

SEP

SES

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



**Instituto Tecnológico de Tijuana
Centro de Graduados e Investigación en Química**

TRABAJO DE TESIS

**“NANOTRANSPORTADORES POLIMÉRICOS FLUORESCENTES PARA
LIBERACIÓN INTRACELULAR DE GENES E IMAGENOLOGÍA”**

Presentado por

I.Q. Iris Anayeli López Amparo

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN QUÍMICA

Director de tesis

Dr. Manuel Alatorre Meda

Co-directora de tesis

Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

Tijuana, B.C.

AGOSTO DE 2024



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 22/agosto/2024

Oficio No. 345/CC/2024

Asunto: Se autoriza impresión de trabajo de tesis

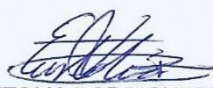
GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

Los que suscriben tienen a bien informar que el manuscrito de tesis titulado **"NANOTRANSPORTADORES POLIMÉRICOS FLUORESCENTES PARA LIBERACIÓN INTRACELULAR DE GENES E IMAGENOLOGÍA"**, presentado por la **C. Iris Anayeli López Amparo**, (con número de control M22210055), cumple con los requisitos de calidad y formato para tesis de Maestría en Ciencias en Química. Por consiguiente, se aprueba y autoriza al interesado para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE


DR. MANUEL ALATORRE MEDA
Presidente


DRA. GEORGINA ESTHER PINA LUIS
Secretario del Jurado


Dra. EUSTOLIA RODRIGUEZ VELAZQUEZ
Vocal del Jurado

C.p. Oficina de Titulación
C.p. Expediente



Calzada del Tecnológico 12950 esquina Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin,
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
dir_tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | tijuana.tecnm.mx





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tijuana, B.C. al 26 de agosto del 2024, IRIS ANAYELI LÓPEZ AMPARO, alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Química con número de control M22210055, manifiesta que es autor del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. MANUEL ALATORRE MEDA y la Dra. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ, y cede los derechos del trabajo titulado **"NANOTRANSPORTADORES POLIMÉRICOS FLUORESCENTES PARA LIBERACIÓN INTRACELULAR DE GENES E IMAGENOLÓGÍA"** al Tecnológico Nacional de México/IT Tijuana para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, figuras, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico: manuel.alatorre@tectijuana.edu.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

IRIS ANAYELI LÓPEZ AMPARO



Calzada del Tecnológico 12950 esquina Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin,
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
dir_tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | tijuana.tecnm.mx



DEDICATORIA

Este trabajo de tesis está dedicado a mis padres, Daniel López y Felipa Amparo, quienes han sido una fuente constante de apoyo y aliento durante los desafíos de la escuela y de la vida, y cuyos buenos ejemplos me han enseñado a trabajar duro para lograr las cosas que aspiro a lograr. Los amo a ambos y aprecio todo lo que han hecho por mí.

CONTENIDO

CARTA DE APROBACIÓN	iii
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS	iv
DEDICATORIA.....	v
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS.....	xiv
LISTA DE ANEXOS	xv
AGRADECIMIENTOS	xvii
RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	xviii
RESUMEN	xix
HOJA DE PUBLICACIONES PRODUCTO DE LA TESIS.....	xxi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	5
2.1. Justificación	5
2.2. Objetivo general.....	5
2.3. Objetivos específicos	5
III. TEORÍA GENERAL.....	7
3.1. Terapia génica	7
3.2. Métodos de liberación de genes	8
3.2.1. Vectores virales	8

3.2.2. Vectores no virales o sintéticos.....	8
IV. EXPERIMENTAL	11
4.1. Metodología	11
4.1.1. Síntesis de nanotransportadores fluorescentes a base de quitosano y PEI ramificado.....	11
4.1.2. Formación de policomplejos nanotransportador/ADN.....	14
4.1.3. Síntesis de nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP (CH-TPP)	15
4.2. Caracterización de los policomplejos	16
4.2.1. Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z.....	16
4.2.2. AFM	17
4.2.3. UV-Vis y fluorescencia molecular.....	17
4.2.4. Evaluación de la eficiencia de complejación de ADN por electroforesis en gel	18
4.2.5. Evaluación de la citocompatibilidad de los nanotransportadores	18
4.2.6. Evaluación de la internalización celular por contratinción y microscopia de fluorescencia confocal.....	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1. Síntesis del derivado CH-RhoB	24
5.2. Dispersión de luz dinámica y potencial Z de los complejos nanotransportador/ADN.....	28
5.3. Evaluación de la eficiencia de complejación por electroforesis en gel	34
5.4. Microscopía de fuerza atómica	36
5.5. Síntesis y caracterización de los derivados PEI-RhoB y PEI-CDs.....	40
5.6. Evaluación de la citocompatibilidad de los nanotransportadores.....	44

5.7. Evaluación de citocompatibilidad e internalización celular por microscopia óptica y de fluorescencia confocal	55
VI. CONCLUSIONES	62
VII. REFERENCIAS	63
VIII. ANEXOS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de fuerza atómica
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CDs	Puntos de carbono
CH	Quitosano prístino
CH/ADN	Policomplejos quitosano/ADN
CH/ADN-TPP	Policomplejos quitosano/ADN reticulados con TPP
CH-RhoB	Quitosano etiquetado con rodamina B
CH-RhoB/ADN	Policomplejos CH-RhoB/ADN
CV	Cristal violeta
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI	Diclorhidrato de 4',6'-diamidino-2-fenilindol
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EDC	Clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Suero fetal bovino
MWCO	Límite de peso molecular
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
NaOH	Hidróxido de sodio
NEAA	Aminoácidos no esenciales

NHS	N-hidroxisuccinimida
N/P	Relación de carga nitrógeno/fosfato
NPs CH-TPP	Nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP
NPs CH-TPP/ADN	Complejos de nanopartículas CH-TPP/ADN
NR	Rojo neutro
NRU	Ensayo de absorción de rojo neutro
PBS	Tampón salino fosfato
PEI	Polietilenimina
PEI-CDs/ADN	Policomplejo PEI-CDs/ADN
PEI-RhoB/AND	Policomplejo PEI-RhoB/ADN
PVA	Acetato de polivinilo
RhoB	Rodamina B
TPP	Tripolifosfato de sodio
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Formación de policomplejos.	9
Figura 2.	Ruta sintética del quitosano funcionalizado con rodamina B.	11
Figura 3.	Esquema de reacción de reticulación de NHS más EDC (carbodiimida)	12
Figura 4.	Ruta sintética del PEI funcionalizado con rodamina B.	13
Figura 5.	Esquema sintético de PEI-CDs.	14
Figura 6.	Espectro UV-Vis de RhoB a distintas concentraciones.	24
Figura 7.	Curva de calibración de RhoB	25
Figura 8.	Espectro absorción UV-Vis de CH, CH-RhoB y RhoB.	26
Figura 9.	Espectro FTIR de CH, CH-RhoB y RhoB.	27
Figura 10.	Espectro de emisión y excitación de CH-RhoB. $\lambda_{exc}=554$ nm, $\lambda_{em}=572$ nm	28
Figura 11.	Gráfico del POT Z de los policomplejos CH/ADN, CH-RhoB/ADN, CH- TPP/ADN y CH/ADN-TPP a diferentes relaciones N/P.	30
Figura 12.	Gráfico del diámetro hidrodinámico de los complejos CH/ADN, CH- RhoB, NPs CH-TPP/ADN y CH/ADN-TPP a diferentes relaciones N/P.	31
Figura 13.	Correlograma representativo de una muestra con una población de tamaño. (CH/ADN, N/P 5)	32
Figura 14.	Correlograma representativo de una muestra con tres poblaciones de tamaño. (CH/ADN, N/P 1.5)	33
Figura 15.	Electroforesis en gel de agarosa de los policomplejos CH/ADN, CH- RhoB/ADN, CH-TPP/ADN y CH/ADN-TPP (N/P 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 y 10) y ADN libre. Tinción con bromuro de etidio.	35

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los policomplejos CH-RhoB/ADN (N/P 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 y 10). a) Visualización de ADN intercalado con bromuro de etidio y b) visualización de CH-RhoB (sin tinción con EtBr)	36
Figura 17. Micrografía obtenida por AFM de ADN en solución (2x2 μm).....	37
Figura 18. Micrografía obtenida por AFM de los policomplejos CH/ADN (N/P 10) y su perfil de topografía (5x5 μm).....	37
Figura 19. Micrografía obtenida por AFM de los policomplejos CH-RhoB/ADN (N/P 10) y su perfil de topografía (5x5 μm).....	38
Figura 20. Micrografía obtenida por AFM de los policomplejos CH/ADN-TPP (N/P 10) y su perfil de topografía (5x5 μm).....	38
Figura 21. Micrografía obtenida por AFM de los policomplejos CH-TPP/ADN (N/P 10) y su perfil de topografía (5x5 μm).....	39
Figura 22. Imágenes AFM 3D de los policomplejos CH/ADN, CH-RhoB/ADN, CH/ADN-TPP y CH-TPP/ADN (5x5 μm).....	39
Figura 23. Espectro absorción UV-Vis de PEI, PEI-RhoB y RhoB.....	40
Figura 24. Espectro de emisión y excitación de PEI-RhoB. (λ_{exc} = 526 nm, λ_{em} = 555 nm)	41
Figura 25. Espectro absorción UV-Vis de PEI y PEI-CDs.....	42
Figura 26. Espectro de excitación y emisión de PEI-CDs a diferentes longitudes de onda (λ_{exc} = 250, 330, 400 nm).....	43
Figura 27. Evaluación de citotoxicidad de los policomplejos por absorción de rojo neutro (NRU) en línea celular HeLa. Los policomplejos fueron preparados a una relación N/P = 10. Análisis estadístico ANOVA. Se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni y Tukey y las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0.05$	44
Figura 28. Imagen de la placa de 96 pocillos con tinción de rojo neutro a las 24 h.	44

Figura 29. Evaluación de citotoxicidad de los policomplejos por tinción con cristal violeta en células HeLa. Los policomplejos fueron preparados a una relación N/P = 10. Análisis estadístico ANOVA. Se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni y Tukey y las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0.05$	45
Figura 30. Imagen de la placa de 96 pocillos con tinción con cristal violeta a las 24 h.	45
Figura 31. Evaluación de citotoxicidad de los policomplejos con CCK-8 en células HeLa. Los policomplejos fueron preparados a una relación N/P = 10. Análisis estadístico ANOVA. Se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni y Tukey y las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0.05$	53
Figura 32. Imagen de la placa de 96 pocillos con tinción por CCK-8 a las 24 h. ..	54
Figura 33. Micrografías de fluorescencia confocal de la internalización celular de CH-RhoB (polímero) 8 h después de la transfección en células HeLa. CH-RhoB se observa en el canal rojo, el núcleo celular en azul (DAPI).	58
Figura 34. Micrografías de fluorescencia confocal de la internalización celular de CH-RhoB/ADN (policomplejo) 8 h después de la transfección en células HeLa. CH-RhoB se observa en el canal rojo, el núcleo celular en azul (DAPI) y luz transmitida en verde	59
Figura 35. Micrografías de fluorescencia confocal de la internalización celular de PEI-RhoB (polímero) 8 h después de la transfección en células HeLa. PEI-RhoB se observa en el canal rojo, el núcleo celular en azul (DAPI) y luz transmitida en verde.	60
Figura 36. Micrografías de fluorescencia confocal de la internalización celular de PEI-RhoB/ADN (policomplejo) 8 h después de la transfección en células HeLa. PEI-RhoB se observa en el canal rojo, el núcleo celular en azul (DAPI) y luz transmitida en verde	61

LISTA DE TABLAS

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustado a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1). El recuadro muestra la función de distribución. Muestra CH/ADN a N/P 0.5..... 67
- Anexo 2.** Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustado a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1). El recuadro muestra la función de distribución. Muestra CH/ADN a N/P 1..... 68
- Anexo 3.** Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustado a una función exponencial con tres decaimientos (ExpDec3). El recuadro muestra la función de distribución. Muestra CH/ADN a N/P 1.5..... 69
- Anexo 4.** Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustados a una función exponencial con dos decaimientos (ExpDec2). El recuadro muestra la función de distribución. Muestra CH/ADN a N/P 2..... 70
- Anexo 5.** Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustado a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1). El recuadro muestra la función de distribución. Muestra CH/ADN a N/P 3..... 71
- Anexo 6.** Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustado a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1). El recuadro muestra la función de distribución. Muestra CH/ADN a N/P 5..... 72
- Anexo 7.** Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustados a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1). El recuadro muestra la función de distribución. Muestra CH/ADN a N/P 10..... 73
- Anexo 8.** Análisis estadístico de los policomplejos CH/ADN a diferentes relaciones N/P. Datos obtenidos de Malvern Zetasizer Software*. Correlogramas normalizados entre 0 y 1**. Correlogramas normalizados entre 0 y 1 y ajustados a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1)***, dos decaimientos (ExpDec2)**** y

tres decaimientos (ExpDec3)****. Analizados en ALV-Non Linear Data Analysis Software Package.	74
--	----

AGRADECIMIENTOS

Sin el apoyo de muchas personas, este trabajo nunca se hubiera podido completar. Deseo expresar mi sincero agradecimiento a los miembros de mi comité: Dr. Manuel Alatorre Meda, que me abrió las puertas de su laboratorio y me brindó apoyo y orientación a lo largo del camino. Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez, que siempre tuvo la paciencia y disposición para transmitir su conocimiento, su guía y asistencia en el cultivo de células fue inconmensurable. Dra. Georgina Pina Luis, que estuvo desde el comienzo de la escuela de posgrado, con sus clases y excelentes sugerencias, me ayudó a lograr la finalización de esta carrera.

Mi agradecimiento a cada uno de los doctores: Dr. Julio César Calva Yáñez, Dr. Ignacio Rivero Espejel, Dra. Norma Aide Cortez Lemus, Dr. Jose Manuel Cornejo Bravo y Dr. Valentin Miranda Soto, por su guía y apoyo en el manejo de equipos y en la caracterización de muestras. Sin su generosidad este trabajo no se hubiera completado.

A mi hermana, que ha sido una gran amiga y un gran apoyo a lo largo del camino y estuvo allí para ayudarme a encontrar una manera de relajarme cuando lo necesitaba. Mi agradecimiento a todos mis compañeros de posgrado que estuvieron allí para mí cuando necesitaba a alguien con quien hablar o necesitaba un abrazo. Y, por último, pero no menos importante, Carlos, gracias por tu ayuda, apoyo y amor. Soy la persona más afortunada del mundo por tenerlos en mi vida.

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El trabajo experimental de la presente tesis fue llevado a cabo en el laboratorio de Cultivo Celular y Microscopia Confocal del Instituto Tecnológico de Tijuana.

La alumna Iris Anayeli López Amparo recibió una beca a través del programa de becas de para maestría por CONAHCyT, a la cual se le registró con el CVU: 1229805.

Los fondos económicos necesarios para financiar esta investigación fueron otorgados por CONAHCyT y la Secretaría de Educación Pública.

RESUMEN

“Nanotransportadores poliméricos fluorescentes para liberación intracelular de genes e imagenología”

por

Iris Anayeli López Amparo

Maestra en Ciencias en Química

Instituto Tecnológico de Tijuana, 2024

Dr. Manuel Alatorre Meda

Director de tesis

Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

Co-directora de tesis

El objetivo general de este proyecto fue el de producir nanotransportadores poliméricos fluorescentes para terapia génica e imagenología que permitieran monitorizar por imagen en destino final del nanotransportador y determinar si tienen un efecto en la expresión biológica del gen liberado y las posibles respuestas citotóxicas de los sistemas,

Se sintetizaron nanotransportadores fluorescentes a partir de la modificación de quitosano y PEI ramificado y se realizaron ensayos *in vitro* de complejación de ADN, a diferentes relaciones de carga nitrógeno/fosfato (N/P) para evaluar las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y morfología de los policomplejos resultantes, así como ensayos de citocompatibilidad e internalización celular.

