamente los péptidos cariofílicos sin emplear algún polímero catiónico (Bremner, Seymour, Logan, & et al., 2004). Para el caso particular de los sistemas con pHSVTK se busca que al interactuar el plásmido con el péptido NLS solo se retarde la migración en un gel de electroforesis a la mitad de la altura correspondiente a la banda de DNA desnudo, con la finalidad de observar

la interacción y garantizar que esta no sea suficiente “grande” como para alterar la condensación por parte del quitosán (gel de referencia en el anexo 4) (Hernandez-Baltazar, Martinez-Fong, & Trudeau, 2012); (Martinez Fong & Navarro Quiroga, 2000). De este ensayo de retardamiento (figura 17) 0.15 y 0.5 μ M fueron definidas como las concentraciones de trabajo de los péptidos 1 y 2, respectivamente.

En términos de ensayos de retención, lo que se busca es que se impida la migración completa en el pocillo, esta falta de migración indica que ya no existe material genético sin interactuar con el quitosán, siendo ideal una desaparición de la fluorescencia en el mismo, ya que el DNA estaría tan encapsulado que el tinte fluorescente no es capaz de entrar al complejo y por ende no ejerce su función. Se llevaron a cabo dos ensayos de retención (figura 18 y 19) el primero de ellos hasta una concentración de 0.16 % de quitosán [7.77 mM] y el segundo hasta 0.20 % [9.71 mM]. En ninguna de las concentraciones se consiguió la completa desaparición del material genético de los pozos, ya que el quitosán no interactúa “tan fuerte” como en otros plásmidos, por ejemplo, pEGFP en donde si se logra la completa desaparición en el pocillo. Teniendo esto en cuenta, la concentración a usar de quitosán fue definida como 0.16 % para ambos péptidos cariofílicos, optándose por una concentración no tan elevada, ya que como se definió con anterioridad, un exceso en las cargas positivas por parte del polication favorece la formación de una placa en los complejos.

9.3. Evaluación de las características físicas de los sistemas

Si bien estas concentraciones impiden la migración del episoma en una matriz electroforética, no se garantiza su funcionalidad con tan solo ajustar las relaciones molares de cada uno de los componentes, con ese fin se realizan mediciones del tamaño de los complejos, su carga de superficie, además de una evaluación de su forma física por microscopia electrónica. En términos generales, no se observan variaciones considerables en los complejos con y sin péptido cariofílico (tabla 15), tanto en su tamaño, en la carga de superficie (potencial zeta) o en su índice de polidispersión (medida de dispersión de las muestras) (IPD). El tamaño general de los sistemas se encuentra alrededor de 350 nm, al ser ordenados de manera ascendente primero se encuentran los sistemas preparados con el péptido 2, los sistemas control (sin péptido) y con el péptido 1. Si bien los sistemas control se prepararon a la misma concentración de quitosán que los sistemas que emplean péptidos NLS, en teoría estos sistemas deberían ser los complejos de mayor tamaño pues al no contar con las cargas positivas proporcionadas por los péptidos cariofílicos debería ser necesaria una mayor concentración de quitosán para lograr el mismo tamaño de los complejos o grado de compactación. La razón detrás de esto se localiza en la naturaleza misma de los

ensayos para determinar las relaciones entre los componentes de la matriz, declarándose de esta manera que el criterio de “mitad de banda” es el adecuado para no descompensar la formación de los complejos DNA/quitosán por coacervación compleja, ya que al no ser incluidos los péptidos cariofílicos no se ve afectada de manera significativa el tamaño de los complejos. Ahora, otra hipótesis pudiera encontrarse en una falta de interacción entre los péptidos NLS y el episoma, y es por eso que no se observan variaciones en el tamaño de los complejos, esto se descarta al comparar el potencial zeta de los sistemas, ya que los sistemas control son aquellos con un menor potencial zeta, siendo seguidos por los sistemas con el péptido 1 y el péptido 2, este potencial zeta menor en contraste con los sistemas que contienen señales NLS, se debe a que no se cuenta con el aporte en cargas positivas que bridan los péptidos, de ahí el valor menor, mientras que el comportamiento entre los sistemas con péptido se encuentra en su concentración, ya que se utiliza una mayor concentración de péptido 2 al momento de ensamblar las nanopartículas, la diferencia no es tan pronunciada debido a que como se mencionó con anterioridad, el péptido 1 cuenta con una mayor cantidad de cargas positivas en su secuencia, lo que ayuda a compensar las discrepancias. Por último, los valores en el IPD indican que los sistemas no son muy dispersos ya que se encuentran por debajo del valor de referencia (0.5), por lo que el proceso de encapsulación resulta no solo reproducible si no que genera una población bastante homogénea de complejos.

Como otra estrategia para mejorar la eficiencia de transfección de los complejos se ensamblaron nanopartículas que contienen al péptido liberador de la gastrina (GRP), y es que se ha demostrado que el receptor para este péptido se encuentra sobre expresado en diferentes tipos de tumores (Patel, Shulkes, & Baldwin, 2006), como los complejos cuentan con GRP en su superficie entonces van a unirse a los receptores que están sobre expresados y por ocupación de los receptores va a ser facilitada la endocitosis (similar a los vectores virales) (Universidad Nacional de San Martín, 2017). Estos complejos cuentan con un mayor tamaño en comparación al resto, aunque sin llegar a ser significativo, y esto se relaciona con el proceso de acoplamiento del ligando, ya que las nanopartículas son formadas con normalidad y sobre estas se adiciona el ligando (con sus respectivos preparativos), y como el acoplamiento se da por puentes sulfhidrilo y no por interacciones electrostáticas, los complejos no se van a compactar más por la neutralización de cargas, de ahí el aumento del tamaño de los complejos. Por esta misma razón se observan las variaciones significativas en el potencial zeta de los complejos, puesto que se añaden por cada molécula de GRP al menos 4 aminoácidos con carga positiva (lisina, arginina e histamina) que no son neutralizados por las cargas negativas del episoma, aportando una gran cantidad de cargas positivas que no interaccionan electrostáticamente, lo que se ve reflejado en el aumento del potencial zeta (casi al doble que los sistemas con péptidos cariofílicos).

En términos de forma física, los complejos contenedores del péptido 2 fueron sometidos a SEM (figura 29) fueron visualizados con forma esférica, observándose principalmente diversos cúmulos de partículas que a menores enfoques (paneles A-C) son fácilmente confundibles con complejos completos, pero al aumentarse el enfoque se observa la presencia de lóbulos y por ende la formación de los agregados. También debe hacerse una observación adicional, en el panel D de la figura 29 se registra que el tamaño de los complejos medido por microscopía electrónica de barrido (SEM) en promedio es de 75.55 ± 7.22 nm, si bien a primera vista se puede considerar como una discrepancia en las mediciones de DLS, la explicación detrás de este fenómeno se localiza en los ensayos de retención, como se mencionó previamente, en los ensayos de retención se debe visualizar la desaparición del material genético dentro del pocillo, el hecho de que este aun pudiera visualizarse en el no indica otra cosa más que existen segmentos de DNA aún expuesto, este material genético exhibe cargas negativas (cargas que son insignificantes al compararse con la carga neta de los complejos), lo que genera que los complejos comiencen a interactuar unos con otros uniéndose este DNA aún expuesto con otro complejo (recordemos que la carga de superficie de los mismos es positiva) y formen cúmulos de nanopartículas que al ser medidos en la DLS son registrados como complejos de gran tamaño, estos “cúmulos” pueden ser visualizados en cada una de las fotografías de la microscopía. A su vez, este fenómeno puede explicar el comportamiento de los gráficos de tamaño en donde se visualiza una población considerable de complejos de menor o mayor tamaño al máximo de intensidad.

9.4. Estandarización de la transfección

La transfección celular se encuentra en función de múltiples factores como: el tipo celular, la viabilidad y la confluencia, los componentes del medio como lo es el antibiótico y la presencia o no de suero fetal bovino, incluso el tipo de inserto empleado en la transfección y el método mediante este es internalizado (ThermoFisher Scientific, N/R). Con la finalidad de estandarizar las condiciones ideales para la transfección de sistemas a base de quitosán ensamblados por coacervación compleja en las líneas celulares de cáncer cervicouterino se llevaron a cabo protocolos de nanopartículas con dos plásmidos codificantes para la proteína verde fluorescente: pEGFP y pQBI25.

Los dos primeros experimentos fueron llevados a cabo en ausencia de suero, debido a recomendaciones de múltiples protocolos (Shah, Sakthivel, Toth, & et al., 2000), se obtuvo fluorescencia aunque su colocalización con el resto de filtros (y en consecuencia a las estructuras celulares) no resultaba completamente favorable, sin contar el pequeño número de células transfectadas, puesto que la gran mayoría de campos se encontraban

vacíos en el filtro FITC (verde), por lo que se adicionó suero en el último protocolo observándose fluorescencia en mayor cantidad e intensidad (figura 30). Este comportamiento no solo se observó en los sistemas preparados con quitosán de bajo peso molecular, sino que se observó transfección tanto con los péptidos NLS, el uso de quitosán de alto peso molecular (aunque en mucha menor medida) y con GRP como ligando para el plásmido pQBI25.