Se estudiaron siete sistemas: CH/ADN, CH-RhoB/ADN, CH-TPP/ADN, CH/ADN-TPP, PEI/ADN, PEI-RhoB/ADN y PEI-CDs/ADN. Los estudios de UV-Vis demostraron una modificación exitosa de CH y PEI con RhoB, con una eficiencia de reacción del 16.1 y 12%, respectivamente. Además, se demostró, a partir de estudios de DLS, que todos los sistemas presentan más de una población de tamaños a relaciones N/P de 1.5 a 2. Se determinó que a una $(N/P)_c = 1.5$ se empezaban a formar los complejos y a una $(N/P)^* = 3$ los complejos adoptaban tamaños estables. Los estudios de AFM mostraron que, a una relación N/P 10, se obtuvieron nanopartículas esféricas bien definidas con una distribución de tamaños regular.

En general, los ensayos ELISA y de microscopia óptica demostraron que los sistemas nanotransportador/gen son citocompatibles a 24 h independientemente del indicador estudiado, aunque presentan una disminución de moderada a significativa en esta propiedad a 48 h en términos de estabilidad de membrana. La modificación de los nanotransportadores con rodamina y puntos cuánticos de carbono mejoraron la citocompatibilidad de los sistemas en ambos puntos de tiempo (24 y 48 h), con independencia del indicador estudiado y los ensayos de contratinción y microscopia de fluorescencia confocal demostraron que los sistemas nanotransportador/gen se alojan en el citoplasma, preferentemente en la región perinuclear.

PUBLICACIONES PRODUCTO DE LA TESIS



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

EL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO A TRAVÉS DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA

OTORGA EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

**IRIS ANAYELI LÓPEZ AMPARO, EUSTOLIA
RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ, MANUEL ALATORRE
MEDA**

Por su valiosa participación con la Plática "**NANOTRANSPORTADORES POLIMÉRICOS
FLUORESCENTES PARA TERAPIA GÉNICA E IMAGENOLÓGÍA**" dentro de la XX Escuela de
Verano de Química, dirigida al Público en General, Estudiantes de Enseñanza Media y
Estudiantes de Licenciatura, realizada en las instalaciones del Centro de Graduados del
Instituto Tecnológico de Tijuana del 10 al 14 de junio de 2024.

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA, A 14 DE JUNIO DE 2024.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Por una Juventud Integrada al Desarrollo de México



EDUCACIÓN



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA

IGNACIO ALFREDO RIVERO ESPEJE

CENTRO DE GRADUADOS
E INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA

CENTRO DE GRADUADOS E INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA



I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Cada año millones de personas son diagnosticadas con cáncer en todo el mundo, y más de la mitad de los pacientes finalmente mueren a causa de él. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2020 se reportaron 20 millones de casos nuevos a nivel mundial y 10 millones de muertes.¹

El cáncer es una enfermedad genética y comienza cuando una sola célula sufre un cambio o una mutación en los genes, lo que provoca que la célula se divida y multiplique sin control. A estos genes mutados se les llama oncogenes y hacen que las células se multipliquen y sobrevivan en casos en los que no deberían en condiciones normales.²

Estos cambios genéticos pueden ser causados por errores durante la replicación del ADN o como resultado de daños en el ADN debido a exposiciones ambientales (rayos ultravioleta, sustancias químicas, humo del tabaco, etc.). En otros casos, las mutaciones en los genes se heredan, lo que aumenta el riesgo de que una persona desarrolle cáncer.²

Las modalidades de tratamiento actuales para el manejo de esta enfermedad incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, los efectos secundarios de estos tratamientos incluyen toxicidad aguda, resistencia a los medicamentos e infertilidad, entre muchos otros.¹

La terapia génica figura como una de las alternativas más promisorias para el tratamiento de esta enfermedad y para el mejoramiento de las condiciones de vida de los pacientes. Cuando se emplea este método, se libera material genético terapéutico en el núcleo celular, generalmente plásmidos; permitiendo así corregir, sustituir o bloquear genes defectuosos con el objetivo de tratar enfermedades a nivel genético.²

En cuanto a su vehiculización, la terapia génica se puede abordar de dos maneras: terapia génica *ex vivo*, que se refiere al proceso en el que las células del paciente se extraen y se alteran genéticamente fuera del cuerpo antes de volver a trasplantarlas y terapia génica *in vivo*, que se refiere a la administración directa de los genes sanos en las células o en el órgano afectado del paciente vía intravenosa.⁴

Un desafío importante que enfrenta la aplicación clínica *in vivo* de la terapia génica es el desarrollo de vehículos de administración de genes (también llamados vectores) que sean seguros y eficientes, debido a que los ácidos nucleicos libres presentan baja estabilidad química por su degradación enzimática y su eliminación por el sistema fagocítico, tienen poca o nula especificidad hacia las células objetivo y una carga electrostática negativa que los hace incapaces de ingresar de manera pasiva por la membrana celular.³ Por lo tanto, el desafío básico para la terapia génica (desde el punto de vista químico) es el desarrollo de vectores biocompatibles y con una alta eficiencia de transferencia de genes al núcleo celular (proceso denominado transfección).

Entre los diferentes tipos de transportadores no virales, los polímeros catiónicos basados en aminas se han investigado intensamente para la administración de genes debido a que son capaces de condensar moléculas de ácidos nucleicos a través de interacciones electrostáticas, formando partículas que protegen el material genético.⁵

El polímero más empleado como vector génico y considerado como "estándar de oro" es la polietilenimina (PEI), esto debido a su alta eficiencia de transfección y habilidad de escape de los endosomas; sin embargo, su citotoxicidad y su baja biodegradabilidad limitan su aplicación.⁵ Por otro lado, el quitosano es un polisacárido catiónico derivado de la quitina que se distingue por presentar una toxicidad baja, derivada de su naturaleza endógena, además de la ya citada capacidad de formar policomplejos con genes cargados negativamente debido a sus abundantes grupos amino. Entre las desventajas del quitosano se encuentran su baja solubilidad en agua y problemas de estabilidad en pH fisiológico.⁶

Como regla general, las nanopartículas de polímero cargadas positivamente tienen la capacidad de interactuar con ácidos nucleicos cargados negativamente por interacción electrostática y formar nanopartículas/complejos que protegen al ácido nucleico de la degradación enzimática y mejoran la captación celular por endocitosis. Después del proceso de endocitosis, estos vectores necesitan escapar de los endosomas y liberarse a través de procesos que sean detonados por condiciones intracelulares naturales, tal como el efecto reconocido como "esponja de protones" que se produce por un descenso en el pH en la transición de endosomas tempranos a endosomas tardíos. Durante el proceso de esponjas de protones se promueve el hinchamiento osmótico y la ruptura de los endosomas para finalmente suministrar los genes en el núcleo celular.⁴

Con el objetivo de mejorar la eficiencia de la terapia génica, es muy importante comprender los pasos clave en el proceso de transfección, así como el sitio de liberación del gen y destino final del nanotransportador, por lo que surge la necesidad de desarrollar vectores de genes eficientes y que permitan el rastreo del proceso de entrega de genes, además de su localización.

Una manera de rastrear el proceso de transfección génica es a través de imágenes por fluorescencia. La imagen por fluorescencia es una herramienta importante en la investigación biológica porque facilita el proceso de diagnóstico y ofrece un enfoque único para visualizar los detalles morfológicos de las células y los tejidos.⁷

En la última década, las proteínas fluorescentes, los puntos cuánticos y los fluoróforos orgánicos se han estudiado y utilizado ampliamente como agentes de contraste para la formación de imágenes.⁷ Entre los fluoróforos más representativos y ampliamente utilizados se distinguen la cumarina, el BODIPY y la rodamina. Se trata de moléculas pequeñas que absorben luz en el UV visible (UV-Vis) y emiten picos de fluorescencia relativamente agudos con altos rendimientos cuánticos y estabilidad en condiciones fisiológicas.⁸

Teniendo en cuenta los retos y oportunidades descritos anteriormente, se considera importante el desarrollo de un vector génico no viral con capacidad de liberación de genes y formación de imágenes para la terapia génica. En este proyecto se plantea estudiar la síntesis de nanotransportadores poliméricos fluorescentes para liberación intracelular de genes e imagenología, que permitan monitorizar por imagen el sitio de liberación del gen y destino final del nanotransportador.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Esta se suma a otras enfermedades asociadas a factores hereditarios y anomalías genéticas que presentan altos niveles de incidencia y frente a los cuales no se dispone de tratamientos efectivos. Por tanto, el desarrollo de un vector génico no viral con capacidad de liberación de genes y formación de imágenes para terapia génica puede ser de mucho interés para el tratamiento contra el cáncer y otras patologías a nivel genético.

2.2. Objetivo general

El objetivo general de este proyecto fue producir nanotransportadores poliméricos fluorescentes para liberación intracelular de genes e imagenología, que permitan monitorizar por imagen el sitio de liberación del gen y el destino final del nanotransportador para determinar si tienen un efecto en la expresión biológica del gen liberado y las posibles respuestas citotóxicas de los sistemas.

2.3. Objetivos específicos

1. Sintetizar nanotransportadores fluorescentes a partir de la modificación de quitosano y PEI ramificado y caracterizar los sistemas resultantes.
2. Realizar ensayos *in vitro* de complejación de ADN con los nanotransportadores producidos, a diferentes relaciones de carga nitrógeno/fosfato (N/P) y evaluar las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y morfología de los policomplejos resultantes por DLS, UV-vis, fluorescencia molecular y AFM.
3. Evaluar la eficiencia de complejación de ADN por electroforesis en gel y UV-vis.

4. Evaluar la citocompatibilidad de los policomplejos nanotransportador/gen empleando células HeLa (cáncer de cérvix), a través de ensayos ELISA y microscopia óptica.
5. Evaluar la internalización celular de los policomplejos en células HeLa por microscopia de fluorescencia confocal.
6. Evaluar la liberación intracelular de ADN por ensayos biológicos ELISA y microscopia de fluorescencia confocal, empleando plásmidos codificados.

III. TEORÍA GENERAL

3.1. Terapia génica

La terapia génica puede definirse como el tratamiento de enfermedades humanas mediante la transferencia de material genético a células específicas del paciente.¹⁵ Los avances en biología molecular y biotecnología, y la finalización del Proyecto Genoma Humano, han llevado a la identificación de numerosos genes que causan enfermedades por lo que se están desarrollando terapias genéticas para enfermedades cardiovasculares, neurológicas e infecciosas, cicatrización de heridas y cáncer mediante la administración de genes para aumentar la expresión de proteínas naturales, alterar la expresión de genes existentes o producir proteínas citotóxicas o enzimas activadoras de profármacos.¹⁶

La terapia génica requiere la identificación de un gen terapéutico y la transferencia de ese gen, a menudo específicamente a las células diana, con alta eficiencia. Aunque la expresión genética a corto plazo es suficiente para algunas aplicaciones, como las terapias contra el cáncer, la expresión a largo plazo es necesaria para el tratamiento de enfermedades crónicas, incluida la mayoría de las enfermedades genéticas. Para muchas aplicaciones será crucial regular estrictamente los niveles de expresión genética. Obviamente, se debe realizar cada una de estas tareas de una manera que sea segura para el paciente. Se deben considerar tanto la toxicidad/patogenicidad del vehículo de administración como las respuestas inmunes al tratamiento. Una limitación clave para el desarrollo de la terapia génica humana sigue siendo la falta de métodos seguros, eficientes y controlables para la administración de genes.¹⁷

3.2. Métodos de liberación de genes

Los vehículos de entrega de genes se pueden dividir en dos categorías: virus recombinantes y vectores sintéticos. Cada método de entrega tiene ventajas y desventajas específicas.

3.2.1. Vectores virales

La actividad principal de un virus es transportar eficientemente su genoma de una célula huésped a otra, ingresar a la nueva célula objetivo, navegar hasta el núcleo celular e iniciar la expresión de su genoma, aunque sea con el propósito de autorreplicarse. Virus tales como retrovirus, lentivirus (por ejemplo, VIH), adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple y virus de la viruela pueden transformarse en vehículos de administración de genes reemplazando parte del genoma de un virus con un gen terapéutico. Debido a que los virus evolucionaron esencialmente como vehículos sofisticados de administración de genes, estos vectores virales recombinantes suelen ser muy eficientes. Se han utilizado vectores virales en la mayoría de los estudios de administración de genes reportados en la literatura y en el 69% de los ensayos clínicos en curso.¹⁸

Las preocupaciones sobre la seguridad han sido el principal obstáculo para la aplicación clínica de la administración de genes virales. Aunque los vectores virales recombinantes se vuelven no replicativos y, por lo tanto, no patógenos, todavía existe la posibilidad de que el virus vuelva a ser un virión de tipo salvaje o se copurifique con viriones con capacidad de replicación.² Además, los virus son inherentemente inmunogénicos, lo que genera dificultades con las administraciones repetidas y la posibilidad de reacciones inmunes peligrosas. Otros desafíos con la administración de genes virales incluyen limitaciones en la especificidad de las células diana y los costos de fabricación de terapias genéticas basadas en virus.¹

3.2.2. Vectores no virales o sintéticos

Los vectores sintéticos brindan oportunidades para mejorar la seguridad, una mayor flexibilidad y una fabricación más sencilla. En general, los vectores sintéticos

son materiales que unen electrostáticamente ADN o ARN, condensan el material genético en partículas de unas pocas decenas a varios cientos de nanómetros de diámetro (Figura 1), protegen los genes y median la entrada celular.

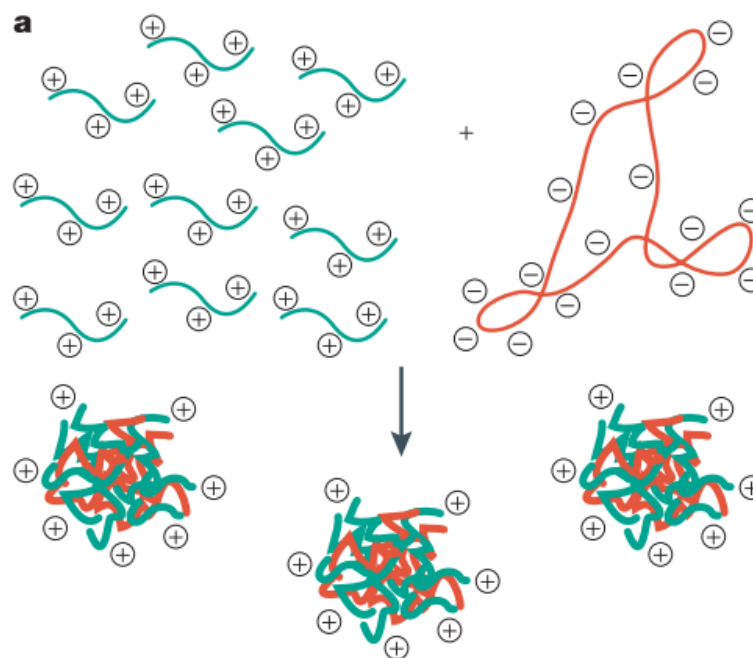


Figura 1. Formación de policomplejos.

Los polímeros catiónicos, incluidos los materiales disponibles en el mercado y los polímeros diseñados específicamente para la administración de genes, presentan una gran variedad de ventajas, incluidas las aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, así como otros grupos cargados positivamente, como las amidinas, que pueden residir en la columna vertebral del polímero, en grupos colgantes o en oligómeros injertados, lo que los hace grandes candidatos para formar policomplejos con el material genético.⁵

3.2.2.1. Quitosano

El quitosano es un polisacárido catiónico derivado de la quitina que se distingue por presentar una toxicidad baja, derivada de su naturaleza endógena, además de la ya citada capacidad de formar policomplejos con genes cargados

negativamente debido a sus abundantes grupos amino. Entre sus desventajas se encuentran su baja solubilidad en agua y problemas de estabilidad en pH fisiológico.¹⁹

3.2.2.2. Polietilenimina (PEI)

La polietilenimina es uno de los polímeros de administración de genes más eficaces estudiados hasta la fecha. Se ha demostrado que la PEI presenta una actividad alta de transferencia de genes, debida en gran parte al escape eficiente de la vía endocítica a través del mecanismo de esponja de protones. Sin embargo, la administración de genes mediada por la PEI puede verse obstaculizada por la citotoxicidad relativamente alta del polímero.

IV. EXPERIMENTAL

4.1. Metodología

4.1.1. Síntesis de nanotransportadores fluorescentes a base de quitosano y PEI ramificado

4.1.1.1. Síntesis de quitosano funcionalizado con rodamina B

La modificación de quitosano se llevó a cabo injertando rodamina B (RhoB) en las aminas primarias del CH a través de una reacción de amidación con la ayuda del activador EDC/NHS.²

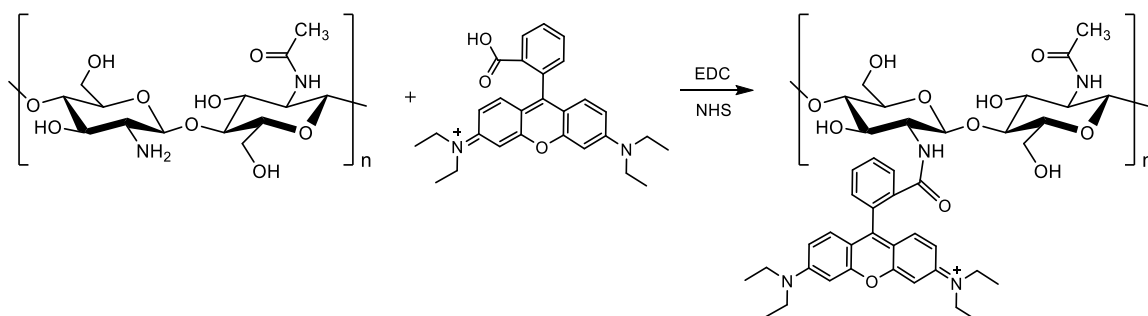


Figura 2. Ruta sintética de quitosano funcionalizado con rodamina B.

En primer lugar, se disolvieron 0.01 g de RhoB en 10 mL de agua destilada con agitación magnética y en condiciones de oscuridad. Luego, se añadieron 0.04 g de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 0.05 g de clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) a la solución y se dejó agitando durante 30 minutos para activar los grupos carboxilos presentes en la RhoB con el agente de acoplamiento EDC. La adición de NHS a la reacción (vía más baja) aumenta la estabilidad de los intermedios activados antes de su conjugación con las aminas primarias presentes en el quitosano (Figura 3).

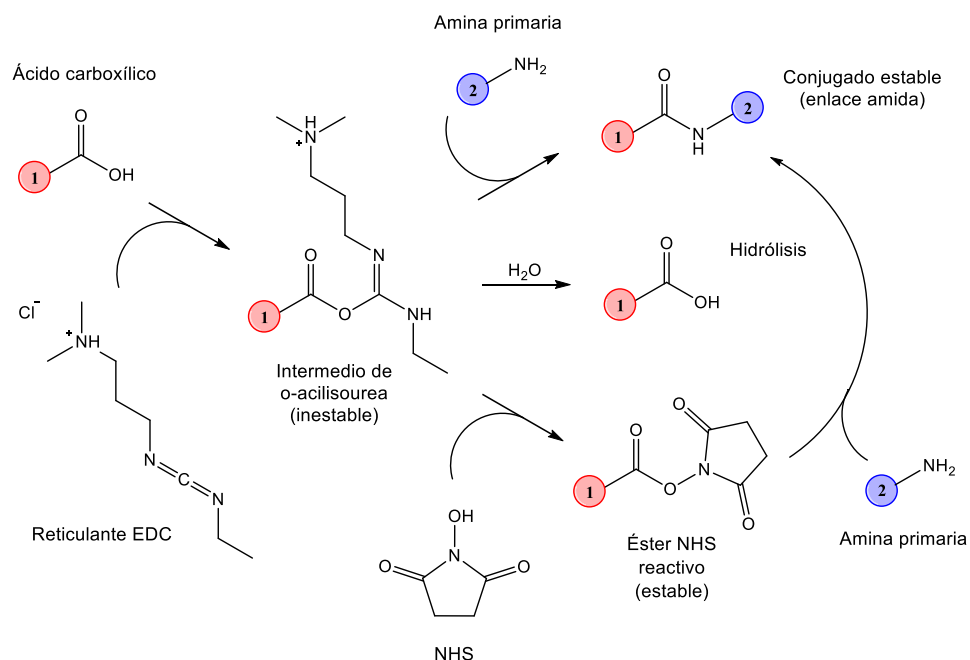


Figura 3. Esquema de reacción de reticulación mediada por carbodiimida (EDC) con y sin NHS.

Transcurrido el tiempo de preactivación, se agregaron 0.2 g de CH de bajo peso molecular disuelto en 30 mL de ácido acético 25 mM y se dejó agitando a temperatura ambiente en la oscuridad durante 48 h. La RhoB sin reaccionar se eliminó mediante la precipitación de CH con la adición gota a gota de NaOH 1 M, seguido de una serie de lavados con agua destilada y centrifugaciones (3500 rpm, 10 min). El precipitado se recuperó para liofilizar y se denominó CH-RhoB.

4.1.1.2. Síntesis de polietilenimina funcionalizada con rodamina B

El derivado PEI-RhoB se sintetizó a través de una reacción de amidación con EDC/NHS en condiciones similares a las descritas anteriormente. Primero, se disolvieron 0.2 g de PEI ramificada (25 kDa) en buffer de carbonato de sodio (20 mL, pH 9.5) para garantizar que los grupos amino en el recubrimiento de polímero PEI se desprotonaran.³ Por separado, se disolvieron 0.15 g de RhoB, 0.5 g de EDC y 0.15 g de NHS en 20 mL de agua destilada con agitación vigorosa durante 30 min. Transcurrido el tiempo de preactivación, se añadió la solución de RhoB a la solución

de PEI y se dejó agitando durante 48 h a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad.

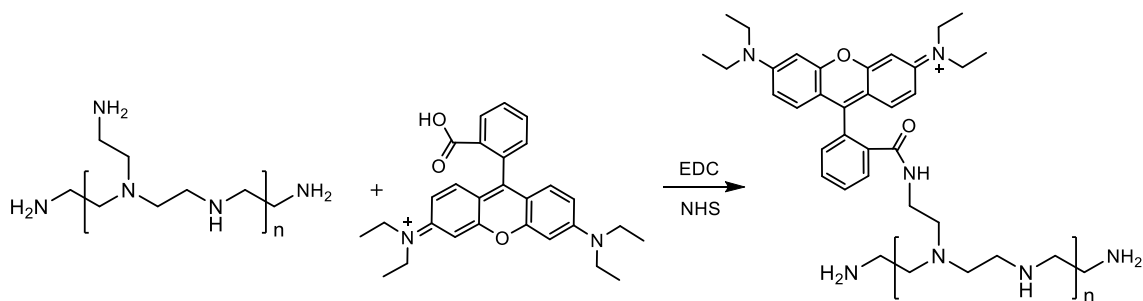


Figura 4. Ruta sintética de PEI funcionalizada con rodamina B.

Una vez completada la reacción, la solución se dializó frente a agua destilada utilizando una bolsa de diálisis con membrana de celulosa (MWCO 12-14 kDa) durante 3 días, hasta que la absorbancia de la RhoB presente en el agua de diálisis fuera despreciable. El producto se secó al vacío y se denominó PEI-RhoB.

4.1.1.3. Síntesis de puntos de carbono pasivados con PEI

Los puntos de carbono pasivados con PEI ramificada se sintetizaron mediante una ruta verde utilizando el método de pirólisis asistida por microondas.⁴ Se mezclaron 20 mL de glicerol con 6 mL de PBS 1x y 0.5 g de PEI ramificada (25 kDa) con agitación vigorosa hasta obtener una solución homogénea. La solución se colocó en un tubo de reacción de 10 mL y se calentó a 120 °C por 5 min en un horno microondas (CEM Discover). El producto se dejó enfriar a temperatura ambiente y se dializó contra agua utilizando una bolsa de diálisis con membrana de celulosa (MWCO 12-14 kDa) durante 3 días. Finalmente, se liofilizó para recoger el producto (PEI-CDs) seco y se almacenó a 4 °C sin ninguna purificación adicional.

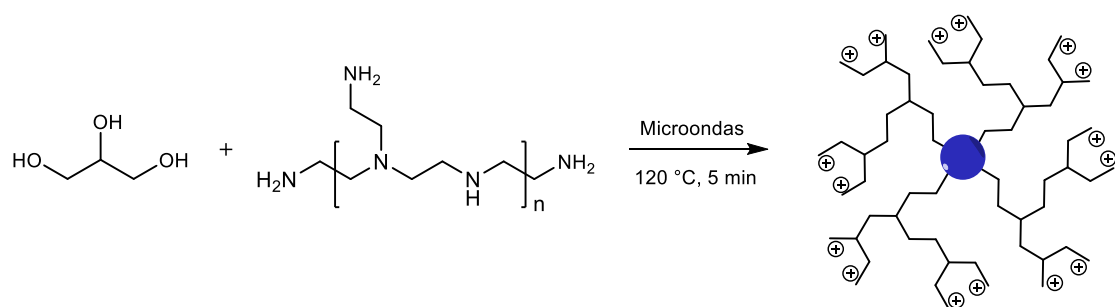


Figura 5. Esquema sintético de PEI-CDs.

4.1.2. Formación de policomplejos nanotransportador/ADN

Los policomplejos se prepararon a diferentes relaciones de carga nitrógeno/fosfato ($N/P = 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5$ y 10) tomando en cuenta del peso molecular de las unidades repetitivas de cada biopolímero (161 g de CH y 43 g de PEI por mol de N) y el peso molecular promedio de los nucleótidos de ADN (330 g de ADN por mol de P).⁵⁻⁷

Primero se preparó una solución madre de ADN 3 mM en buffer BIS-TRIS/EDTA 10 mM (pH 5) que posteriormente se diluyó a una concentración de 0.061 mM, a partir del cual se realizaron los cálculos. También se prepararon soluciones madre de cada biopolímero prístino y biopolímero marcado a partir de las cuales se hicieron diluciones para obtener la concentración deseada, como se resume en la Tabla 1. Las soluciones madre de CH y CH-RhoB al 0.1% p/v se prepararon en ácido acético 25 mM y las soluciones madre de PEI, PEI-RhoB y PEI-CDs al 0.1% p/v en PBS.

Los policomplejos se prepararon mezclando volúmenes iguales de polímero (concentración variable) y ADN (concentración fija), seguido de agitación vigorosa por 10 s en un agitador tipo vortex y reposo durante al menos 30 min para su posterior caracterización. Todas las soluciones madre fueron mantenidas en refrigeración a 4 °C hasta su uso y los policomplejos se prepararon antes de cada medición individual.

4.1.3. Síntesis de nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP (CH-TPP)

Se aplicó el método de gelación iónica para la preparación de nanopartículas de CH entrecruzadas con aniones tripolifosfato de sodio (TPP). Este método se basa en la interacción electrostática entre moléculas cargadas negativa y positivamente. En este caso, los grupos amino del quitosano interactúan con grupos aniónicos del TPP.^{2,8}

Se disolvieron 0.05 g de quitosano de bajo peso molecular en 10 mL de una solución de ácido acético al 1%. El valor del pH de la solución se ajustó a aproximadamente 4.6 utilizando NaOH 5 M. Las nanopartículas de quitosano se obtuvieron espontáneamente tras la adición gota a gota de 3 mL de solución acuosa de TPP al 0.25% en la solución de quitosano bajo agitación magnética constante a temperatura ambiente. Las nanopartículas se recogieron mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se descartaron y las nanopartículas se resuspendieron en agua destilada. El producto se recuperó mediante liofilización y se denominó CH-TPP.

4.1.3.1. Adsorción de ADN en nanopartículas de CH-TPP.

Las nanopartículas de quitosano preparadas previamente mediante gelación iónica fueron dispersadas en agua destilada para obtener una solución madre al 0.1% p/v. Los policomplejos se prepararon agregando gota a gota 500 μ L de la solución de ADN (0.061 mM en buffer BIS-TRIS/EDTA 10 mM, pH 5) a 500 μ L de la suspensión de nanopartículas de CH-TPP. Para cada ensayo, se fijó la concentración de ADN y se varió la concentración de quitosano para alcanzar las proporciones N/P correspondientes. Después de combinar la cantidad adecuada de quitosano y ADN, la solución se agitó por 10 s en un agitador tipo vórtex y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente antes de su caracterización. Los policomplejos se denominaron CH-TPP/ADN.

4.1.3.2. Encapsulación o absorción de ADN en nanopartículas de CH-TPP.

Para promover la encapsulación del ADN, se añadió el TPP a la solución de ADN para asegurar que no se produjera ninguna interacción entre el TPP cargado negativamente y el quitosano cargado positivamente, antes de la formación de los policomplejos. Las concentraciones de ADN y TPP utilizadas para la formación de los policomplejos fue constante en todos los experimentos, variando la concentración de quitosano para alcanzar las proporciones N/P correspondientes. La mezcla aniónica se agregó gota a gota a la solución de quitosano bajo agitación magnética constante y los policomplejos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min antes de su uso o análisis adicional.

4.2. Caracterización de los policomplejos

4.2.1. Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z

Se realizaron estudios de potencial ζ y DLS en un espectrofotómetro Zetasizer Nano-ZS (Malvern) para evaluar la carga electrostática y el tamaño de los policomplejos, así como el grado de compactación, en función de las relaciones N/P de los policomplejos. El potencial Z se midió utilizando celdas desechables de poliestireno con geometría de U (DTS1060) y el tamaño hidrodinámico se midió en una celda de poliestireno Malvern DTS0012, con un láser He-Ne de 4 mW que opera a una longitud de onda de 633 nm y un ángulo de dispersión de 173°. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y los resultados fueron el promedio de al menos tres corridas.

Los datos de diámetro hidrodinámico se obtuvieron directamente del software del instrumento que analiza la función de autocorrelación utilizando el método de análisis CUMMULANT. Además, se realizó un análisis de datos adicional mediante el paquete de software de análisis de datos ALV-NonLin, sobre la base del conocido método CONTIN.⁵

En general, se hizo una normalización entre 0 y 1 de cada correlograma obtenido, de acuerdo con la ecuación (1):

$$X_{normalizado} = \frac{X - X_{min}}{X_{max} - X_{min}} \quad (1)$$

Una vez que se obtuvieron los correlogramas normalizados, estos se ajustaron a una función exponencial con uno, dos o tres decaimientos, según sea el caso, y se procesaron en el programa de análisis de datos ALV-NonLin para obtener la función de distribución de tamaño correspondiente.

4.2.2. AFM

Se utilizó un equipo AFM nanosurf en modo no contacto para caracterizar la morfología de los policomplejos nanotransportador/gen. Los policomplejos se prepararon a una relación N/P 10 y la muestra se diluyó 1:10 a menos que se especifique lo contrario.