Los primeros dos protocolos se hicieron en ausencia de suero debido a que múltiples autores y fabricantes indicaban una potencial interferencia por proteínas de este, incluso en algunos casos era completamente contraindicado. El primer motivo detrás de esto se encuentra en que la calidad del suero afecta considerablemente al crecimiento celular y en consecuencia la transfección al ser completamente dependiente del número de células. Por otra parte, se debe considerar la presencia de suero desde la formación de los complejos pues la formación de los complejos se ve comprometida en presencia de suero, a pesar de esto el suero es empleado en la formación de múltiples complejos destinados a terapia génica (incluso en diferentes esquemas de tratamiento). Ahora, durante la transfección específicamente, el suero no es adecuado cuando se transfecta RNA debido a una potencial contaminación con RNAsas, aunque para el DNA generalmente se reporta una mejora en la transfección en presencia de suero (ThermoFisher Scientific, N/R).

Para poder entender el motivo detrás de la mejora en la transfección sobre el DNA se deben retomar una de las desventajas de los vectores no virales: la posibilidad de interacciones adversas con macromoléculas cargadas negativamente. Estas macromoléculas pueden provenir de componentes del suero (inmunoglobulinas o lipoproteínas) o por las mismas superficies celulares (células endoteliales, linfocitos y eritrocitos), esta unión no solo tiene consecuencias al momento de alcanzar las células diana, sino que puede generar la degradación de los complejos por la interacción con determinados polianiones. No todas las interacciones con componentes del suero son perjudiciales, pues si ese fuera el caso no se vería potenciada la transfección al enriquecer el medio de cultivo con él. La albumina no solo es la proteína más abundante del suero, si no que diversos estudios han demostrado que la unión con esta proteína evita la degradación de los complejos por uniones con polianiones. En adición, se ha reportado que esta asociación (igual con la transferrina que igual está presente en el suero) potencia la entrega de genes en multitud de células (incluidas las células primarias) sin necesidad de uniones ligando-receptor, mediando entonces la endocitosis, esto debido a que se ha reportado que la albumina cuenta con la habilidad de facilitar la fusión de membrana bajo condiciones ácidas, aunque el mecanismo preciso detrás de este proceso no ha sido completamente dilucidado. Por último, la albumina es una proteína con función fusogénica la cual (en condiciones ácidas) desestabiliza al endosoma, facilitando aún más la entrega del vector debido a que el escape

del endolisosoma no depende únicamente del efecto esponja de protones (Simoes, Slepishkin, Pires, & et al., 2000).

9.5. Ensayos de internalización del plásmido

El mecanismo de acción de los nanocomplejos consta de cuatro pasos generales: 1) La entrada por endocitosis, 2) El escape del endolisosoma, 3) Entrada al núcleo celular, 4) Transcripción del gen de interés. La traducción del transcrito si bien es fundamental deja de estar en función de los complejos formados, recayendo este paso y los subsecuentes en las características del gen y no de los complejos.

Ahora, antes de poder evaluar los niveles de expresión del gen de interés es necesario garantizar la interacción de los complejos con la membrana celular y su paso a través de esta. Si bien se puede garantizar la afinidad que tienen los complejos por las células, debido a que en observaciones por microscopia óptica en el T0 de administración de los complejos se observan aglomerados de nanopartículas (visualizados como pequeños gránulos) en la periferia de la membrana celular, se debe vislumbrar de manera clara la entrada de estos complejos al citoplasma. Para este fin existen diversas técnicas, entre las que se encuentra el marcaje del episoma. El plásmido puede ser marcado con sustancias como el yoduro de propidio, el cual se une al DNA intercalándose entre sus bases de manera inespecífica y generando una fluorescencia roja (ThermoFisher Scientific, N/A). Este tinte es ideal para el marcaje de manera específica debido a que la membrana celular intacta no permite el paso del yoduro que no se encuentre conjugado con el plásmido. Ahora, el tiempo que tardan los complejos depende mucho del método empleado para llevar a cabo la transfección y del tipo de célula a la que se le va a introducir el material genético, diversos autores reportan la internalización entre los 15 a 30 minutos. Fueron preparados tres sistemas para evaluar su internalización a los 15, 30 y 60 minutos, el primero de ellos un sistema "control" que contenía complejos sin péptido NLS o cariofílico, en este sistema no se observó internalización en ningún campo (figura 31), aunque si se visualizan algunos complejos marcados fuera de la célula en células HeLa (figura 34). Para los complejos preparados con el péptido 1, en la figura 32 se registra la entrada de los complejos a los 30 minutos, observándose estos complejos tanto en el citoplasma como sobre el núcleo (estructuras azules), a los 60 minutos se observan menos estructuras de pequeño tamaño, aunque con un aumento de estructuras fluorescentes grandes el cual es un fenómeno que se ha registrado con anterioridad que se encuentra en función del tiempo. Para los sistemas que cuentan con el péptido 2 no se registra una aparente internalización a los 30 minutos en células SiHa (figura 33), aunque si en células HeLa (figura 34), viéndose la colocalización entre yoduro de propidio y núcleo hasta los 60 minutos en donde se ve internalización del

plásmido sobre el citoplasma. Como modelo celular de trabajo para estos ensayos de internalización se emplearon las células de cáncer cervicouterino SiHa, la línea celular HeLa fue usada para la internalización de los sistemas control a los 15 minutos y para los sistemas con péptido 1 y 2 a los 30 minutos (figura 34). De esta prueba con diferente línea celular se observa que el péptido 2 si exhibe internalización a los 30 minutos, no siendo vislumbrada con anterioridad debido a la preparación, y registrándose un comportamiento similar para el caso del péptido 1. No se observan grandes cambios al comparar el comportamiento de internalización del plásmido entre estas dos líneas celulares, resultados concordantes con los experimentos de estandarización de condiciones de transfección en donde ambas líneas resultaron (a simple vista) ser igual de competentes para la expresión de la proteína verde fluorescente.

Aparentemente la internalización no se da en una frecuencia lo suficientemente elevada, encontrándose por campo un intervalo de 1-3 células transfectadas, aunque estos datos no deben ser usados para medir la eficiencia de internalización de forma cuantitativa, siendo necesario un mayor tiempo de tratamiento, comprobado en los ensayos de viabilidad celular en donde el tratamiento se dio durante 16 horas y el porcentaje de efectividad es bastante elevado. Estos resultados garantizan la entrada de los complejos al interior de la célula, no se puede asegurar (a pesar de la colocalización nuclear) el escape del endolisosoma ni mucho menos el resto de los pasos que siguen los complejos al interior de la célula hospedadora, para eso es necesario otros análisis.

9.6. Evaluación de la expresión del gen terapéutico mediante rtPCR

Para poder medir la transcripción se diseñó un par de primers cuyo producto de amplificación tiene una longitud de 328 pares de bases (anexo 6). En teoría su temperatura de alineamiento es de 58.94°C, a pesar de esto se determinó este valor mediante diversas plataformas e incluso de manera manual obteniéndose resultados muy variados de este parámetro; para evitar inconvenientes se llevó a cabo una PCR de gradiente T empleando plásmido de la propagación en bacterias TOP10 para obtener el mejor valor de temperatura de alineamiento (figura 38), llevándose a cabo otra reacción de gradiente de temperatura para los primers de actina (control de carga) (figura 39). De estas reacciones se definió 48.4°C como la temperatura de trabajo ya que en esta no existían productos inespecíficos para ambas reacciones. Con esta temperatura se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (rtPCR) sobre cDNA obtenido a partir de RNA extraído por kit comercial (figura 40). Gracias a la electroforesis se confirma la presencia del amplicón del mRNA de interés, reportándose la presencia de actina como control de carga para el control negativo de HeLa, la amplificación del transcrito terapéutico (flecha) y actina

para el caso de los sistemas con P2 en células HeLa y la expresión de solo actina para NoP HeLa (flecha). Para la línea celular HeLa solo se registra amplificación del transcrito en los sistemas con tratamiento, no amplificando actina para esta línea celular, haciéndose un especial énfasis en la mayor intensidad para el sistema NoP SiHa, a pesar de eso no debe descartarse la intensidad de la banda de P2 SiHa que es considerable. A raíz de estos resultados se determina que en HeLa se tiene expresión en transcrito en los sistemas con señales NLS, siendo estas de utilidad para la internalización nuclear. Mientras que para SiHa los complejos son capaces de atravesar el complejo de poros nucleares incluso sin las secuencias NLS, esto significa que sus características físicas (y no solo las de los complejos sin péptidos, pues los sistemas no tienen diferencia significativa con o sin péptidos cariofílicos) tales como tamaño, carga de superficie y forma física son adecuadas para la transfección sin necesidad del empleo de mejoras en los sistemas.

Previamente con los ensayos de internalización no se podía asegurar la entrada de los complejos al núcleo celular, pero al complementarlos con los niveles de expresión del gen, se puede asegurar que estos complejos entran a la célula, escapan del endolisosoma, entran al núcleo celular y son transcritos, es decir los vectores diseñados a base de quitosán y formulados por coacervación compleja son capaces de ejercer su función como vehículo de entrada del DNA a la célula.

9.7. Curva de citotoxicidad del GCV

Habiendo demostrado la transcripción del gen mediante rtPCR, se debe comprobar la traducción del transcrito y como consecuencia la acción de la proteína terapéutica. A diferencia de la GFP que con su presencia genera una señal fluorescente que puede ser registrada con ayuda de microscopia de fluorescencia, resulta necesario para el caso de pHSVTK evaluar que la proteína terapéutica sea funcional. Para este fin se debe recordar que la timidina cinasa para ejercer su efecto terapéutico (la muerte celular) fosforila al ganciclovir para convertirlo en ganciclovir trifosfato y es este el compuesto que inhibe la DNA polimerasa.