Se utilizó como sustrato un segmento de mica moscovita que fue exfoliada antes de su uso. Se dispensó un volumen de 10 μ L de muestra sobre la mica y esta fue dejada en reposo a temperatura ambiente por al menos 12 h previo a la medición. Los resultados obtenidos se analizaron con el software AFM Nanosurf Easyscan 2 empleando los procedimientos de flaten y planefit. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

4.2.3. UV-Vis y fluorescencia molecular

Las mediciones de UV-Vis se llevaron a cabo empleando un espectrofotómetro SHIMADZU UV-2700 en el intervalo de longitudes de onda de 250 a 700 nm, empleando celdas de cuarzo.

Las mediciones de fluorescencia molecular de los nanotransportadores se realizaron con un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse equipado con un controlador de temperatura y un soporte de muestra multicelular (Varian Instruments Inc.).

4.2.4. Evaluación de la eficiencia de complejación de ADN por electroforesis en gel

Se evaluó la eficiencia de complejación de ADN por electroforesis en gel empleando un equipo EDGE Integrated Electrophoresis System. Se prepararon los policomplejos nanotransportador/gen a las relaciones N/P deseadas ($N/P = 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5$ y 10) en presencia de bromuro de etidio ($50 \mu\text{M}$). Los policomplejos y el ADN puro fueron cargados en los carriles de la placa de electroforesis utilizando un gel de agarosa (1.0%) a 110 V durante 45 min . Después de este tiempo, se visualizó la placa bajo iluminación UV a temperatura ambiente.

4.2.5. Evaluación de la citocompatibilidad de los nanotransportadores

La citocompatibilidad de los sistemas se determinó mediante tres ensayos diferentes con el objetivo de evaluar distintos parámetros de viabilidad celular. Se realizaron ensayos de absorción de rojo neutro, cristal violeta y CCK-8 para evaluar la actividad lisosomal, estabilidad de membrana y actividad metabólica mitocondrial, respectivamente.

4.2.5.1. Ensayo de absorción de rojo neutro (NRU)

Los ensayos de citotoxicidad de absorción de rojo neutro se realizaron de acuerdo con la norma ISO-10993-5 con ligeras variaciones.

Se sembraron células HeLa en una placa de 96 pocillos ($100 \mu\text{L}$, $20,000$ células/pocillo) en DMEM suplementado con FBS al 10% , NEAA 0.1 mM , L-glutamina 2 mM , piruvato de sodio 1 mM y pen-strep al 1% y se incubaron durante 24 h en condiciones de cultivo estándar ($5\% \text{ CO}_2$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $> 90 \%$ humedad). Este período de incubación asegura la recuperación celular, la adherencia y progresión a la fase de crecimiento exponencial.

Después de 24 h de incubación, las muestras se pipetearon en los pocillos que contenían las células ($100 \mu\text{L}$, en las concentraciones necesarias para preparar policomplejos con $N/P = 10$) y se incubaron durante 24 y 48 h . Los policomplejos se prepararon en PBS ($\text{pH } 7.4$), a menos que se indique lo contrario.

Las células se examinaron a las 24 y 48 h en un microscopio invertido (Olympus CKX53) para evaluar los cambios en la morfología de las células debido a los efectos citotóxicos de la muestra de prueba y se adquirieron imágenes de microscopía de fluorescencia con un microscopio Zoe Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Hercules, California).

Transcurrido el tiempo de internalización, las células se lavaron con 150 μ L de PBS, y se incubaron durante 3 h con 100 μ L de medio NR (1 mL de NR 0.4% p/v en 79 mL DMEM) en condiciones de cultivo estándar. Después de la incubación, se retiró el medio NR y se lavaron nuevamente las células con 150 μ L de PBS. Luego, se agregaron 150 μ L de una solución de desorción NR (1:50:49, ácido acético glacial/etanol/agua destilada) a todos los pocillos, incluidos los espacios en blanco. La placa se agitó durante 10 min en un agitador orbital (Rotomix Type 48200) para extraer el rojo neutro de las células y formar una solución homogénea.

La absorbancia se midió en un lector de microplacas ELISA (iMark, BIO-RAD) a 490 y 595 nm, las dos longitudes de onda más cercanas a la absorción de rojo neutro (540 nm).

Todos los experimentos se realizaron por sextuplicado por punto de tiempo (seis pocillos por muestra) en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar (Ulbrecht).

4.2.5.2. Ensayos de tinción con cristal violeta (CV)

Se sembraron células HeLa en placas de 96 pocillos (100 μ L, 20,000 células/pocillo) y se cultivaron durante 24 h en condiciones de cultivo estándar. Posteriormente, los policomplejos y polímeros (preparados en las mismas condiciones descritas para NRU) se pipetearon en los pocillos (100 μ L) y se incubaron durante 24 y 48 h.

Una vez transcurridos los tiempos de incubación deseados, se descartó el medio de cultivo, se lavaron las células con 150 μ L de PBS y se fijaron con 10 μ L de

una solución de glutaraldehído (11% p/v en agua). La placa se agitó a temperatura ambiente (300 rpm, 15 min) en un agitador orbital (Rotomix Type 48200).

La solución se descartó y las células se lavaron dos veces con 150 μ L de agua destilada. Luego, las células se agitaron a temperatura ambiente (300 rpm, 15 min) en presencia de 100 μ L de una solución de cristal violeta (0.1% p/v en ácido ortofosfórico 200 mM, ácido fórmico 200 mM y MES 200 mM, pH 6). Una vez teñidas, las células se lavaron varias veces con agua y se dejaron secar al aire para obtener imágenes a las 24 y 48 h, con un microscopio óptico invertido (Olympus CKX53)

Inmediatamente después, las células se agitaron a temperatura ambiente (300 rpm, 15 min) en presencia de 100 μ L de ácido acético (10% v/v en agua) y se midió la absorbancia de la solución resultante con un lector de microplacas ELISA (iMark, BIO-RAD) a 595 nm.

4.2.5.3. Ensayo de viabilidad celular con CCK-8

Se sembraron células HeLa en una placa estéril de 96 pocillos (100 μ L, 2,000 células/pocillo) en medio de cultivo. Las células fueron incubadas durante 24 h en condiciones de cultivo estándar (5% CO₂, 37 °C, > 90 % humedad) para asegurar su adhesión, estiramiento y proliferación en las placas.

Transcurridas las 24 h, se añadieron las muestras (100 μ L) y se dejaron incubar por 24 y 48 h en condiciones de cultivo estándar para su internalización. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó con 100 μ L de medio de cultivo fresco adicionado con 10 μ L de reactivo de proliferación celular CCK-8, seguido de una agitación suave y una incubación de hasta 4 h.

Se midió la densidad óptica (OD) del formazán a 450 nm utilizando un lector de microplacas ELISA (BIO-RAD) cada hora para asegurar la no saturación de las lecturas y se determinó el punto de 4 h como el óptimo para determinar la citocompatibilidad.

4.2.5.4. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por sextuplicado por punto de tiempo (seis pocillos por muestra). El porcentaje de viabilidad celular se cuantificó como:

$$\% Viabilidad\ celular = \frac{A_S}{A_C} * 100 \quad (2)$$

donde A_S y A_C representan la absorbancia de las células expuestas a las muestras y la absorbancia de las células de control o no expuestas, respectivamente. Los resultados son el promedio de seis experimentos independientes.

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni para realizar comparaciones múltiples y las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0.05$.

4.2.6. Evaluación de la internalización celular por contratinción y microscopia de fluorescencia confocal

La captación celular de los policomplejos fue seguida por microscopía de fluorescencia confocal mediante la siembra de células HeLa sobre un cubreobjetos de vidrio recubierto de poli L-lisina (12 x 12 mm) colocado dentro de una placa de 6 pocillos (3 mL, 5×10^4 células/pocillo). Las células se cultivaron durante 14 h en condiciones de cultivo estándar (5% de CO_2 a 37 °C) en DMEM suplementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, Pen Strep al 1%, piruvato de sodio 1 mM y NEAA 0.1 mM.

Posteriormente, se añadieron los polímeros y policomplejos fluorescentes preparados a una relación N/P = 10 (200 μ L en PBS) y se incubaron por 8 h en condiciones de cultivo estándar para su internalización. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS (350 μ L) y se tiñó el núcleo celular para su visualización. Las células que fueron internalizadas con CH-RhoB y PEI-RhoB se

tiñeron con DAPI para visualizar el núcleo celular en azul y las células tratadas con PEI-CDs se tiñeron con yoduro de propidio para visualizar el núcleo celular en rojo.

4.2.6.1. Tinción del núcleo celular con DAPI

Brevemente, se agregaron 300 μ L de una solución de formaldehído al 4% y glutaraldehído al 1.1% en PBS a cada cubreobjetos para fijar las células, se incubaron durante 10 minutos y se lavaron con PBS (350 μ L). Luego, se agregaron 300 μ L de una solución de Triton X-100 (0.2% p/v en PBS), se incubaron durante 10 minutos y se lavaron con PBS.

Finalmente, las células se tiñeron con una gota de DAPI (Invitrogen) y los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos de vidrio con las células intercaladas en el medio. Las células se almacenaron a -20 °C durante al menos 24 h en condiciones de oscuridad y se visualizaron a 63x en un microscopio confocal LEICA TCS-SP5 (LEICA Microsystems Heidelberg GmbH) utilizando el canal azul para DAPI (λ_{exc} = 405 nm), el canal rojo para RhoB (λ_{exc} = 562 nm) y luz transmitida en interferencia diferencial.

4.2.6.2. Tinción del núcleo celular con yoduro de propidio

Primeramente, se agregaron 350 μ L de paraformaldehído (4% p/v en PBS 2x) a cada cubreobjetos para fijar las células, se incubaron durante 10 minutos y se lavaron con PBS (350 μ L). Luego, se agregaron 350 μ L de una solución de Triton X-100 (0.2% p/v en PBS), se incubaron durante 10 minutos y se lavaron con PBS. Finalmente, las células se tiñeron con una solución de yoduro de propidio (1% p/v en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad y se lavaron con PBS.

Los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos de vidrio y se agregó una gota de medio de montaje para preservar la señal de fluorescencia. El medio de montaje fue preparado con glicerol (base), DABCO (reactivo antidecoloración) y PVA (plastificante). Para esto, se mezclaron 2.4 g de PVA con 6 g de glicerol y 6 mL de agua destilada y se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente. Al día

siguiente, se agregaron 12 mL de TRIZMA-HCl 0.2 M a pH 8.5 y se calentó la mezcla a 50 °C en baño maría hasta que el PVA se disolvió completamente. Finalmente, se añadieron 0.625 g de DABCO bajo agitación magnética constante hasta obtener una mezcla homogénea. El medio de montaje se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos y se prepararon alícuotas de 1 mL con el sobrenadante que fueron almacenadas a - 20 °C para posteriores estudios.

Se emplearon líneas de excitación de 405 (observadas a 430/550 nm) y 552 nm (observadas a 562/700 nm) para la visualización de PEI-CDs y yoduro de propidio (núcleo celular), respectivamente.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Síntesis del derivado CH-RhoB

En las figuras 6 y 7 se presentan el espectro UV-Vis de Rho B a diferentes concentraciones conocidas y la regresión lineal de los datos obtenidos (curva de calibración), la cual resultó tener una R^2 de 0.9995. A partir de la curva de calibración se obtuvo la cantidad de Rho B injertada en el nanotransportador CH-RhoB. Para esto, se determinó la cantidad de RhoB injertada y RhoB libre en el sobrenadante con espectroscopía UV-Vis y se determinó la eficiencia de reacción a partir de la siguiente ecuación:

$$ER\% = \frac{\mu g \text{ de RhoB inj}}{\mu g \text{ de RhoB inicial}} \times 100 \quad (1)$$

De acuerdo con esta, se logró una eficiencia de reacción del 16.1%.

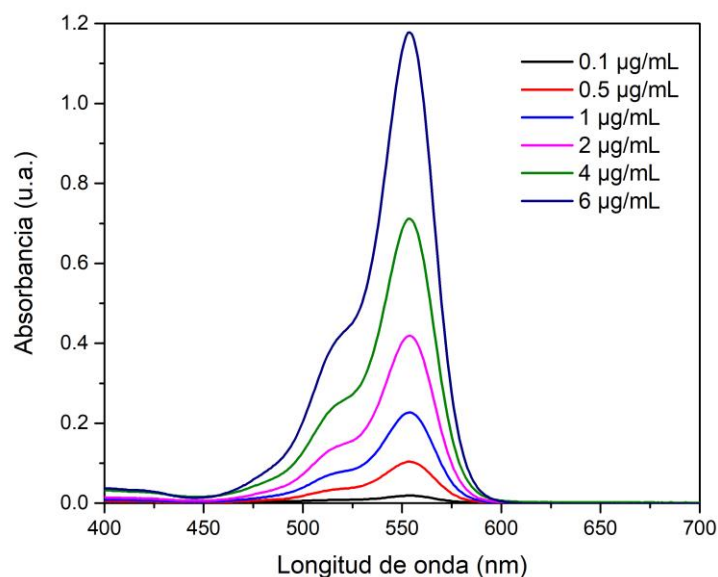


Figura 6. Espectro UV-Vis de RhoB a distintas concentraciones.

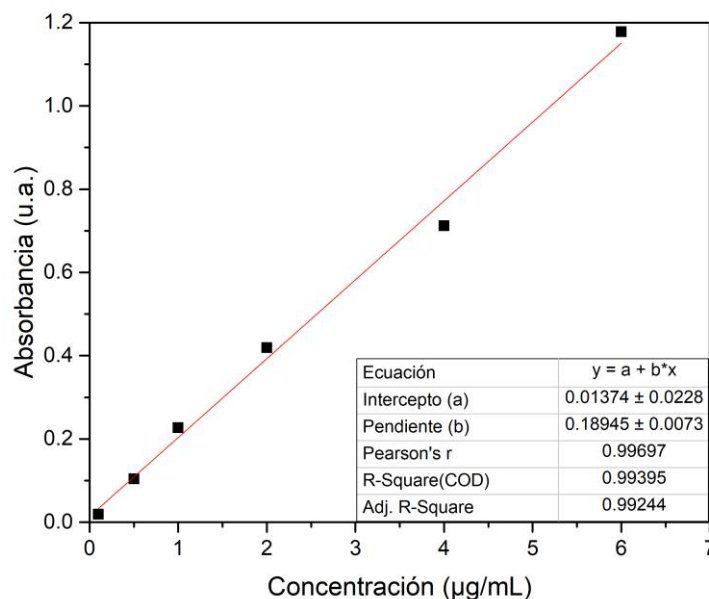


Figura 7. Curva de calibración de RhoB

En la figura 8 se muestran los espectros de absorción de CH, CH-RhoB y RhoB. Se pueden observar dos picos característicos, a 300 y 554 nm, correspondientes a las absorciones de quitosano y RhoB, respectivamente. El espectro UV-Vis de CH (rojo) mostró un pico de absorción a 300 nm, que corresponde a la transición $\pi-\pi^*$. Después del proceso de modificación, surgió una nueva banda (b) con un máximo de absorción en 554 nm, que se origina de la transición electrónica típica del anillo aromático en rodamina B, lo que demuestra la modificación exitosa del quitosano.