El ganciclovir es utilizado en el tratamiento de infecciones de retinitis por citomegalovirus (CMV), usándose no solo durante la enfermedad, también después de ella y como prevención en personas con SIDA (American Society of Health-System Pharmacists, 2016). El ganciclovir como se mencionó con anterioridad necesita ser “activado” de manera muy selectiva por la cinasa del CMV pUL97 (Choi, Kah, Chung, & et al., 2013) o por la timidina cinasa del herpes simple, después de esta primera fosforilación las enzimas celulares llevan a cabo las fosforilaciones subsecuentes para convertirlo en ganciclovir trifosfato. Teniendo esto presente se entiende entonces que este medicamento es inocuo para pacientes que

no cuentan con títulos considerables de virus de la familia herpes, pero existe evidencia de que esta situación no es así. En primer lugar, este medicamento está contraindicado en personas que tengan o hayan tenido anemia debido a que disminuye el número de células sanguíneas, además múltiples protocolos reportan ensayos de toxicidad en células que no cuentan con las cinasas virales (por ejemplo, células endoteliales corneales). Este efecto citotóxico se explica debido a que particularmente existen tres cinasas celulares normales capaces de fosforilar al ganciclovir, deoxiguanosina cinasa (inducida principalmente en infecciones por CMV), guanilato cinasa y la fosfoglicerato cinasa (Matthews & Boehme, 1988). Si bien estas enzimas celulares son capaces de activar al ganciclovir se debe decir que la inhibición de la DNA polimerasa celular es mucho más débil en comparación con la polimerasa viral, en adición se ve amplificada la selectividad debido a la acumulación de ganciclovir trifosfato en las células infectadas o con la cinasa específica de origen viral.

Contemplando la posibilidad de citotoxicidad sobre las células sin transfectar y buscando que el profármaco no genere interferencia sobre la viabilidad celular se realizó una curva de sensibilidad al GCV [6.25-3200 $\mu\text{g}/\text{mL}$] (figura 35), seleccionándose como concentración de trabajo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentración en donde no se veía comprometida de manera considerable la viabilidad de las células y por ende se descartaría que las variaciones en la viabilidad celular al ser tratadas las células provengan del efecto citotóxico del profármaco. Otro motivo detrás de esta curva de sensibilidad se encuentra en la precaria información acerca de la dosis necesaria de ganciclovir para que la proteína transgénica sea capaz de ejercer el efecto terapéutico, así como las diferencias entre líneas celulares, por lo que al usar esta concentración de trabajo se garantiza añadir una cantidad considerable de GCV para que la enzima use como sustrato sin que comprometa la viabilidad de los sistemas.

9.8. Viabilidad celular por reducción de MTT

Para estos ensayos fueron adicionados 2 μg de plásmido terapéutico, empleándose la concentración de ganciclovir previamente determinada, los resultados en términos de viabilidad mostraron que la transfección con los vectores y la presencia de GCV son capaces de afectar considerablemente la viabilidad de los sistemas (figura 36) obteniéndose los mejores resultados en la línea celular HeLa con los complejos con el péptido cariofílico 2 y el ligando GRP, complejos con únicamente el péptido 2 y complejos sin péptido NLS (en orden descendente de viabilidad), teniendo que estos cuentan con diferencias significativas. Para la línea celular SiHa, la única condición que demuestra diferencia significativa son los complejos con el péptido 2 y sin GRP. Ahora, este comportamiento de los sistemas con GRP en las células SiHa, podría encontrar su motivo en que no existen reportes de la “sobrexpresión” del receptor de GRP en esta línea celular, realmente esta

posibilidad es descartada, debido a estudios realizados por Aguilar durante el año 2022, en donde demuestra un aumento considerable en la transfección, empleando vectores de naturaleza similar, variando únicamente el episoma por un gen reportero. Por lo que, para entender este comportamiento es necesario resaltar otros resultados obtenidos a partir del ensayo, además la masa de DNA que se adicionó (0.456 μg de DNA) es mucho menor en contraste a la adicionada para el resto de las condiciones experimentales, el motivo detrás de esta baja masa episomal es por la disposición limitada de los complejos con el ligando. Para los sistemas sin modificaciones la falta de transfección encuentra su explicación en la morfología característica de las células SiHa, apoyando esta conclusión en los ensayos de internalización en donde no se encontró internalización en la línea celular SiHa en ninguno de los tres tiempos analizados para los sistemas sin péptido cariofílico, repitiéndose este comportamiento para la línea celular HeLa, la diferencia entre líneas parece sugerir que la internalización en células HeLa ocurre pero a un ritmo más lento en comparación de los sistemas con señales NLS, mientras que en células SiHa pese a tener el mismo tiempo de tratamiento los complejos no son capaces de internalizarse.

Se realizó otro ensayo aumentando tanto la población estadística a 5 pocillos por condición, así como un aumento considerable de la masa de DNA en los sistemas de GRP (1.3679 μg) (figura 37). Para la línea celular HeLa las tres condiciones experimentales permanecen siendo significativas no reportándose un cambio considerable en la viabilidad de GRP en función del aumento de masa episomal, por lo que la reducción de viabilidad alcanzada en GRP para células HeLa es la máxima posible debido a la concentración limitada de GCV. Para el caso de las células SiHa, los sistemas NoP no disminuyen la viabilidad de forma significativa (reduciéndola apenas un 8 %) no descartándose una transfección menos exitosa que el resto de las condiciones, sobre todo comparado con los resultados de la RT-PCR en donde los sistemas de NoP SiHa si cuentan con amplificación del mRNA de interés. En los sistemas a base de GRP en células SiHa se encontró que al aumentar la masa de DNA (tres veces más que en el ensayo anterior, aunque sin ser equiparable a la masa del resto de condiciones) disminuyó considerablemente la viabilidad (a un porcentaje similar a la misma condición en células HeLa) por lo que la transfección en células SiHa requiere una mayor masa de DNA en comparación con las células SiHa.

Como previamente se mencionó fueron adicionados 2 μg de masa de plásmido (exceptuando GRP) inmersos en una matriz de pH 5.5 por sistema de transfección, y para alcanzar esta cantidad, fue necesario adicionar diferentes volúmenes de suspensión de complejos según fuera el caso, por lo que la relación volumétrica fue diferente para cada sistema y en consecuencia los nanocomplejos ejercieron diferentes efectos asociados a la matriz en donde se encuentran suspendidos. Mediante microscopía óptica se pudo determinar que esta diferencia en volumen influye en gran medida en los sistemas,

observándose en primer lugar que a menor volumen de matriz se observan menos nanopartículas en el ambiente extracelular y un mayor número de células, siendo los sistemas a base de GRP los más “amigables”, seguidos por los sistemas sin señales NLS y por ultimo los sistemas con el péptido cariofílico 2 son aquellos que reducen en mayor medida el número de células y que presentan una mayor cantidad de complejos sin internalizar en el ambiente extracelular tras 16 horas. Esta observación cualitativa se comprueba mediante los valores de viabilidad al comparar los pocillos que contienen nanopartículas en ausencia de GCV, teniéndose que no existen diferencias significativas en la viabilidad entre los sistemas a base de GRP y aquellos sin péptidos NLS en ambas líneas celulares, mayormente asociado al menor volumen de matriz, agregándose 20 y 40 μL , respectivamente. En contraste, si se presentan diferencias significativas entorno a la viabilidad al compararse los diferentes tratamientos con los sistemas con péptido 2, mayormente asociado al volumen de matriz adicionado que es de 60 μL el cual al ser colocado en los sistemas cambiaban el medio de cultivo a un color amarillo sin matices de rojo, siendo los únicos sistemas que tras 16 horas no fueron capaces de “tamponarse” completamente a diferencia del resto de condiciones. Este problema no está asociado a la naturaleza de los complejos, pues estos han demostrado ser inocuos en diferentes ensayos como los de internalización, en donde este fenómeno no se suscitaba debido a que la relación de volumen entre medio de cultivo y complejos es mucho menor, por lo que sería recomendable liofilizar los complejos ya formados para evitar que el pH de la matriz no altere estudios *in vitro* futuros. Ahora, esta susceptibilidad a las matrices no depende únicamente del pH en el que están suspendidos los complejos, ya que se encuentra estrechamente relacionado al estado de las células al momento de colocarse los diversos tratamientos, en el primer ensayo las células HeLa se encontraban en una calidad y cantidad que sin ser indicativos para cancelar el ensayo si eran para ser considerados, las células HeLa que no recibieron tratamiento al momento previo a realizarse la reducción de MTT se encontraban ya completamente recuperadas, viéndose menos debris celular en el ambiente y una confluencia adecuada, pero ese no fue el caso para aquellas que sufrieron la administración de los nanocomplejos sin GCV en donde esta recuperación no fue alcanzada, el tratamiento limitando en cierta medida su recuperación. Con anterioridad se hizo mención de que se aumentó la masa de DNA para GRP, agregando para esta condición el mismo volumen que para los sistemas P2 (60 μL), conservándose el mismo volumen para NoP (40 μL), en este ensayo no se reportan diferencias significativas al comparar la viabilidad entre los sistemas que no contienen GCV, solo se reporta una diferencia significativa al comparar P2 y GRP en células SiHa en donde la diferencia de viabilidad es de un 10%, a pesar de esto no se puede decir que esta disminución sea por las condiciones de la matriz, en su lugar puede deberse más a las diferencias inherentes al momento de trabajar sistemas biológicos.

Por último, los diversos sistemas en este ensayo presentan diversas “mejoras” enfocadas a aumentar la transfección y por ende reducir la viabilidad celular. Para la línea celular HeLa se observó que los sistemas con GRP en presencia de GCV reducen en mayor medida la viabilidad, seguidos por los sistemas con péptido 2 y por último los sistemas sin mejora alguna; se presentan diferencias significativas al compararse los sistemas con P2, pero no existe diferencia entre GRP y complejos sin modificar. Para la línea SiHa el comportamiento de los sistemas fue diferente, teniéndose una mayor disminución de la viabilidad para P2, seguidos por GRP y sistemas sin modificaciones, se descarta en mayor medida la reducción asociada a la funcionalidad de los complejos para GRP y sistemas “naturales” debido a que estos no presentan diferencias significativas en su reducción en presencia/ausencia de ganciclovir, por lo que la reducción a la viabilidad en estos sistemas se asocia más al efecto del pH de la matriz de los complejos. En el segundo ensayo de viabilidad al aumentarse la masa de DNA para GRP se reporta una diferencia significativa entre todas las condiciones al compararse con GRP, correspondiendo está a la condición que más reduce la viabilidad en células SiHa.

Se realizó una curva de sensibilidad al GCV para evitar un efecto citotóxico que llegara a causar interferencia con las condiciones experimentales. Primeramente, se usó como concentración 25 µg/mL, pero a esta concentración no se presentaban diferencias en la viabilidad, descartándose esta falta de efectividad por una transfección inefectiva, puesto que se había confirmado mediante RT-PCR la presencia del transcrito terapéutico, por lo que se aumentó a una concentración de 50 µg/mL. A pesar de esto, se introdujo en el segundo ensayo un control de GCV a la concentración de trabajo para descartar que la viabilidad fuera reducida por la presencia de GCV y no por la acción de los complejos. Obteniéndose una diferencia significativa para cada una de las condiciones experimentales al compararse con los controles (exceptuando NoP de SiHa en donde no se registró una reducción de la viabilidad, por lo que es congruente la falta de diferencia significativa), esta diferencia significativa entre los tratamientos y el control de GCV indican que efectivamente la reducción de la viabilidad se debe a la acción de la proteína terapéutica sobre el GCV convirtiéndolo en GCV-3P.

En los ensayos de internalización a pesar de verse transfección al encontrarse plásmido marcado al interior de la célula, resalta el hecho de que el número de células transfectadas es pequeño (debido al corto tiempo de tratamiento) al ser comparado con el porcentaje de viabilidad, en donde para la condición que menos redujo la viabilidad se murieron aproximadamente 10,000 células de un total cercano a 50,000. Y es que la muerte celular no se presenta únicamente en las células transfectadas, siendo liberado al medio extracelular GCV-3P que mata a las células de alrededor viéndose potenciado el efecto citotóxico por la acción de un efecto *bystander* o espectador local.

Recapitulando, la relación de volumen entre el medio de cultivo y la matriz de las muestras es capaz de afectar la viabilidad celular, aunque depende en gran medida del estado general de las células, viéndose una mayor reducción en células HeLa, así en células SiHa, por lo que las células SiHa demuestran ser más resistentes a estos cambios en el pH, resultado demostrado por microscopia óptica en donde el número de células SiHa no varió considerablemente (a diferencia de las células HeLa), aunque sí su morfología, la cual corresponde a células no diferenciadas mientras el pH era adverso y recuperando su morfología característica tras el cambio de medio a las 16 horas de transfección. Los tratamientos en células HeLa fueron exitosos en las tres condiciones encontrándose diferencia significativa; en las células SiHa el único tratamiento no exitoso fue con los sistemas sin péptido ni ligando, resultados comprobados por los ensayos de internalización en donde no se reportó internalización para los sistemas sin señales NLS. En células HeLa los sistemas que cuentan con mayor efectividad son los correspondientes a GRP que al ser comparados con el resto de las condiciones presentan diferencias significativas; aparentemente en la línea celular SiHa la mejor condición es GRP al aumentarse la masa de DNA, aunque sin presentar diferencias significativas al compararse con el sistema P2 en células SiHa.

10. Conclusiones

Fueron obtenidas las concentraciones óptimas de los componentes capaces de brindar características físicas adecuadas, que, a su vez, favorecen la formación de complejos esféricos (SEM). Se demostró que la presencia de contaminación con proteínas y variaciones en el pH no influyen en la retención electroforética de los complejos, pero sí en el tamaño y carga de estos. Los nanocomplejos obtenidos cuentan con un tamaño favorable para la internalización, una homogeneidad adecuada de los sistemas que indica que el proceso de ensamblado de los complejos es no solo reproducible si no que el efecto que tienen las variables sobre este es mínimo y, por último, los complejos cuentan con una carga de superficie positiva necesaria para la interacción con la membrana celular. Los poliplejos consiguen llevar a cabo su función, comprobándose mediante ensayos de internalización el ingreso de los complejos a la célula por endocitosis. En adición, se confirmó la llegada al núcleo y subsecuente transcripción con ayuda de una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) y de esta manera se concluye que los complejos ensamblados por coacervación compleja en presencia o no de péptidos cariofílicos ejercen su función de vehiculizar al DNA hasta el interior del núcleo celular y permitir la expresión del gen, esto último demostrado además por los ensayos de viabilidad que muestran variaciones en células transfectadas en presencia del profármaco, por lo que ejercen su

función terapéutica. En términos de viabilidad la mejor condición para ambas líneas celulares corresponde a los complejos con el ligando GRP, seguido muy de cerca por los sistemas con el péptido cariofílico 2 y por último los sistemas “control” que solo son efectivos en células HeLa por las características de esta línea celular.

Los complejos obtenidos son capaces de permanecer estables durante al menos un mes con formación de ciertos agregados de complejos, la estabilidad es capaz de perderse con el tiempo, reportándose que a los tres meses de almacenamiento a 5°C se da una degradación completa de los sistemas.

En conclusión, el quitosán y sobre todo los complejos a base de este biomaterial permiten la adición de biomoléculas que potencian en gran medida la eficiencia de transfección superando de esta forma la principal desventaja de los vectores no virales; considerándose los vectores construidos con este biomaterial y el gen de la timidina cinasa como un tratamiento potencial para los diferentes tipos de cáncer. Los resultados aquí plasmados constituyen la base para futuros estudios *in vivo* sobre la funcionalidad de las nanopartículas en el tratamiento del cáncer.

11. Perspectivas

Contemplando futuros estudios relacionados a estos sistemas de nanopartículas entre quitosán/timidina cinasa/agentes potenciadores de la transfección, debe considerarse primeramente realizar ensayos de internalización empleando un compuesto fluorescente activado por enzimas del citoplasma (calceína) que permita discernir específicamente en que compartimiento celular se encuentra el complejo, debido a que en este estudio se consideraron como artefactos aquellas señales fluorescentes que no se encontraban sobre el núcleo al no poderse observar el citoplasma celular.

Fue considerado en este estudio evaluar la estabilidad de los sistemas, manteniéndose estables durante al menos un mes, con la finalidad de garantizar una estabilidad mayor, así como un efecto menos agresivo en cultivo celular o incluso organismos vivos se debería acoplar una metodología de liofilización.

Los sistemas descritos en este trabajo tienen el potencial de convertirse en una terapia contra distintos tipos de cáncer siendo eficaces contra células de cáncer cervicouterino, por lo que debe contemplarse la realización de estudios *in vivo* que evalúen bioseguridad, biodistribución y eficacia terapéutica en modelos animales.

12. Bibliografía

- Acosta Torres, L. S., Arenas Arrocena, M., García Contreras, R., & et al. (2018). *Manual para la enseñanza práctica del ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas*. León: UNAM.
- American Cancer Society. (2019). *Efectos secundarios de la quimioterapia*. Obtenido de <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/efectos-secundarios-de-la-quimioterapia.html>
- American Society of Health-System Pharmacists. (15 de Mayo de 2016). *Ganciclovir*. Obtenido de <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a605011-es.html>
- Armbrecht, M. (2013). Detection of contamination in DNA and protein samples by photometric measurements. *eppendorf*(279). Obtenido de https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/59828/Eppendorf_Detection_Application-Note_279_BioPhotometer-D30_Detection-contamination-DNA-protein-samples-photometric-measurements.pdf
- Bellich, B., D'Angostino, L., Semeraro, S., & et al. (2016). "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. *Marine drugs*, 14(5). doi:10.3390/md14050099
- Berstad, A., Raa, J., & Valeur, J. (2015). Indole - the scent of a healthy 'inner soil'. *Microb Ecol Health Dis*(26). doi:10.3402/mehd.v26.27997
- Biomodel. (N/R). 3. *Superenrollamiento del DNA en la naturaleza*. Obtenido de <https://biomodel.uah.es/an/super/3naturaleza.htm>
- Bioquest Inc. (25 de Enero de 2021). *How does pH affect DNA stability?* Obtenido de <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/How-does-pH-affect-DNA-stability>
- BIOTED. (19 de Enero de 2017). *TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON pGAL (colonias azules)*. Obtenido de <https://www.bioted.es/protocolos/TRANSFORMACION-BACTERIANA-pGAL.pdf>
- Blanquicet, R., Flórez, C., González, Y., & et al. (2015). Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Polymers*, 25(1). doi:<https://doi.org/10.1590/0104-1428.1558>
- Bremner, H., Seymour, L., Logan, A., & et al. (2004). Factors Influencing the Ability of Nuclear Localization Sequence Peptides To Enhance Nonviral Gene Delivery. *Bioconjugate Chem*, 15, 152-161. doi:10.1021/bc034140k
- Cartier, R., & Reszka, R. (2002). Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Therapy*, 9, 157-167. doi:10.1038/sj/gt/3301635