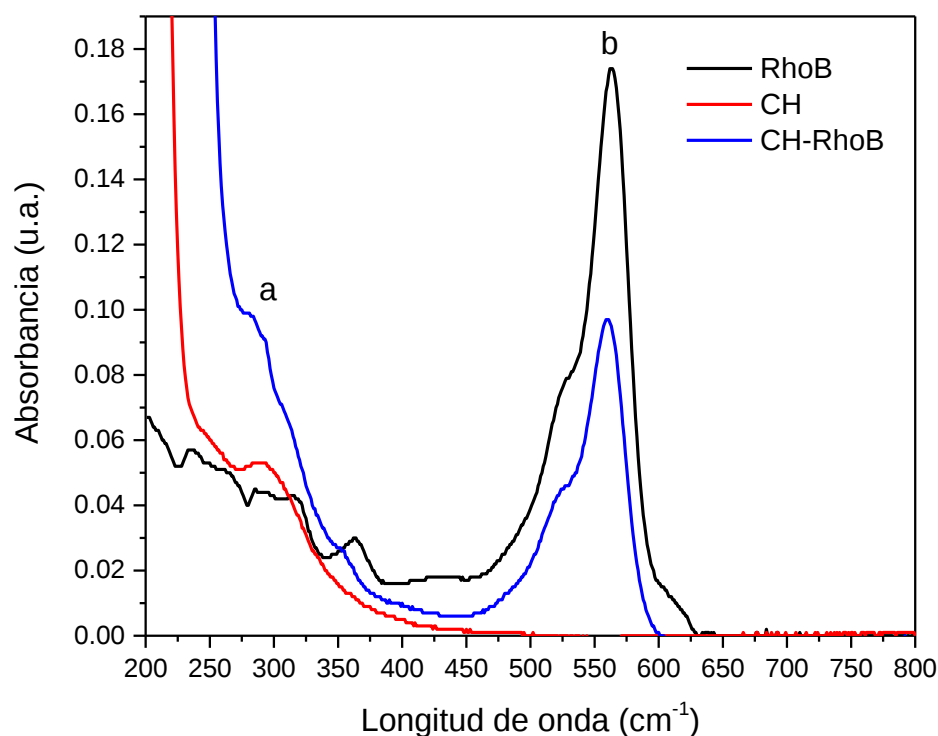


Figura 8. Espectro absorción UV-Vis de CH, CH-RhoB y RhoB.

En la figura 9, se presentan los espectros FTIR de CH y CH-RhoB donde se observa el aumento de las señales de vibración de flexión de N-H de la amida entre 1640 y 1550 cm^{-1} , al igual que las señales de tensión N-H entre 3350 y 3180 cm^{-1} , correspondiente a la formación del grupo amida en la reacción de amidación. En la figura 10 también se presentan los espectros de excitación y emisión de fluorescencia, obteniendo un máximo de excitación a los 554 nm y un máximo de emisión a los 572 nm.

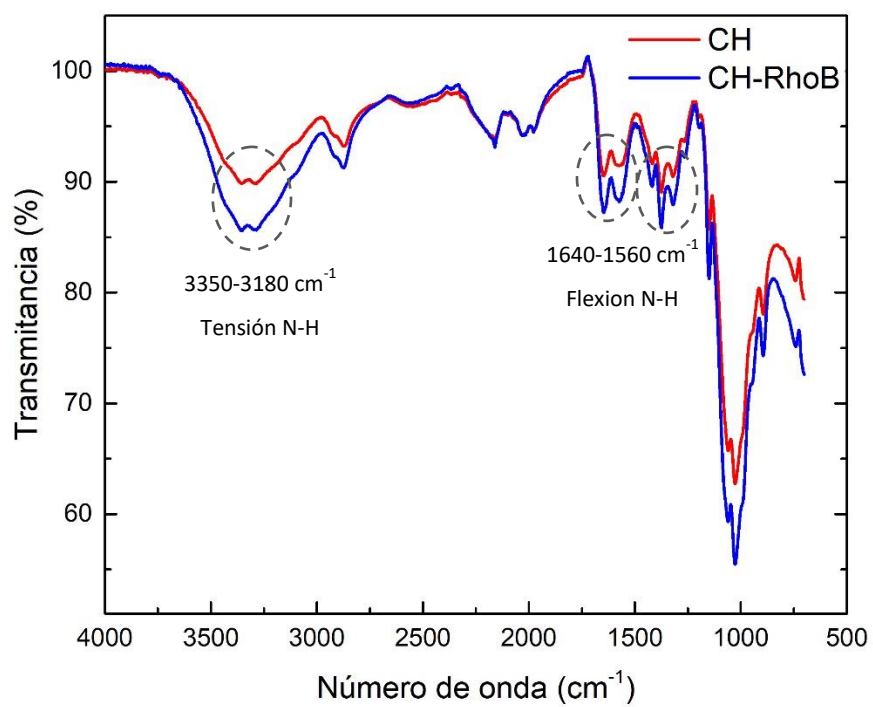


Figura 9. Espectro FTIR de CH, CH-RhoB y RhoB.

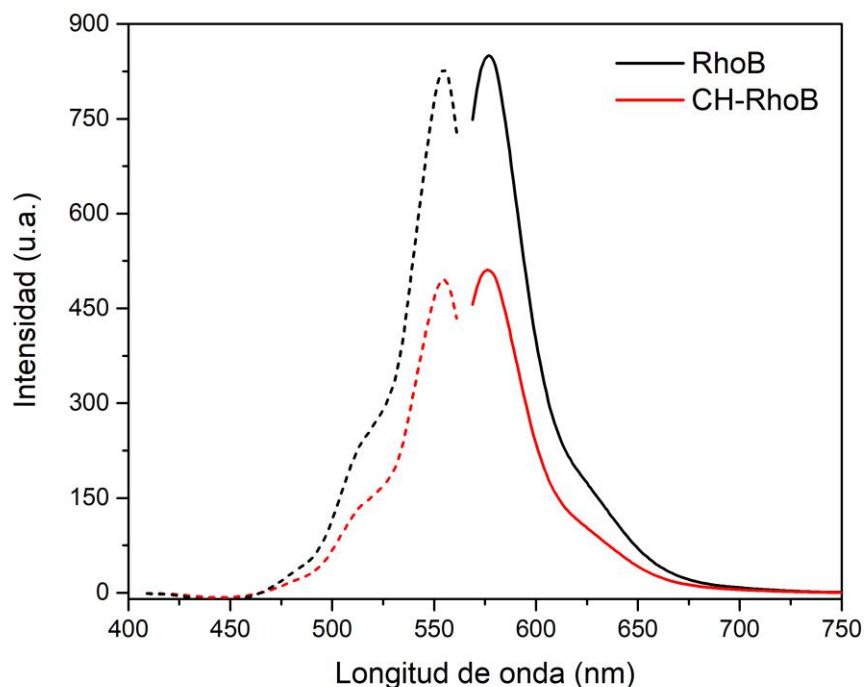


Figura 10. Espectro de emisión y excitación de CH-RhoB. $\lambda_{exc}=554$ nm, $\lambda_{em}=572$ nm

5.2. Dispersión de luz dinámica y potencial Z de los complejos nanotransportador/ADN

En la figura 11 se presenta el potencial Z de los complejos nanotransportador/ADN estudiados y se observan las relaciones N/P en las que ocurre la inversión de carga superficial del ADN. Se puede observar que el valor positivo de la carga superficial de los policomplejos aumentó con el aumento de la concentración de quitosano a una concentración constante de ADN para todos los sistemas excepto el sistema CH-TPP/ADN. El incremento se debió al aumento en el número de cargas positivas aportadas por los grupos amina de los nanotransportadores que apantallan e incluso invierten la carga negativa del ADN aportada por los grupos fosfato ubicados en su doble hélice. Esta carga neta positiva

es deseable para evitar la agregación de los complejos y promover su interacción electrostática con la membrana celular que posee una carga negativa neta proveniente de la bicapa fosfolipídica que la constituye.¹⁸

Para el sistema CH/ADN se observa un potencial Z negativo para las muestras con un N/P de 0, 0.5, 1 y 1.5 y una inversión de carga cuando se alcanza una relación N/P = 2. A priori, la inversión de carga del ADN en N/P 2 se anticipa como un resultado muy prometedor para la terapia génica en virtud de que facilita la aproximación e interacción electrostática de los policomplejos con la membrana celular. Sin embargo, el potencial Z observado en esta relación de carga (aunque positivo) es muy cercano a 0 mV y aparentemente insuficiente para asegurar la compactación completa del ADN. Como se discutirá más adelante, los policomplejos con potencial Z moderado (tanto N/P 1.5 como N/P 2) dan lugar a sistemas con más de una población de tamaños en la que se espera la coexistencia de ADN en distintas conformaciones: libre (estirado) y compactado (ver discusión de figuras 12-14). Por otro lado, las muestras con un N/P de 3, 5 y 10 presentaron un potencial Z de 6.40, 8.20 y 9.33 mV, respectivamente. Estos valores de potencial Z positivo, aunque moderados, dan sustento al diámetro hidrodinámico aproximadamente constante observado para los policomplejos formados a estas relaciones de carga.

Se observa que el sistema CH-RhoB/ADN presenta un comportamiento similar al sistema con quitosano prístino con ligeras variaciones.

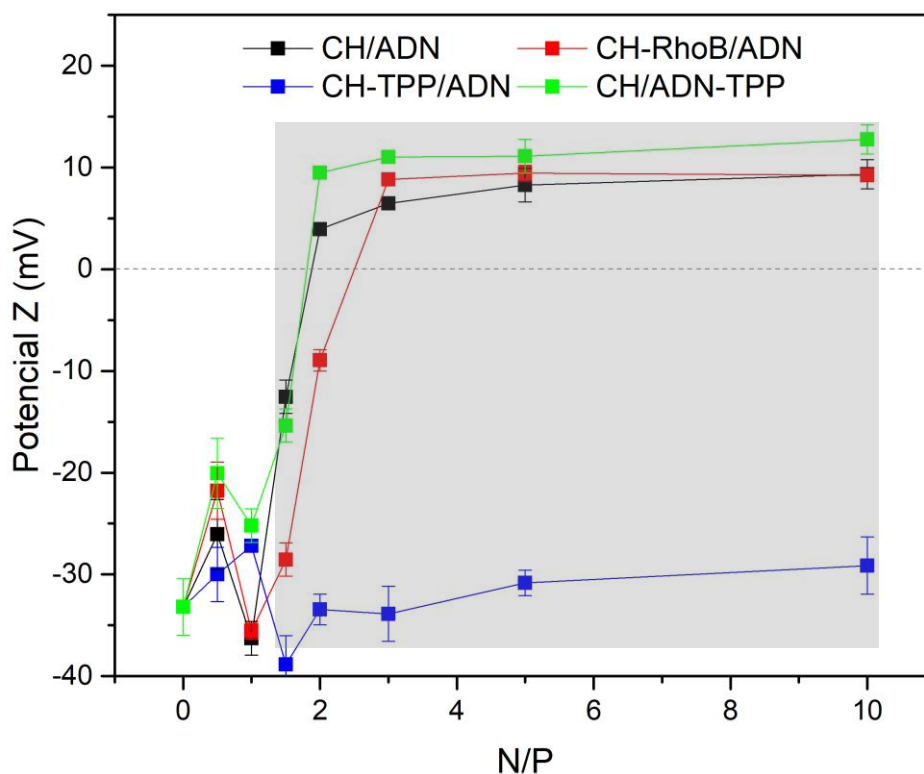


Figura 11. Gráfico del POT Z de los policomplejos CH/ADN, CH-RhoB/ADN, CH-TPP/ADN y CH/ADN-TPP a diferentes relaciones N/P.

En el caso del sistema CH-TPP/ADN, se observa un comportamiento diferente debido a que se mantiene un POT Z negativo para todas las relaciones N/P estudiadas y no se observa inversión de carga. Esto se debe a que las NPs CH-TPP preformadas no son capaces de absorber o internalizar al ADN, por lo que este se queda recubriendo a la nanopartícula en la superficie exterior; contrario al sistema CH/ADN-TPP donde si ocurre la internalización del ADN en la nanopartícula al variar la metodología de síntesis y agregar el entrecruzante junto con el ADN.

A partir de los resultados de potencial Z se hizo la determinación de estudiar el tamaño de policomplejos desde que se comienza a observar una evolución del potencia Z, es decir, desde que se comienza a compactar el ADN.

En la figura 12 se observa el gráfico del diámetro hidrodinámico de los sistemas en función de las diferentes relaciones N/P estudiadas. Los sistemas CH/ADN, CH-RhoB/ADN y CH/ADN-TPP presentan un comportamiento similar con una ligera disminución en el diámetro hidrodinámico para el sistema CH-RhoB/ADN. Para un N/P de 1.5 y 2 se encontraron diversas poblaciones de tamaño por lo que se procedió a analizar los correlogramas para cada sistema. A partir de una relación N/P 3, donde se alcanza el potencial Z positivo, el diámetro se mantuvo relativamente constante para los sistemas CH-RhoB/ADN y CH/ADN-TPP con diámetros de 266.90 y 225.43 nm, respectivamente. El sistema CH-TPP/ADN presenta un comportamiento diferente debido a que las NPs CH-TPP fueron preformadas antes de la complejación con ADN y este último se encuentra recubriendo la superficie, provocando un tamaño de nanopartícula más grande.

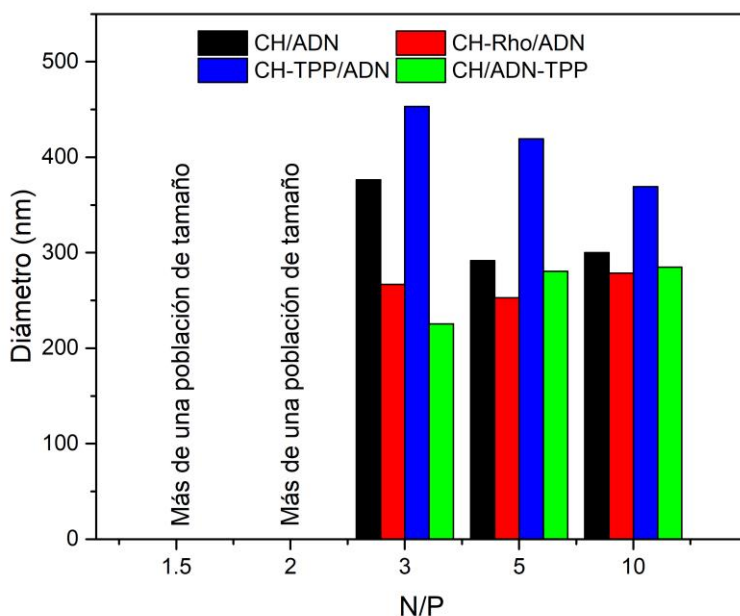


Figura 12. Gráfico del diámetro hidrodinámico de los complejos CH/ADN, CH-RhoB, NPs CH-TPP/ADN y CH/ADN-TPP a diferentes relaciones N/P.

Para los complejos formados a relaciones N/P de 1.5 y 2, donde se encontraron dos o más poblaciones de tamaño, fue necesario un análisis adicional. Para esto se definen $(N/P)_c$ y $(N/P)^*$ como las relaciones N/P donde se comienza a formar el complejo y donde los complejos adoptan tamaños estables. Los correlogramas fueron normalizados entre 0 y 1 y ajustados a una función de decaimientos exponenciales, de uno, dos y tres decaimientos, según fuera necesario.

En la figura 13 se presenta un correlograma representativo del sistema CH/ADN con una población de tamaño, para la relación N/P 3, donde los complejos adoptan tamaños estables. Se observa un correlograma con un decaimiento, lo que nos indica una distribución de tamaños estable y una sola población con diámetro promedio de 373 nm.