- Cavazos Vallejo, T. (2013). *Construcción de nanocomplejos basados en partículas magnéticas, quitosán y un plásmido con secuencias de respuesta a campos magnéticos para mejorar la transfección*. (J. M. Alcocer González, Ed.) Universidad Autónoma de Nuevo León. Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/11753/1/1080215600.pdf>
- Cebrián Castillo, J. (2015). *SUPERENROLLAMIENTO, ENCADENAMIENTO Y ANUDAMIENTO DEL DNA EN PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS*. (J. B. Schwartzman Blinder, Ed.) Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid.
- Cell Signaling TECHNOLOGY. (N/R). *Synopsis of Cell Proliferation, Metabolic Status, and Cell Death*. Obtenido de 22: <https://www.cellsignal.com/science-resources/cell-viability-and-survival>
- Choi, W. S., Kah, J. W., Chung, T. Y., & et al. (2013). Cytotoxicity of ganciclovir on cultured corneal endothelial cells. *Antiviral Therapy*(18), 813-820. doi:10.3851/IMP2556
- Clínica Universidad de Navarra. (2020). *Terapia génica*. Obtenido de <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/tratamientos/terapia-genica>
- CNEGSR. (2016). *Información Estadística Cáncer de Mama*. Obtenido de <https://www.gob.mx/salud/cnegsr/acciones-y-programas/informacion-estadistica-cancer-de-mama>
- Coll, P., Coque, T. M., Domínguez, A. M., & et al. (2005). 18. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. En P. Coll, T. M. Coque, A. M. Domínguez, & e. al, *Procedimientos de microbiología. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (pág. N/R). Barcelona: SEIMC.
- Díaz Granados, C., & Chaparro Giraldo, A. (2012). MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49-61. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000100007
- Duarte, S., Carle, G., Faneca, H., & et al. (2012). Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now? *Cancer Letters*, 324, 160-170. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.05.023>
- González, M., & Vega, A. (2007). ¿CÓMO SUPERAR LA MEMBRANA CELULAR? *Revista de Salud Animal*, 29(1). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2007000100002
- Hernandez-Baltazar, D., Martinez-Fong, D., & Trudeau, L. E. (2012). Optimizing NTS-Polyplex as a Tool for Gene Transfer to Cultured Dopamine Neurons. *PLOS ONE*, 7(12). doi:10.1371/journal.pone.0051341

- INEGI. (4 de Febrero de 2021). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER*. Obtenido de COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 105/21: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
- INSP. (2020). *Dale la mano a la prevención del cáncer de mama*. Obtenido de <https://www.insp.mx/avisos/dale-la-mano-a-la-prevencion-del-cancer-de-mama>
- Invitrogen. (24 de Junio de 2015). *Lipofectamine 2000 Reagent*. Obtenido de https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Lipofectamine_2000_Reag_protocol.pdf?icid=cvc-lipofectamine-c1m2
- Invitrogen. (2016). *Choosing competent cells based on application*. Obtenido de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/competent-cell-decision-tree.pdf>
- InvivoGen. (1 de Diciembre de 2020). *pSELECT-zeo-HSV1tk*. Obtenido de A plasmid encoding a CpG-free HSV1tk: https://www.invivogen.com/sites/default/files/invivogen/products/files/pselect_zeo_hsv1tk_12b20v02.pdf
- Journal of Biological Methods. (16 de Enero de 2007). *Top 10 vs DH5 α* . Obtenido de <http://www.protocol-online.org/biology-forums/posts/23777.html>
- Kroemer, T. (N/R). *How to Choose Competent Cells*. Obtenido de https://www.goldbio.com/articles/article/how-to-choose-competent-cells#_Toc53142351
- Kroemer, T. (N/R). *Troubleshooting: Satellite Colonies*. Obtenido de <https://www.goldbio.com/articles/article/satellite-colonies>
- Kyung Kim, T., & Eberwine, J. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173-3178. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2911531/>
- Liu, G., Molas, M., Grossmann, G., & et al. (2011). Biological Properties of Poly-L-lysine-DNA Complexes Generated by Cooperative Binding of the Polycation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34379–34387. doi: 10.1074/jbc.M105250200
- Martinez Fong, D., & Navarro Quiroga, I. (2000). Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor. *BRAIN RESEARCH PROTOCOLS*(6), 13-24.
- Matthews, T., & Boehme, R. (Agosto de 1988). Antiviral Activity and Mechanism of Action of Ganciclovir. *Reviews of infectious diseases*, 10(3).
- McClelland, S. E. (2017). Role of chromosomal instability in cancer progression. *Endocrine-Related Cancer*, 24(9), 23-31. doi:10.1530/ERC-17-0187

- Mena Enríquez, M. G., Flores Contreras, L., Sandoval Rodríguez, A. S., & et al. (2016). *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (Segunda ed.). Ciudad de México, México: Mc Graw Hill. Recuperado el Junio de 2022
- Mieloma España. (2012). *Quimioterapia inicial*. Obtenido de <http://www.mieloma-multiple.org/quimioterapia-inicial.html>
- Miranda, S. P. (2000). *México Patente nº 293022*.
- New ENGLAND BioLabs INC. (N/A). *FAQ: Can I store competent cells at -20°C instead of -80°C?* Obtenido de <https://international.neb.com/faqs/0001/01/01/can-i-store-competent-cells-at-20-deg-c-instead-of-80-deg-c>
- Noguera, A., & Fermín, G. (Julio de 2013). Plataformas de expresión en plantas de péptidos humanos terapéuticos: expresión transitoria y estable. *Avances en biomedicina*, 2(3), 137-153. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/3313/331329479005.pdf>
- OMS. (2021). *Cáncer*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- OMS. (2 de Febrero de 2022). *Cáncer*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- OpenWetWare. (27 de Junio de 2021). *E. coli genotypes*. Obtenido de https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=E._coli_genotypes&oldid=1098511
- Padilla Peña, C. A., Díez Dapena, J., Martínez Galisteo, E., & et al. (16 de Septiembre de 2006). 17.- *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico*. Obtenido de <https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf>
- Patel, O., Shulkes, A., & Baldwin, G. (Agosto de 2006). Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1(1766), 23-41. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.01.003>
- Pedroso, M. (Septiembre de 2002). *Un comentario acerca de los motivos CpG*. Obtenido de <https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA146356055&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=0253570X&p=IFME&sw=w&userGroupName=anon%7Edc248426#:~:text=De%20forma%20general%2C%20puede%20decirse,estimulaci%C3%B3n%20de%20la%20respuesta%20inmune.>
- Prasad-Timilsena, Y., Akanbi, T., Khalid, N., & et al. (2018). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:[10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144)

- Prieto Álamo, J., López Barea, J., & Pueyo de la Cuesta, C. (2006). 37. Purificación de ácidos nucleicos. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Cordoba*. Obtenido de Universidad.
- Promega. (2019). *How to Choose a Cell Viability or Cytotoxicity Assay*. Obtenido de <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/cell-viability/>
- Promega. (N/A). *Transfection. Protocols for transfection and information on optimization*. Obtenido de <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/transfection/>
- QIAGEN. (Febrero de 2021). *QIAGEN® Plasmid Purification Handbook*. Obtenido de <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiagen-plasmid-kits/>
- Raafat, D., & Sahl, H. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential – a critical. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 186-201. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x
- Riss, T., Moravec, R., Niles, A., & et al. (2021). Cell Viability Assays. En S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, & et al, *Assay Guidance Manual [Internet]* (págs. 353-377). N/A: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences Bethesda (MD).
- Rodríguez-Pedroso, A., Ramírez-Arrebato, M., Riverto-González, D., & et al. (2009). Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie horticultura*, 15(3). Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000500012
- Ronchera, C. I., & González, J. M. (2002). 6. Terapia génica. *Farmacia hospitalaria*, 919-927.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Tercera ed.). Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanjurjo, P., Baldellou, A., Aldámiz-Echevarría, K., & et al. (2008). Los errores congénitos del metabolismo como enfermedades raras con un planteamiento global específico. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31(2). Obtenido de https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272008000400005
- Santos, I. (2009). Lipopoliplos y complejos monomoleculares de ADN como vectores de terapia génica. (S. Aliño, Ed.) Valencia, España: Universidad de Valencia. Obtenido de <https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/23421/sanmartin.pdf?sequence=1>
- Santos-Carballal, B., Fernández, E., & Goycoolea, F. (2018). Chitosan in Non-Viral Gene Delivery: Role of. *Polymers*, 10(444), 1-51. doi:10.3390/polym10040444