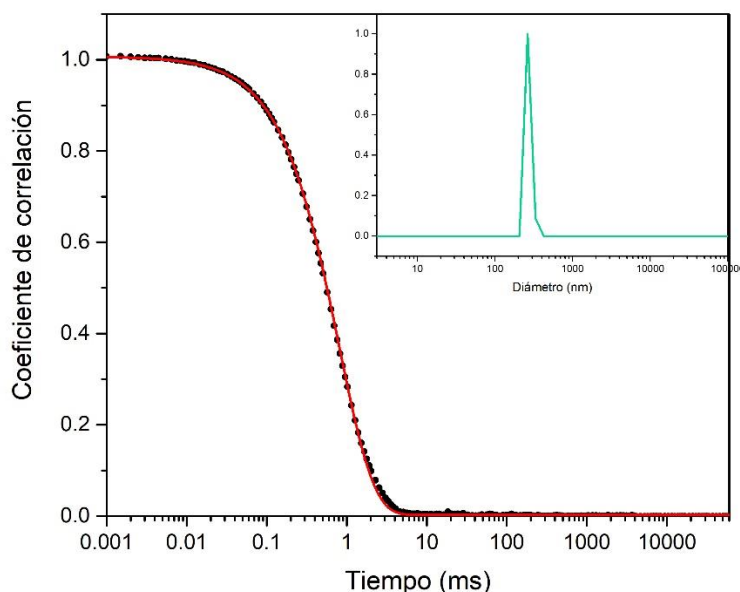


Figura 13. Correlograma representativo de una muestra con una población de tamaño.
(CH/ADN, N/P 5)

En la figura 14 se presenta un correlograma representativo del sistema CH/ADN a una relación N/P de 1.5, donde se presentan tres poblaciones de tamaños diferentes. El correlograma se ajustó a una función exponencial de tres decaimientos

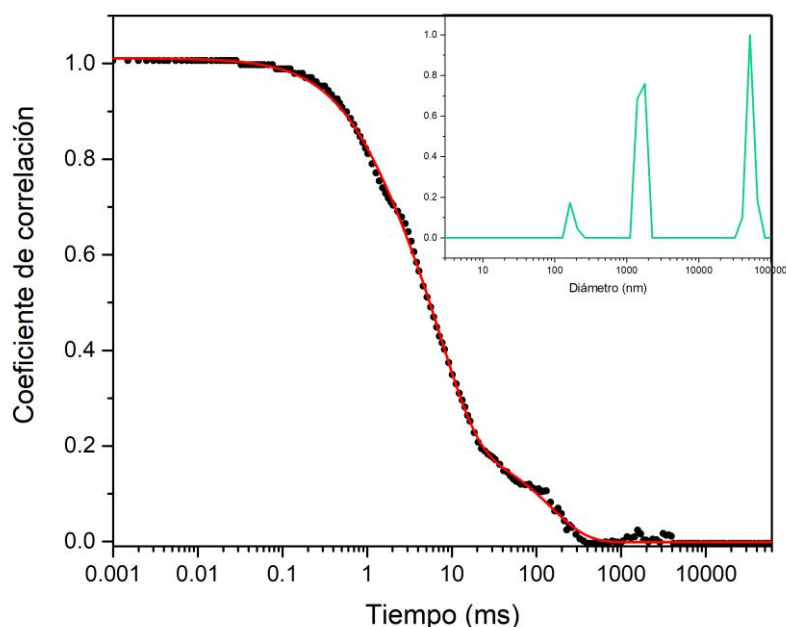


Figura 14. Correlograma representativo de una muestra con tres poblaciones de tamaño.
(CH/ADN, N/P 1.5)

5.3. Evaluación de la eficiencia de complejación por electroforesis en gel

En la Figura 15 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los policomplejos de CH a las relaciones N/P estudiadas. Los policomplejos se visualizan por la tinción con bromuro de etidio. Este se intercala selectivamente en las bases nitrogenadas del ADN, en donde la parte aromática de la molécula se alinea con el ADN, formando una fuerte interacción de apilamiento, proporcionándole un aumento en su fluorescencia, que al estar expuesto a una fuente de luz UV emite una fluorescencia que se puede diferenciar fácilmente a simple vista (la fotografía se presenta en escala de grises).

Al aumentar las concentraciones de CH y manteniendo la concentración de ADN constante, se observaron diferentes niveles de complejación. En el caso de la muestra de ADN libre ($N/P = 0$) se observó una migración hacia el cátodo, este era el resultado esperado al no tener la protección del CH como vehículo. En el caso de la muestra con un N/P de 0.5 también se presentó una migración pronunciada al cátodo debido a que la cantidad de ADN es mayor a la del CH por lo que en efecto hay formación de policomplejos, pero estos no son lo suficientemente estables para proteger al ADN de su migración a través del gel. En el carril 3 ($N/P = 1$) también se presenta un ligero desplazamiento del ADN. En las muestras N/P 1.5 y 2 ya no se apreció el desplazamiento del ADN, en estas muestras las unidades de carga del CH se igualan a las de ADN o las superan. Al relacionar estos resultados con los obtenidos por POT Z se anticipa que los policomplejos en estas relaciones de carga se encuentren alrededor de su punto isoeléctrico.

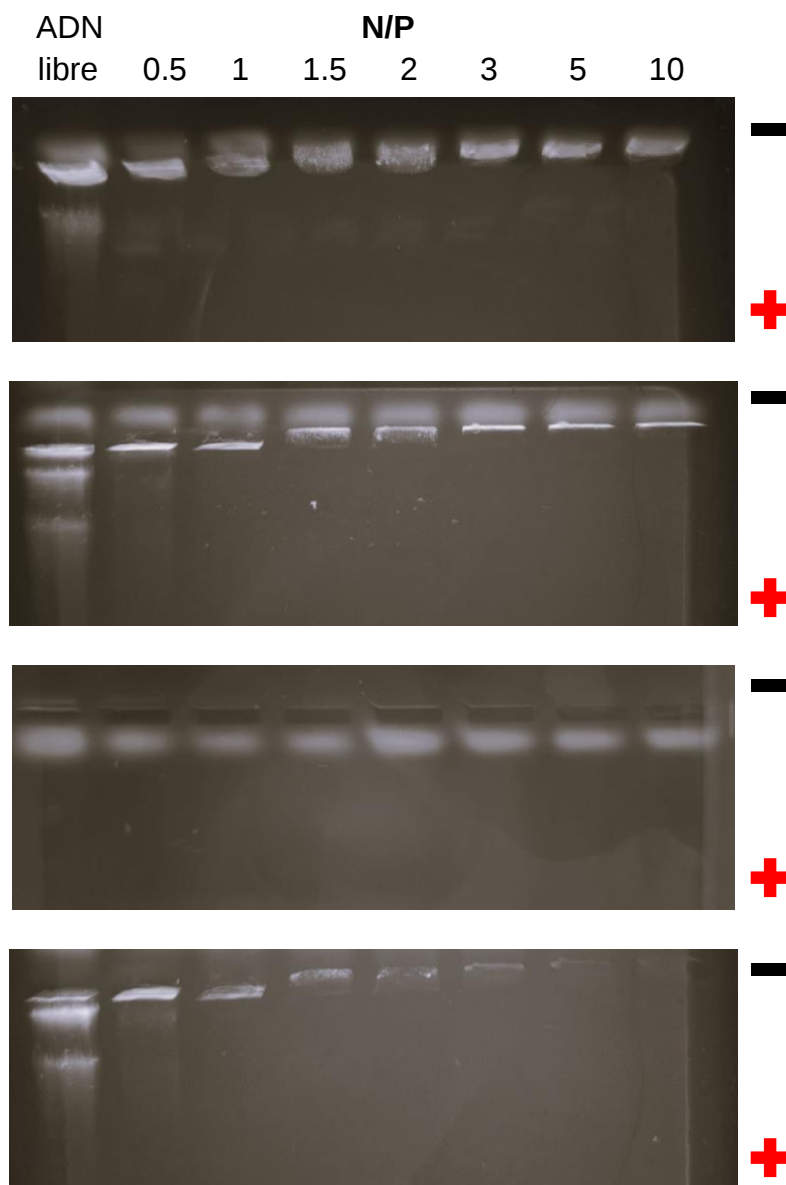


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los policomplejos CH/ADN, CH-RhoB/ADN, CH-TPP/ADN y CH/ADN-TPP (N/P 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 y 10) y ADN libre. Tinción con bromuro de etidio.

Por su parte, en las muestras con un N/P de 3, 5 y 10 se observa que los policomplejos migran hacia el ánodo, esto se explica por la inversión de carga del ADN derivada de su compactación con el quitosano (también referida en la literatura como condensación). La complejación se visualiza como una retención de los policomplejos en el ánodo a valores de N/P altos, donde se anticipa que el quitosano

recubre la superficie del policomplejo y compacta al ADN al interior. Mientras tanto, en los sistemas correspondientes a un N/P bajo (a relaciones N/P antes de la condensación de los policomplejos) el ADN es libre para migrar hacia el cátodo en el gel. En la literatura revisada se sigue la misma tendencia, la migración del ADN al cátodo a través del gel de agarosa se detiene a una relación estequiométrica (teórica) alrededor de $N/P = 1$.¹⁰

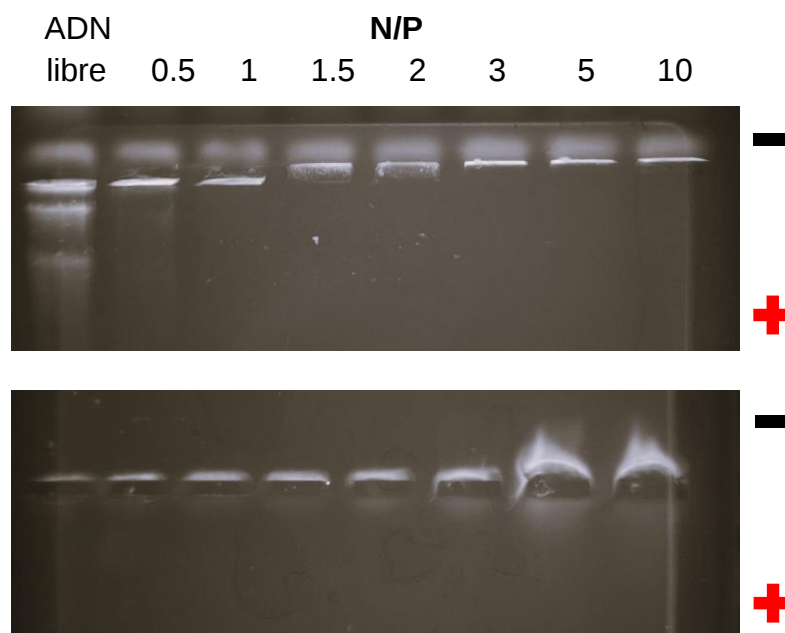


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los policomplejos CH-RhoB/ADN (N/P 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 y 10). a) Visualización de ADN intercalado con bromuro de etidio y b) visualización de CH-RhoB (sin tinción con EtBr)

5.4. Microscopía de fuerza atómica

En la figura 17 se presentan las micrografías de ADN libre en su forma estirada donde se puede observar el tamaño y la forma que presentan cuando se encuentra en solución.

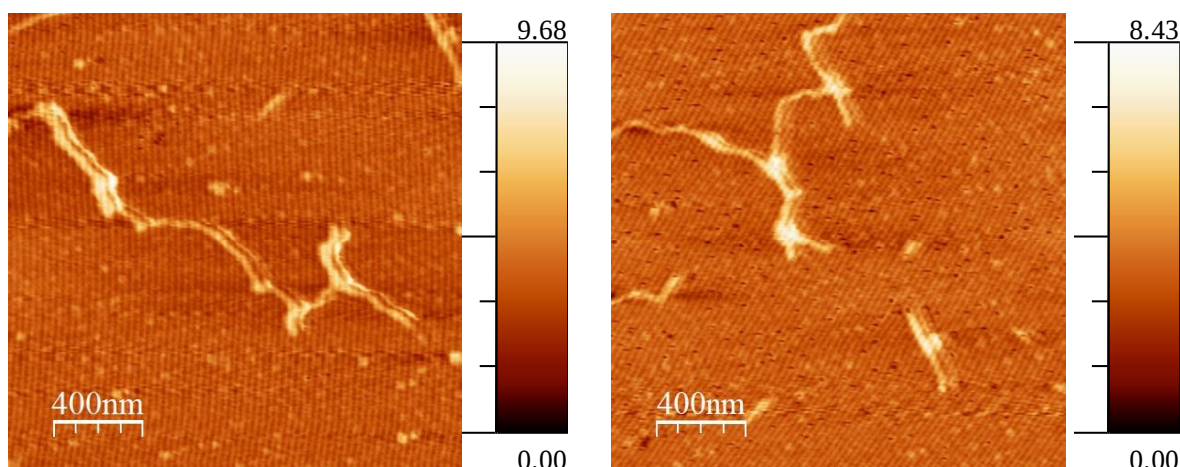


Figura 17. Micrografía obtenida por AFM de ADN en solución (2x2 μm).

En la figura 18 se presenta una micrografía del policomplejo CH/ADN preparado a una relación N/P 10, sabiendo de antemano (por los resultados de DLS y POT Z) que a esta relación N/P la densidad de carga es tal que proporciona una carga superficial positiva y un tamaño estable. Se pueden observar morfologías principalmente de tipo globulares y de cepillo que son características de una complejación violenta y desordenada en comparación del sistema con RhoB (Figura 19) donde se observan nanopartículas globulares bien definidas.

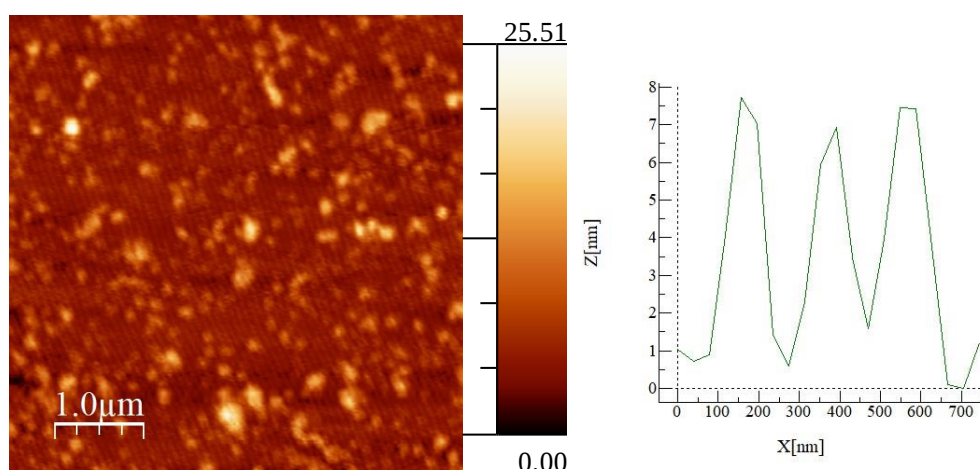


Figura 18. Micrografía obtenida por AFM de los policomplejos CH/ADN (N/P 10) y su perfil de topografía (5x5 μm).

Se ha informado anteriormente que la compactación del ADN con quitosano puede dar como resultado una mezcla de estructuras: toroides, varillas y glóbulos, que depende de propiedades como la relación de carga y la fuerza iónica. Al tener aminos funcionalizadas en los policomplejos CH-RhoB/ADN se tiene una menor fuerza iónica que se ve reflejada en un arreglo y compactación más ordenado de la muestra.

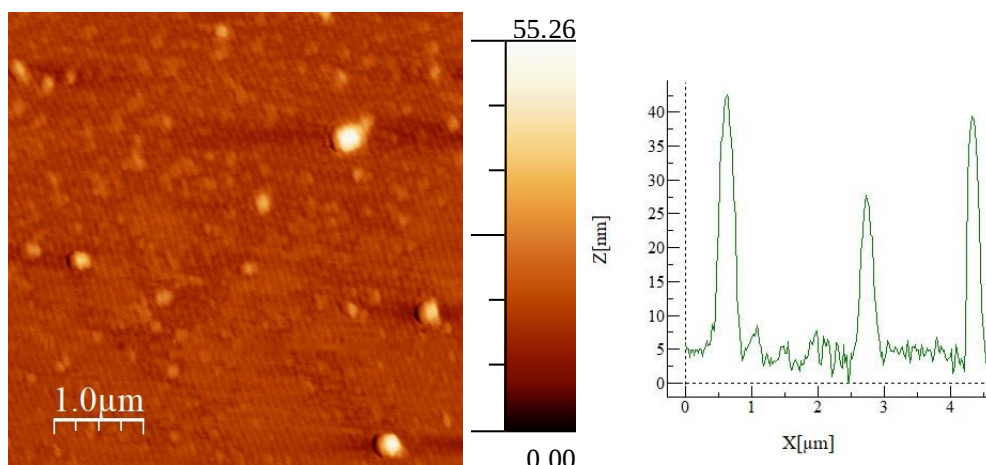


Figura 19. Micrografía obtenida por AFM de los policomplejos CH-RhoB/ADN (N/P 10) y su perfil de topografía (5x5 μm).