- Shah, D. S., Sakthivel, T., Toth, I., & et al. (2000). DNA transfection and transfected cell viability using amphipathic asymmetric dendrimers. *International journal of pharmaceutics*(208), 41-48. doi:10.1016/S0378-5173(00)00534-2
- Simoes, S., Slepishkin, V., Pires, P., & et al. (15 de Febrero de 2000). Human serum albumin enhances DNA transfection by lipoplexes and confers resistance to inhibition by serum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1463(2), 459-469. doi:[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00238-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00238-2)
- Stoddart, M. (2011). *Mammalian Cell Viability. Methods and Protocols*. Londres, Reino Unido: Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-108-6
- Thai, H., Thuy Nguyen, C., Thi Tach, L., & et al. (2020). Characterization of chitosan/alginate/lovastatin nanoparticles and investigation of their toxic effects in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 10(909). Obtenido de <https://www.nature.com/articles/s41598-020-57666-8#Sec1>
- ThermoFisher SCIENTIFIC. (22 de Agosto de 2002). *Zeocin™ - useful for selection in bacteria | eukaryotic | microorganisms | plant | animal cells*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/protocols/cloning/transformation-protocol/zeocin.html>
- ThermoFisher Scientific. (N/A). *Yoduro de propidio*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P1304MP>
- ThermoFisher SCIENTIFIC. (N/R). *Bacterial Transformation Troubleshooting Guide*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-troubleshooting-guide.html>
- ThermoFisher Scientific. (N/R). *Factor Influencing transfection Efficiency*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/factors-influencing-transfection-efficiency.html>
- Trejo, S. (2022). ENSAMBLAJE Y CARACTERIZACION FÍSICA Y BIOLÓGICA DE NANOPARTICULAS DE QUITOSÁN (20.6 Y 57.5 kDa) Y PLÁSMIDO pEGFP-N1 PARA SU USO EN TERAPIA GÉNICA. (*Tesis de licenciatura*). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM., Cuautitlán Izcalli.
- Universidad de Concepción. (2020). *DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR*. Obtenido de <http://www5.udec.cl/cade/wp-content/uploads/2020/08/biologia-biologia-molecular-dogma-de-la-biologia-molecular.pdf>
- Universidad Nacional de San Martín. (7 de Noviembre de 2017). *Entrada y Propagación*. Obtenido de Teórico N°3:

<http://iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/Virologia/1510077918.pdf>

Vera Lastra, O. L. (2006). Terapia génica. *Medicina interna de México*, 22(5), 422-438. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2006/mim065j.pdf>

Volz, A. (Octubre de 2020). *DNA interactions: understanding what your DNA is up to*. Obtenido de <https://www.bmglabtech.com/dna-interactions-understanding-what-your-dna-is-up-to/>

Wang, J., Lu, X. X., Chen, D. Z., & et al. (2004). Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 10(3), 400-403. doi:<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v10.i3.400>

Zymo Research. (10 de Junio de 2019). *3 THINGS TO KNOW FOR MAKING COMPETENT CELLS*. Obtenido de <https://www.zymoresearch.com/blogs/blog/3-things-to-know-for-making-competent-cells>

Zymo Research. (2022). *DOS & DON'TS OF PLASMID PURIFICATION*. Obtenido de <https://www.zymoresearch.com/blogs/blog/do-s-don-ts-of-plasmid-purification>

13. Anexos

Anexo 1. Composición de las soluciones empleadas.

Solución de NaSO₄ 25 mM

- Para 250 mL

$$250 \text{ mL} \times \frac{25 \text{ mmol}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} \times \frac{142.04 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.8878 \text{ g}$$

Ácido acético 1 %

- Para 50 mL

0.5 mL de ácido acético absoluto aforado con agua destilada hasta 50 mL.

Quitosán 1 %

- Para 50 mL

0.5 g de quitosán (20.6 KDA) disuelto en ácido acético 1 % hasta un volumen de 50 mL disuelto por agitación a 40°C.

Solución de lisis alcalina 1

- Para 6 mL

Glucosa 50 mM

$$6 \text{ mL} \times \frac{50 \text{ mmol}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} \times \frac{180.156 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.054 \text{ g}$$

Tris-HCl 0.25 M

$$6 \text{ mL} \times \frac{0.25 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{157.56 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.2364 \text{ g}$$

EDTA 10 mM

$$6 \text{ mL} \times \frac{10 \text{ mmol}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} \times \frac{292.2438 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.0223 \text{ g}$$

Todos los componentes se disolvieron en agua inyectable.

Solución de lisis alcalina 2

- Para 8 mL

NaCl 0.17 M

$$8 \text{ mL} \times \frac{0.17 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{58.44 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 0.0794 \text{ g}$$

SDS 1 %

0.08 mL del stock.

Todos los componentes se disolvieron en agua inyectable.

Solución de lisis alcalina 3

- Para 6 mL

Acetato de amonio 8 M

$$6 \text{ mL} \times \frac{8 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{77.0825 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 3.7 \text{ g}$$

Disuelto en 6 mL de agua inyectable

PBS 10X

- Para 100 mL

Cloruro de sodio 1.37 M

$$0.1 \text{ L} \times \frac{1.37 \text{ mol}}{1 \text{ L}} \times \frac{58.44 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{100 \text{ g RA}}{99.5 \text{ g RP}} = 8.0465 \text{ g}$$

Fosfato de potasio 20 mM

$$0.1 \text{ L} \times \frac{20 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \times \frac{174.2 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0.3484 \text{ g}$$

Cloruro de potasio 27 mM

$$0.1 \text{ L} \times \frac{27 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \times \frac{74.5513 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0.2013 \text{ g}$$

Fosfato dibásico de sodio 80 mM

$$0.1 \text{ L} \times \frac{80 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \times \frac{141.96 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 1.1357 \text{ g}$$

Anexo 2. Volúmenes utilizados para los ensayos de retardamiento y retención.

Ensayos de retardamiento.

Para realizar los ensayos de retardamiento primero se realizaron una serie de diluciones definidas como “madre” el aforo para las diluciones de los péptidos se realizó con agua libre de nucleasas y para la dilución de la muestra de plásmido se aforo con sulfato de sodio 25 mM. Las instrucciones para prepararlas se encuentran en la tabla 21.

Tabla 21. Volúmenes empleados para la preparación de las diluciones a utilizar en los ensayos de retardamiento y retención.

	Concentración del stock	Dilución	Volumen tomado del stock	Volumen de aforo
Péptido 1	2097.9 μ M	1:1000	0.6 μ L	600 μ L
Péptido 2	3030.3 μ M	1:800	0.75 μ L	600 μ L
Muestra de DNA*	3658.4 ng/ μ L	1:36.584	16.40 μ L	600 μ L

* La dilución como los volúmenes empleados para el aforo dependían de la alícuota empleada al momento de preparar los sistemas.

A partir de las diluciones de los péptidos cariofílicos se prepararon soluciones de las concentraciones deseadas para el ensayo de retardamiento, las indicaciones para su preparación están preparados en la tabla 22.

Tabla 22. Datos para la preparación de las soluciones utilizadas en los ensayos de retardamiento.

Concentración	Péptido 1		Péptido 2		
	Volumen de la dilución	Volumen de aforo	Concentración	Volumen de la dilución	Volumen de aforo
0.05	0.60	25 μ L	0.2	1.30	25 μ L
0.1	1.20	25 μ L	0.3	2.00	25 μ L
0.15	1.80	25 μ L	0.4	2.65	25 μ L
0.2	2.40	25 μ L	0.5	3.30	25 μ L
0.25	3.00	25 μ L	0.6	3.95	25 μ L
0.3	3.60	25 μ L	0.7	4.60	25 μ L

Ensayos de retención.

Para trabajar los ensayos de retención se partió de las diluciones preparadas conforme lo indicado en la tabla 21. Las concentraciones de los péptidos cariofílicos utilizados se prepararon de la siguiente manera (tabla 23).

Tabla 23. Volúmenes que fueron tomados para la preparación de soluciones de los péptidos cariofílicos para los ensayos de retención.

Péptido 1 (0.1 μM)		Péptido 2 (0.4 μM)	
Volumen de la dilución	Volumen de aforo	Volumen de la dilución	Volumen de aforo
6.70 μL	140 μL	14.80 μL	140 μL

Tras un primer ensayo de retención, se decidió cambiar la concentración de los péptidos siendo la concentración de péptido 1 de 0.15 μM y de péptido 2 de 0.5 μM , por lo que las cantidades a tomar se vieron cambiadas como se muestra en la tabla 24.

Tabla 24. Volúmenes que fueron tomados para la preparación de soluciones de los péptidos cariofílicos para los ensayos de retención.

Péptido 1 (0.15 μM)		Péptido 2 (0.5 μM)	
Volumen de la dilución	Volumen de aforo	Volumen de la dilución	Volumen de aforo
4.30 μL	60 μL	7.90 μL	60 μL

Para la preparación de las concentraciones de quitosán a ser probadas se midieron los volúmenes indicados en la tabla 25 y se llevaron al volumen de aforo con ácido acético al 1%.

Tabla 25. Preparación de las soluciones de quitosán para los ensayos de retención.

Concentración	Volumen de stock	Volumen de aforo
0.04 %	0.8	20 μL
0.06 %	1.2	20 μL
0.08 %	1.6	20 μL
0.10 %	2	20 μL
0.12 %	2.4	20 μL
0.14 %	2.8	20 μL
0.16 %	3.2	20 μL

Anexo 3. Volúmenes de nanopartículas empleados en la determinación de características físicas y biológicas.

Dispersión dinámica de la luz (ZetaSizer):

Primero fueron 500 μL de nanopartículas.

Para las siguientes mediciones se usaron 250 μL de nanopartículas.

Forma física:

200 μL de nanopartículas.

Ensayos de internalización:

Para la internalización de los sistemas sin péptido NLS se emplearon 200 μL por pocillo, mientras que con los sistemas con péptido cariofílico se usaron 300 μL por pozo.

Viabilidad celular:

Se emplearon 40 μL de nanopartículas sin péptido cariofílico, mientras que se colocaron por pozo 60 μL de los complejos ensamblados con péptido NLS.