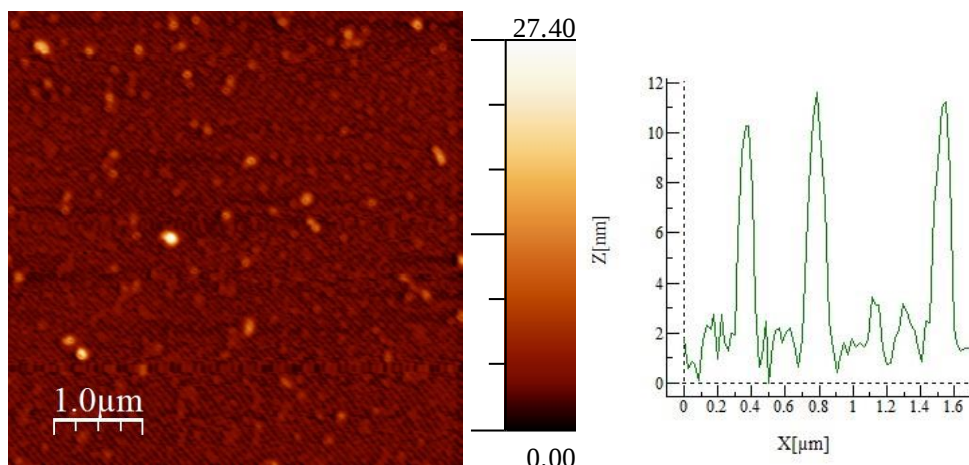


Figura 20. Micrografía obtenida por AFM de los policomplejos CH/ADN-TPP (N/P 10) y su perfil de topografía (5x5 μm).

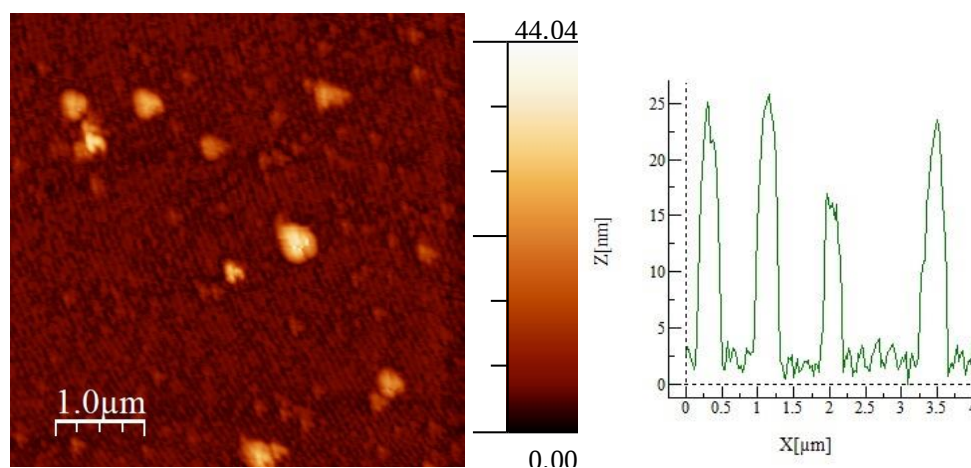


Figura 21. Micrografía obtenida por AFM de los policomplejos CH-TPP/ADN (N/P 10) y su perfil de topografía (5x5 μm).

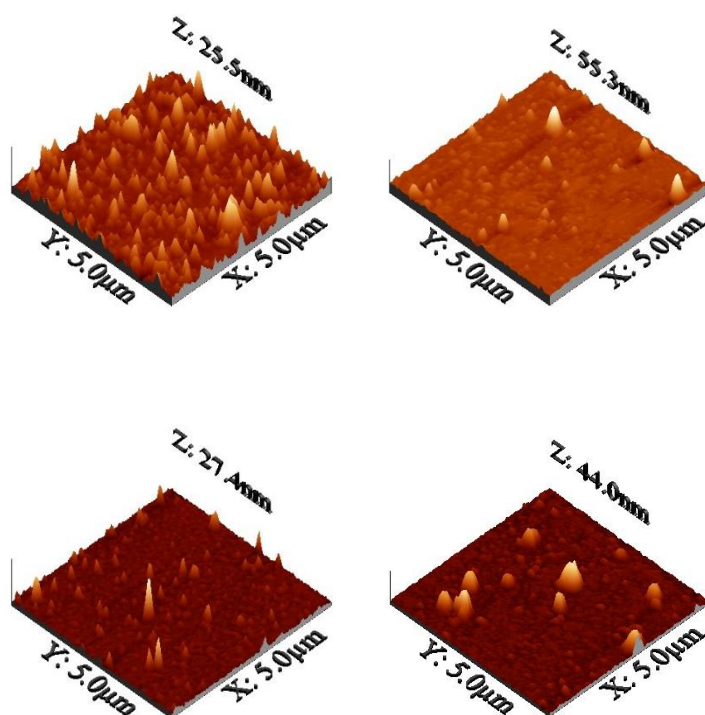


Figura 22. Imágenes AFM 3D de los policomplejos CH/ADN, CH-RhoB/ADN, CH/ADN-TPP y CH-TPP/ADN (5x5 μm).

5.5. Síntesis y caracterización de los derivados PEI-RhoB y PEI-CDs

Se obtuvieron los espectros de absorción de PEI, PEI-RhoB y RhoB donde se pueden observar la absorción característica que se origina de la transición electrónica típica del anillo aromático en la RhoB, a los 526 nm, en el producto PEI-RhoB, demostrando una funcionalización exitosa. A partir de la curva de calibración se obtuvo la cantidad de Rho B injertada en el nanotransportador PEI-RhoB con una eficiencia de reacción del 12%.

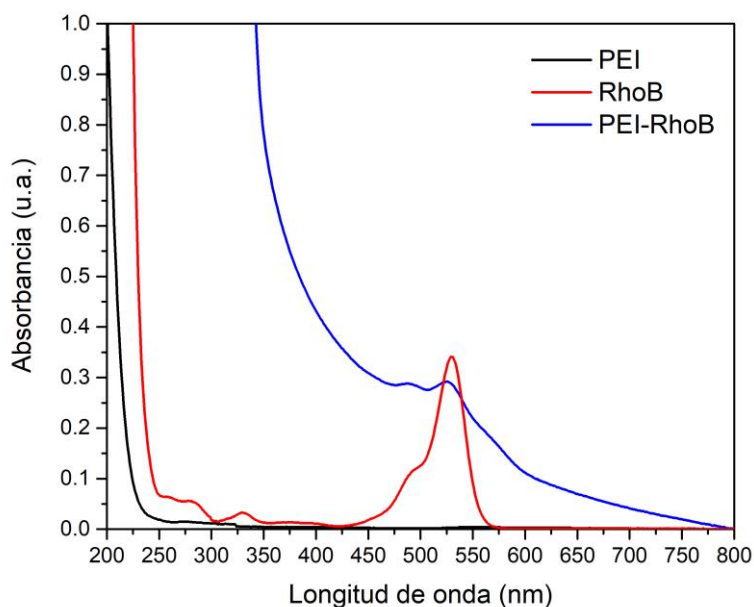


Figura 23. Espectro absorción UV-Vis de PEI, PEI-RhoB y RhoB.

En la figura 24 se presentan los espectros de excitación y emisión de fluorescencia del nanotransportador PEI-RhoB, en el que se puede observar un máximo de excitación a los 526 nm y un máximo de emisión a los 555 nm.

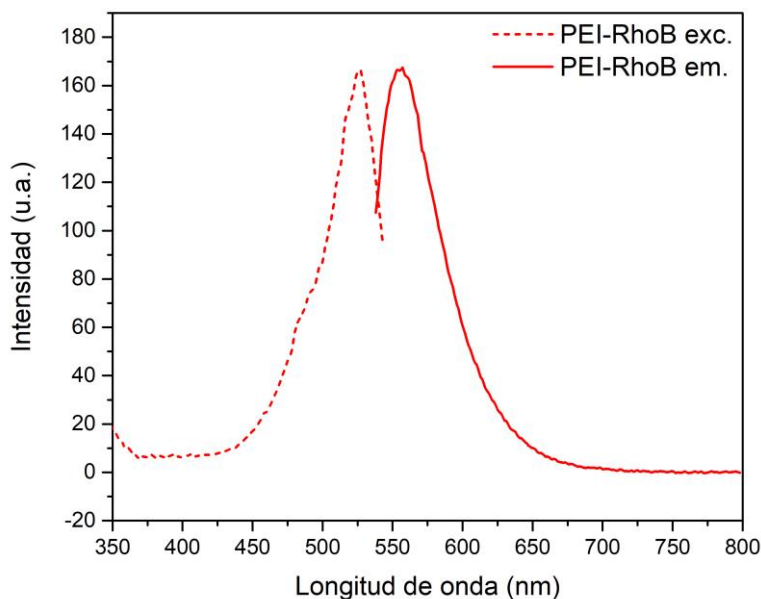


Figura 24. Espectro de emisión y excitación de PEI-RhoB. ($\lambda_{exc} = 526$ nm, $\lambda_{em} = 555$ nm)

También se obtuvieron los espectros de absorción de PEI-CDs donde se pueden observar la absorción característica de los CDs, alrededor de los 330 nm, en comparación con el espectro de PEI donde no se puede distinguir una absorción significativa (Figura , demostrando la síntesis exitosa de los CDs pasivados con PEI.

Como se muestra en la Fig. 26, los CDs preparados pasivados con PEI exhibieron excelentes propiedades solubles en agua y emitieron luminiscencia azul bajo luz ultravioleta (330 nm). Para entender esto, asumimos que existen tres pasos en todo el proceso de pirólisis, es decir, (i) deshidratación de glicerol y formación de nanopartículas, (ii) pasivación de la superficie de nanopartículas y (iii) crecimiento de puntos de carbono. Aunque los orígenes de la fotoluminiscencia aún no se comprenden completamente en los puntos C, cada vez hay más pruebas de que la emisión surge de la recombinación radiactiva de excitaciones ubicadas en trampas de energía superficiales [16].

En la figura 26 se presentan los espectros de excitación y emisión de fluorescencia del nanotransportador PEI-CDs, en el que se puede observar una banda de absorción ancha con un máximo de excitación a los 330 nm y una emisión dependiente de la longitud de excitación, con un corrimiento al rojo a mayor longitud de excitación.

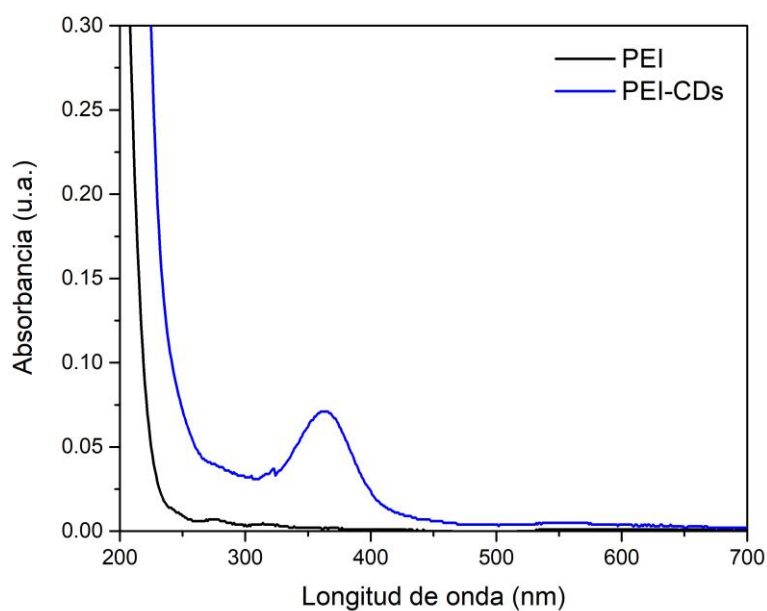


Figura 25. Espectro absorción UV-Vis de PEI y PEI-CDs.

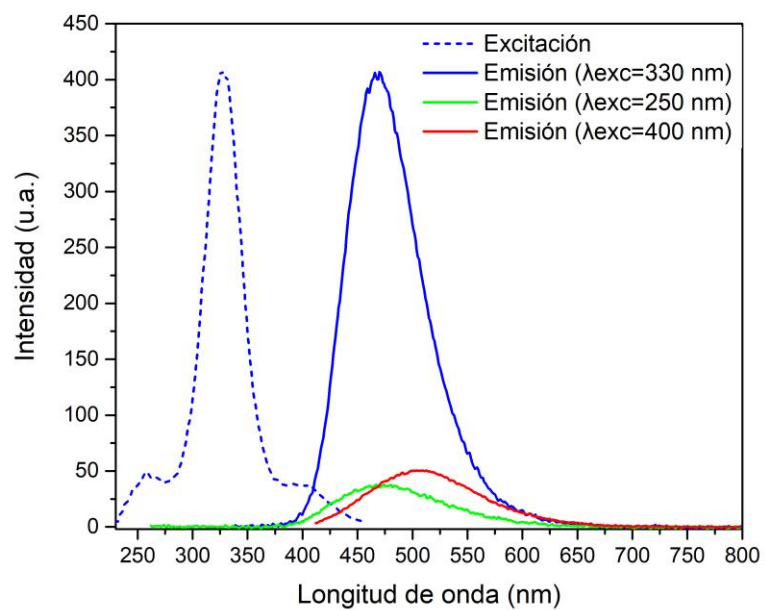


Figura 26. Espectro de excitación y emisión de PEI-CDs a diferentes longitudes de onda ($\lambda_{exc} = 250, 330, 400$ nm)

5.6. Evaluación de la citocompatibilidad de los nanotransportadores

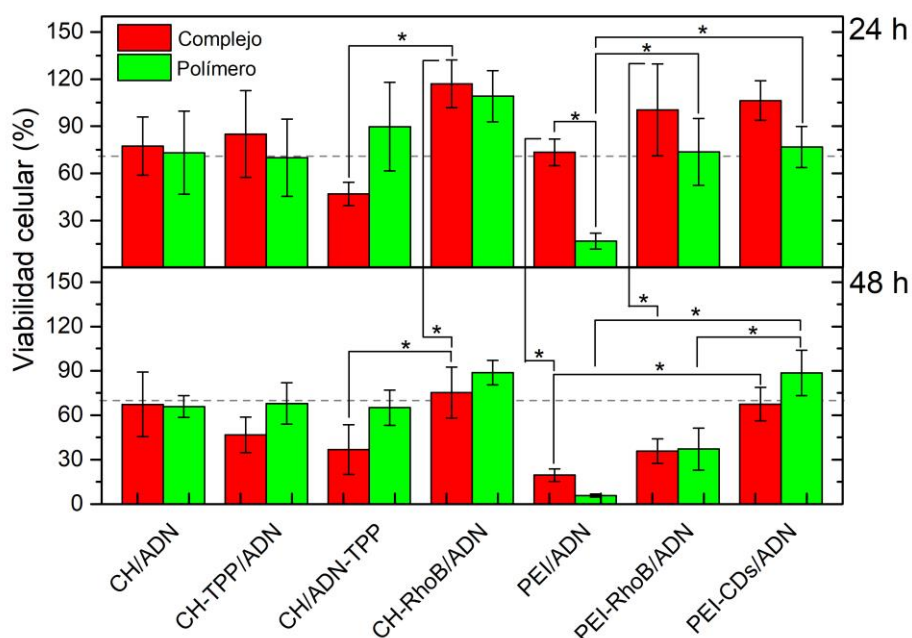


Figura 27. Evaluación de citotoxicidad de los policomplejos por absorción de rojo neutro (NRU) en línea celular HeLa. Los policomplejos fueron preparados a una relación N/P = 10. Análisis estadístico ANOVA. Se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni y Tukey y las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0.05$.