RT-PCR:

En los sistemas "control" (sin péptido) se colocaron 570 μL de complejos, mientras que para el caso del péptido 2 se adicionaron 855 μL .

Anexo 4. Gel de referencia ensayos de retardamiento

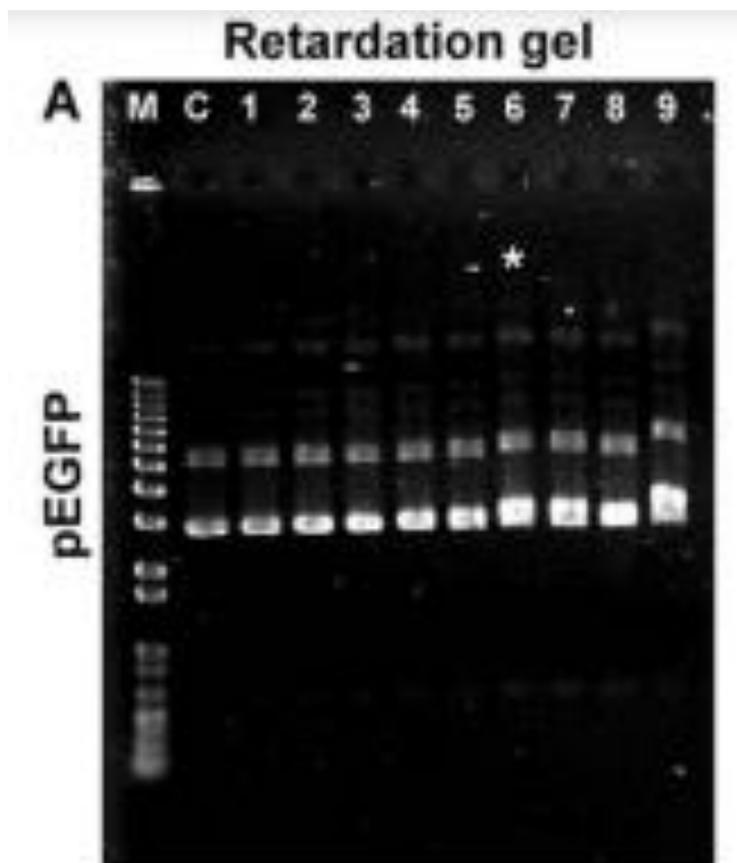


Figura 42. Gel de retardamiento para el plásmido de pEGFP evaluando diferentes concentraciones de péptido cariofílico.

Imagen recuperada de: Hernández-Baltazar & colaboradores, 2012. Gel de agarosa 0.8% en TAE1X corrido a 80 V por 45 minutos y teñidos con bromuro de etidio. La concentración seleccionada se indica con un asterisco (*), plásmido solo (C) y el marcador de peso molecular (M).

Anexo 5. Cálculo de eficiencia de acoplamiento de GRP

SPDP inicial en el sistema

$$\frac{(\text{Concentración SPDP})(\text{Vol SPDP})}{\text{Vol total}} = \frac{(0.01 \text{ M SPDP})(10 \mu\text{L})}{1469.4 \mu\text{L}} = 6.8054988 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Piridin-2-tiona en la muestra

$$\frac{\text{Lectura abs } 343\text{nm}}{\varepsilon} = \frac{0.0659}{8.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \times 5 = 8.1559 \times 10^{-6} \times 5 = 4.0780 \times 10^{-5} \text{ M}$$

% Eficiencia de acoplamiento

$$\frac{6.8054988 \times 10^{-5}}{4.0780 \times 10^{-5}} \times 100\% = \frac{4.0780 \times 10^{-5} \times 100\%}{6.8054988 \times 10^{-5}} = 59.92\%$$

Anexo 6. Primer's para RT-PCR

Par de primer's a utilizar para realizar la RT-PCR			
Primer	Secuencia	Inicio	Tamaño del amplicón
Primer forward	AACATCTACACCACCCAGCA	296	328 pb
Primer Reverse	GTGCTCCCAGAACAATGTTG	623	

Características de los primer's.					
Primer	Tm	% GC	Hairpin	Homodímero	Heterodímero
Primer Forward	58.94 °C	50	Δ G= 1.83	Δ G= -3.14	Δ G= -6.71
Primer Reverse	57.29 °C	50	Δ G= -0.09	Δ G= -5.24	

Anexo 7. Tablas generadas del análisis estadístico DLS y potencial zeta

Tabla 26. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para el tamaño de partícula.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
Tamaño	Control	Péptido 1	Control	Péptido 2	Control	GRP
Media	353.425	375.7	353.425	321.125	353.425	446.733
Varianza	3790.45 583	364.69	3790.45 583	6690.72 917	3790.45 583	19386.1 233
Observaciones	4	3	4	4	4	3

Diferencia hipotética de las medias	0	0	0
Grados de libertad	4	6	3
Estadístico t	-0.68122856	0.63099704	-1.08398042
P(T<=t) una cola	0.26656164	0.27565309	0.17885656
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	1.94318028	2.35336343
P(T<=t) dos colas	0.53312328	0.55130618	0.35771312
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	2.44691185	3.18244631

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
Tamaño	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 1	GRP	Péptido 2	GRP
Media	375.7	321.125	375.7	446.733	321.125	446.733
Varianza	364.69	6690.72 917	364.69	19386.1 233	6690.72 917	19386.1 233
Observaciones	3	4	3	3	4	3
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	3		2		3	
Estadístico t	1.28840617		-0.87544795		-1.39266627	
P(T<=t) una cola	0.14398858		0.23682652		0.12899386	
Valor crítico de t (una cola)	2.35336343		2.91998558		2.35336343	
P(T<=t) dos colas	0.28797717		0.47365303		0.25798772	
Valor crítico de t (dos colas)	3.18244631		4.30265273		3.18244631	

Tabla 27. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para potencial zeta.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
Potencial zeta	Control	Péptido 1	Control	Péptido 2	Control	GRP

Media	13.8125	15.8366	13.8125	16.35	13.8125	25.9533
Varianza	13.6682 917	7.32973 333	13.6682 917	6.60753 333	13.6682 9167	2.20663 3333
Observaciones	4	3	4	4	4	3
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	5		5		4	
Estadístico t	-0.8361529		-1.12705933		-5.957822217	
P(T<=t) una cola	0.22059228		0.15544065		0.001992086	
Valor crítico de t (una cola)	2.01504837		2.01504837		2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.44118456		0.3108813		0.003984172	
Valor crítico de t (dos colas)	2.57058184		2.57058184		2.776445105	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
Potencial zeta	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 1	GRP	Péptido 2	GRP
Media	15.8366	16.35	15.8366	25.9533	16.35	25.9533
Varianza	7.32973 333	6.60753 333	7.32973 333	2.20663 333	6.60753 3333	2.20663 3333
Observaciones	3	4	3	3	4	3
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		3		5	
Estadístico t	-0.25366803		-5.67422558		-6.215225385	
P(T<=t) una cola	0.40612854		0.00542218		0.000787941	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679		2.35336343		2.015048373	
P(T<=t) dos colas	0.81225708		0.01084436		0.001575882	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511		3.18244631		2.570581836	

Tabla 28. Tablas de *t* de student para muestras con varianzas desiguales para el índice de polidispersión.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
IPD	Control	Péptido 1	Control	Péptido 2	Control	GRP
Media	0.32242	0.43746	0.32242	0.44657	0.32242	0.55536
Varianza	0.04533 4576	0.27789 3423	0.04533 4576	0.15759 519	0.04533 458	0.00412 594
Observaciones	4	3	4	4	4	3
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	2		5		4	
Estadístico t	-0.356789475		-0.55119319		-2.0662944	
P(T<=t) una cola	0.377688357		0.302612761		0.05384067	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558		2.015048373		2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.755376715		0.605225522		0.10768134	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273		2.570581836		2.77644511	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
IPD	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 1	GRP	Péptido 2	GRP
Media	0.43746	0.44657	0.43746	0.55536	0.44657	0.55536
Varianza	0.27789 3423	0.15759 5189	0.27789 3423	0.00412 594	0.15759 519	0.00412 594
Observaciones	3	4	3	3	4	3
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		2		3	
Estadístico t	-0.02506702		-0.384534195		-0.53876996	
P(T<=t) una cola	0.490601098		0.368809821		0.31372875	

Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	2.91998558	2.35336343
P(T<=t) dos colas	0.981202196	0.737619643	0.6274575
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	4.30265273	3.18244631

Anexo 8. Tablas generadas del análisis estadístico de los ensayos de reducción de MTT

Primer ensayo de reducción de MTT.

Tabla 29. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas con/sin GCV.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	NoP HeLa	NoP SiT HeLa	NoP SiHa	NoP SiT SiHa	P2 HeLa	P2 SiT HeLa
Media	86.6402	64.5502	74.9338	83.3333	58.2671	30.0264
Varianza	178.938	31.9796	97.8809	1.41723	128.233	52.4507
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	3		2		3	
Estadístico t	2.63449874		-1.459963015		3.63895492	
P(T<=t) una cola	0.0390116		0.140864448		0.01788398	
Valor crítico de t (una cola)	2.35336343		2.91998558		2.35336343	
P(T<=t) dos colas	0.07802321		0.281728895		0.03576796	
Valor crítico de t (dos colas)	3.18244631		4.30265273		3.18244631	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	P2 SiHa	P2 SiT SiHa	GRP HeLa	GRP SiT HeLa	GRP SiHa	GRP SiT SiHa
Media	90.0132	73.8756	100.264	55.1587	62.4338	65.2116
Varianza	51.5846	2.21770	206.929	161.249	6.86308	28.9876
Observaciones	3	3	3	3	3	3

Diferencia hipotética de las medias	0	0	0
Grados de libertad	2	4	3
Estadístico t	3.81063979	4.07158737	-0.80354267
P(T<=t) una cola	0.03124053	0.00760155	0.24021637
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	2.13184679	2.35336343
P(T<=t) dos colas	0.06248105	0.0152031	0.48043274
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	2.77644511	3.18244631

Tabla 30. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas sin GCV.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	NoP HeLa	P2 HeLa	NoP HeLa	GRP HeLa	P2 HeLa	GRP HeLa
Media	86.6402	58.2671	86.6402	100.264	58.2671	100.264
Varianza	178.938	128.233	178.938	206.929	128.233	206.929
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		4		4	
Estadístico t	2.80398146		-1.20131425		-3.97333128	
P(T<=t) una cola	0.02430696		0.14794738		0.00824635	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679		2.13184679		2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.04861392		0.29589475		0.01649271	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511		2.77644511		2.77644511	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	NoP SiHa	P2 SiHa	NoP SiHa	GRP SiHa	P2 SiHa	GRP SiHa
Media	74.9338	90.0132	74.9338	62.4338	90.0132	62.4338
Varianza	97.8809	51.5846	97.8809	6.86308	51.5846	6.86308
Observaciones	3	3	3	3	3	3

Diferencia hipotética de las medias	0	0	0
Grados de libertad	4	2	3
Estadístico t	-2.13635285	2.11546548	6.2482867
P(T<=t) una cola	0.04974736	0.08432917	0.00413517
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	2.91998558	2.35336343
P(T<=t) dos colas	0.09949471	0.16865834	0.00827035
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	4.30265273	3.18244631

Tabla 31. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas con GCV.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	NoP SiT HeLa	P2 SiT HeLa	NoP SiT HeLa	GRP SiT HeLa	P2 SiT HeLa	GRP SiT HeLa
Media	64.5502	30.0264	64.5502	55.1587	30.0264	55.1587
Varianza	31.9796	52.4507	31.9796	161.249	52.4507	161.249
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		3		3	
Estadístico t	6.50773672		1.17020161		-2.97776016	
P(T<=t) una cola	0.00143864		0.16321244		0.02935107	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679		2.35336343		2.35336343	
P(T<=t) dos colas	0.00287728		0.32642488		0.05870214	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511		3.18244631		3.18244631	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	NoP SiT SiHa	P2 SiT SiHa	NoP SiT SiHa	GRP SiT SiHa	P2 SiT SiHa	GRP SiT SiHa
Media	83.3333	73.8756	83.3333	65.2116	73.8756	65.2116
Varianza	1.41723	2.21770	1.41723	28.9876	2.21770	28.9876

Observaciones	3	3	3	3	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		2		2	
Estadístico t	8.59203728		5.69229692		2.68636716	
P(T<=t) una cola	0.00050408		0.01475154		0.05756371	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679		2.91998558		2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.00100816		0.02950309		0.11512741	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511		4.30265273		4.30265273	

Segundo ensayo de reducción de MTT.

Tabla 32. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas con/sin GCV.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	NoP HeLa	NoP SiT HeLa	P2 HeLa	P2 SiT HeLa	GRP HeLa	GRP SiT HeLa
Media	86.0335	68.3012	90.4052	63.0945	92.6401	70.3888
Varianza	76.6853	10.3628	148.576	49.9246	192.347	30.4189
Observaciones	5	5	5	5	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	5		6		5	
Estadístico t	4.24981695		4.33446745		3.33362079	
P(T<=t) una cola	0.00404661		0.00245238		0.01034832	
Valor crítico de t (una cola)	2.01504837		1.94318028		2.01504837	
P(T<=t) dos colas	0.00809322		0.00490476		0.02069665	
Valor crítico de t (dos colas)	2.57058184		2.44691185		2.57058184	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	NoP SiHa	NoP SiT SiHa	P2 SiHa	P2 SiT SiHa	GRP SiHa	GRP SiT SiHa
Media	87.9310	79.9507	92.1182	75.9605	81.7733	57.1428
Varianza	153.152	42.6059	43.5584	12.4548	73.8612	39.1298
Observaciones	5	5	5	5	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	6		6		7	
Estadístico t	1.27539288		4.82744599		5.1812776	
P(T<=t) una cola	0.1246618		0.00145892		0.00063954	
Valor crítico de t (una cola)	1.94318028		1.94318028		1.89457861	
P(T<=t) dos colas	0.2493236		0.00291784		0.00127909	
Valor crítico de t (dos colas)	2.44691185		2.44691185		2.36462425	

Tabla 33. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas sin GCV.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	NoP HeLa	P2 HeLa	NoP HeLa	GRP HeLa	P2 HeLa	GRP HeLa
Media	86.0335	90.4052	86.0335	92.6401	90.4052	92.6401
Varianza	76.6853	148.576	76.6853	192.347	148.576	192.347
Observaciones	5	5	5	5	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	7		7		8	
Estadístico t	-0.65131154		-0.90066347		-0.27066077	
P(T<=t) una cola	0.26781702		0.19884697		0.39675197	
Valor crítico de t (una cola)	1.89457861		1.89457861		1.85954804	
P(T<=t) dos colas	0.53563403		0.39769394		0.79350393	
Valor crítico de t (dos colas)	2.36462425		2.36462425		2.30600414	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	NoP SiHa	P2 SiHa	NoP SiHa	GRP SiHa	P2 SiHa	GRP SiHa
Media	87.9310	92.1182	87.9310	81.7733	92.1182	81.7733
Varianza	153.152	43.5584	153.152	73.8612	43.5584	73.8612
Observaciones	5	5	5	5	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	6		7		8	
Estadístico t	-0.66756557		0.91384622		2.1347042	
P(T<=t) una cola	0.26461794		0.19559362		0.03265641	
Valor crítico de t (una cola)	1.94318028		1.89457861		1.85954804	
P(T<=t) dos colas	0.52923588		0.39118723		0.06531282	
Valor crítico de t (dos colas)	2.44691185		2.36462425		2.30600414	

Tabla 34. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas con GCV.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	NoP SiT HeLa	P2 SiT HeLa	NoP SiT HeLa	GRP SiT HeLa	P2 SiT HeLa	GRP SiT HeLa
Media	68.3012	63.0945	68.3012	70.3888	63.0945	70.3888
Varianza	10.3628	49.9246	10.3628	30.4189	49.9246	30.4189
Observaciones	5	5	5	5	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	6		6		8	
Estadístico t	1.49946004		-0.73096816		-1.81967327	
P(T<=t) una cola	0.09220819		0.24617243		0.05315262	
Valor crítico de t (una cola)	1.94318028		1.94318028		1.85954804	
P(T<=t) dos colas	0.18441637		0.49234486		0.10630525	
Valor crítico de t (dos colas)	2.44691185		2.44691185		2.30600414	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	NoP SiT SiHa	P2 SiT SiHa	NoP SiT SiHa	GRP SiT SiHa	P2 SiT SiHa	GRP SiT SiHa
Media	79.9507	75.9605	79.9507	57.1428	75.9605	57.1428
Varianza	42.6059	12.4548	42.6059	39.1298	12.4548	39.1298
Observaciones	5	5	5	5	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	6		8		6	
Estadístico t	1.20241054		5.64110046		5.85857874	
P(T<=t) una cola	0.13724963		0.00024321		0.00054636	
Valor crítico de t (una cola)	1.94318028		1.85954804		1.94318028	
P(T<=t) dos colas	0.27449926		0.00048642		0.00109272	
Valor crítico de t (dos colas)	2.44691185		2.30600414		2.44691185	

Tabla 35. Tablas de t de student para muestras con varianzas desiguales para los sistemas con GCV contra el control de GCV.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	Control GCV HeLa	NoP SiT HeLa	Control GCV HeLa	P2 SiT HeLa	Control GCV HeLa	GRP SiT HeLa
Media	78.2480	68.3012	78.2480	63.0945	78.2480	70.3888
Varianza	1.74473	10.3628	1.74473	49.9246	1.74473	30.4189
Observaciones	5	5	5	5	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	5		4		4	
Estadístico t	6.39203717		4.71390831		3.0987014	
P(T<=t) una cola	0.00069413		0.0046065		0.01813338	
Valor crítico de t (una cola)	2.01504837		2.13184679		2.13184679	

P(T<=t) dos colas	0.00138826	0.009213	0.03626675
Valor crítico de t (dos colas)	2.57058184	2.77644511	2.77644511

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales						
	Control GCV SiHa	NoP SiT SiHa	Control GCV SiHa	P2 SiT SiHa	Control GCV SiHa	GRP SiT SiHa
Media	80.7881	79.9507	80.7881	75.9605	80.7881	57.1428
Varianza	18.5335	42.6059	18.5335	12.4548	18.5335	39.1298
Observaciones	5	5	5	5	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	7		8		7	
Estadístico t	0.23948413		1.93916886		6.96273994	
P(T<=t) una cola	0.40879564		0.04422988		0.00010935	
Valor crítico de t (una cola)	1.89457861		1.85954804		1.89457861	
P(T<=t) dos colas	0.81759127		0.08845975		0.00021869	
Valor crítico de t (dos colas)	2.36462425		2.30600414		2.36462425	