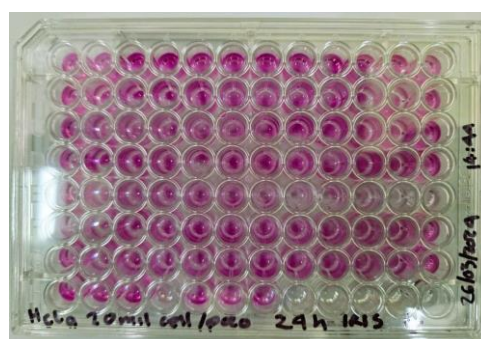


Figura 28. Imagen de la placa de 96 pocillos con tinción de rojo neutro a las 24 h.

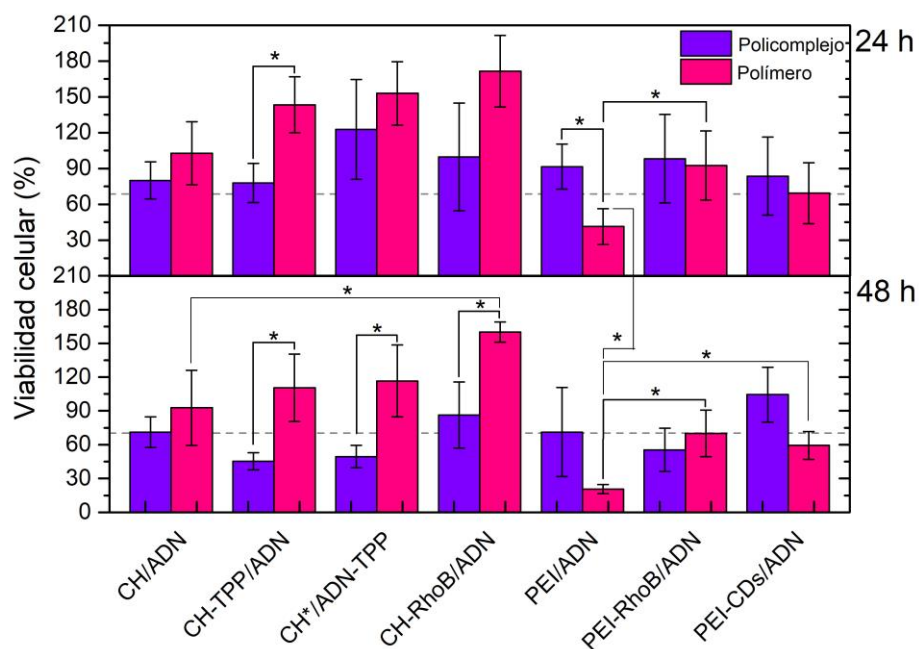


Figura 29. Evaluación de citotoxicidad de los policomplejos por tinción con cristal violeta en células HeLa. Los policomplejos fueron preparados a una relación N/P = 10. Análisis estadístico ANOVA. Se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni y Tukey y las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0.05$.

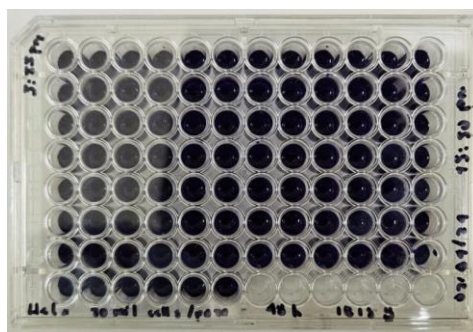
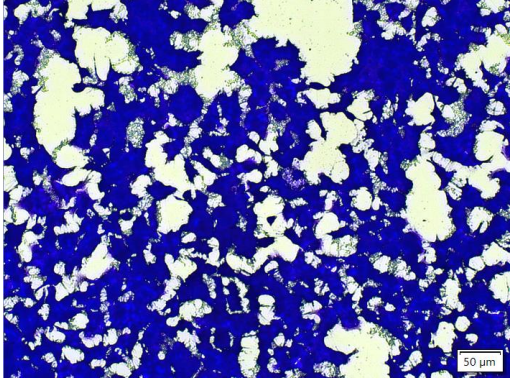
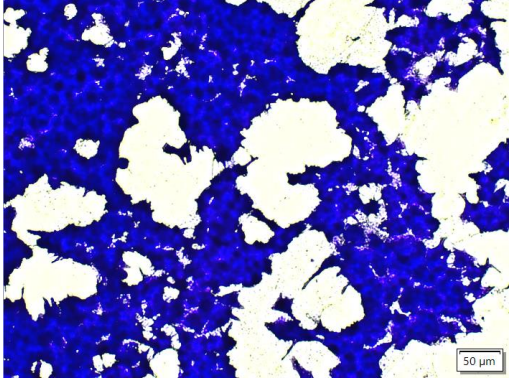
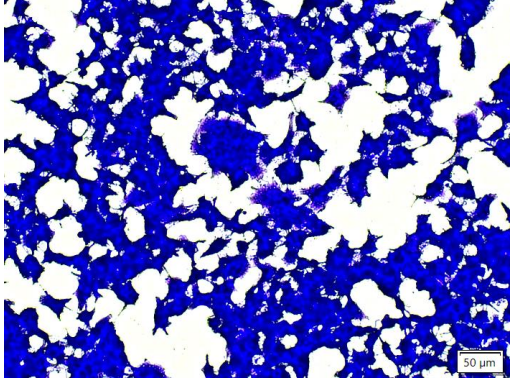
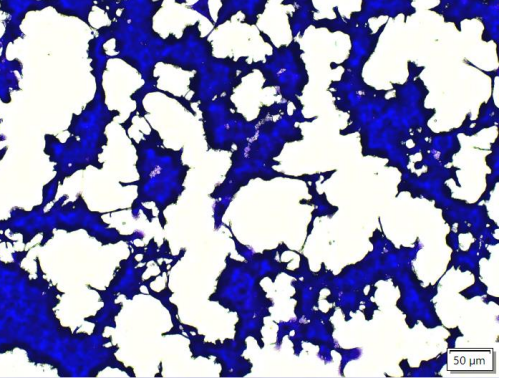
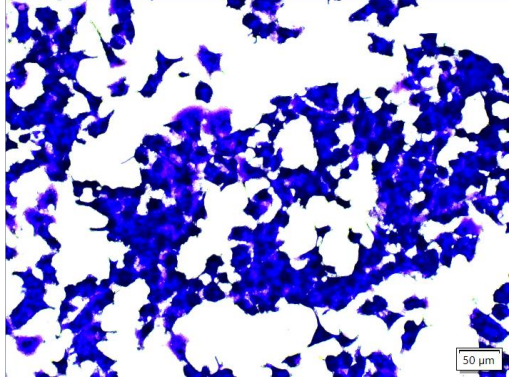
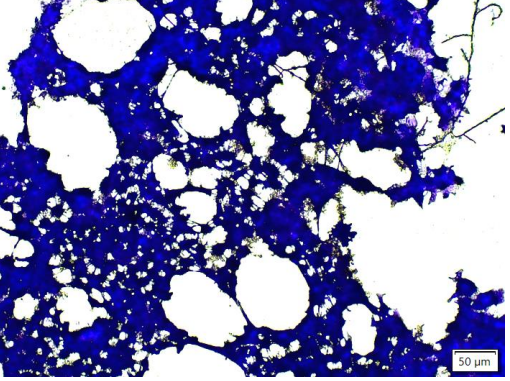
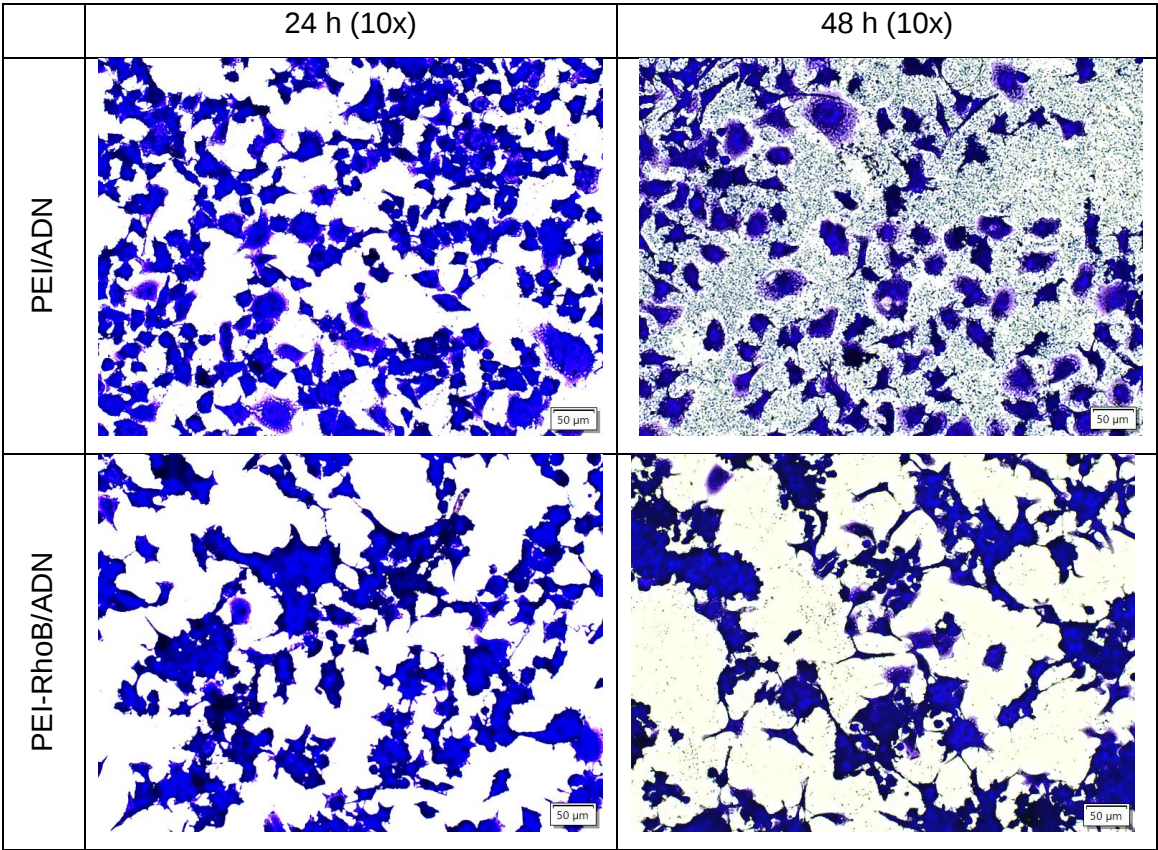
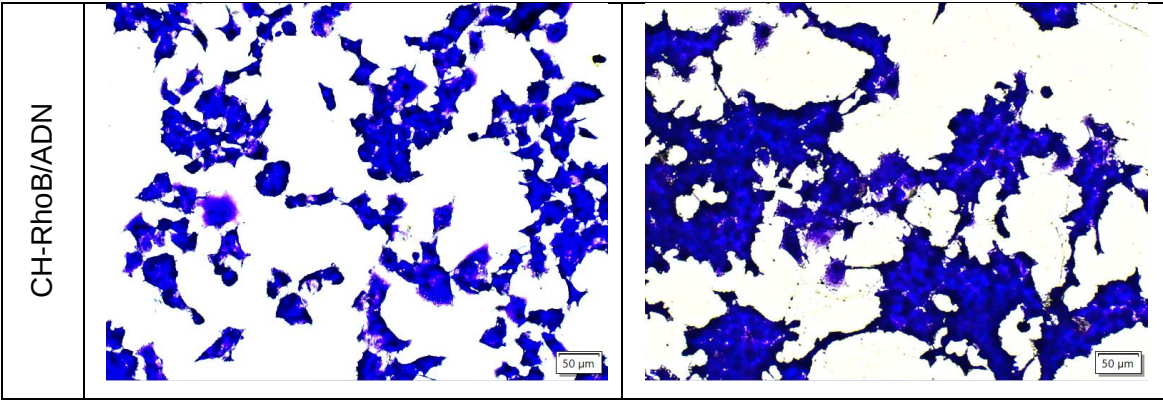
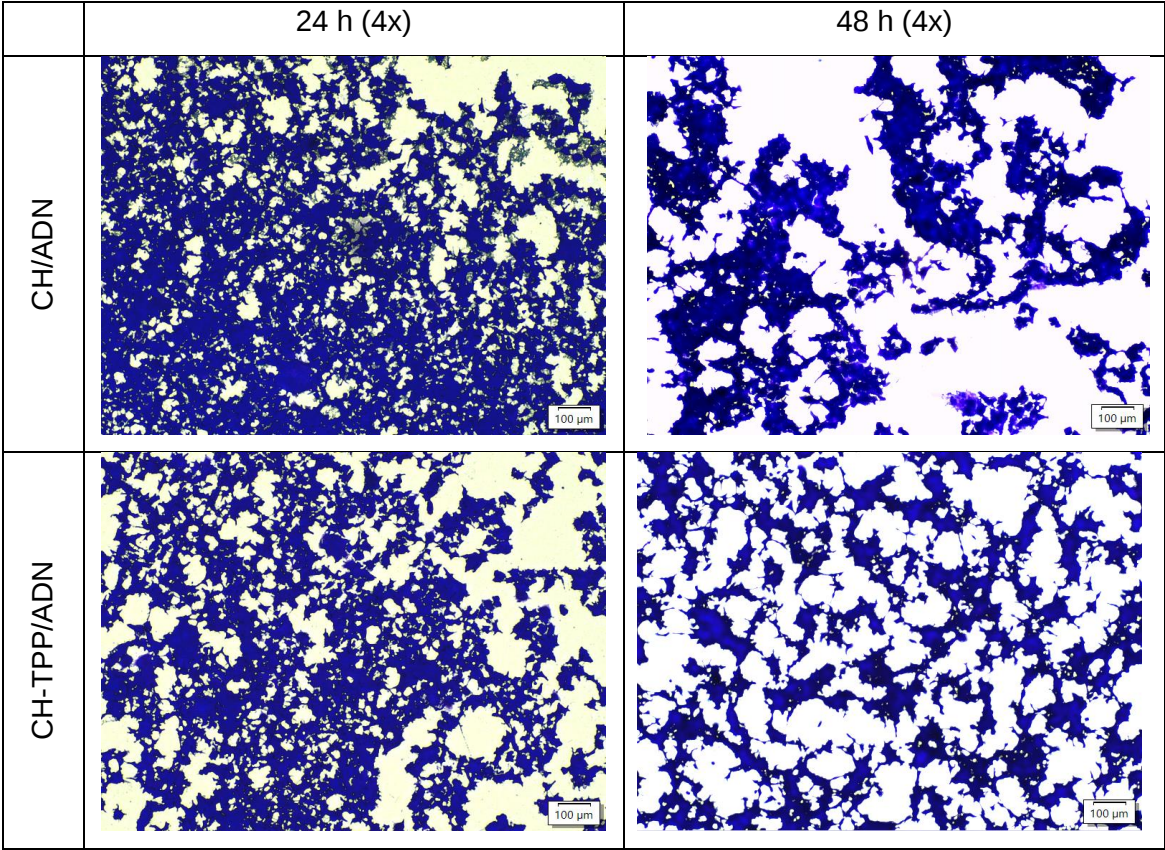
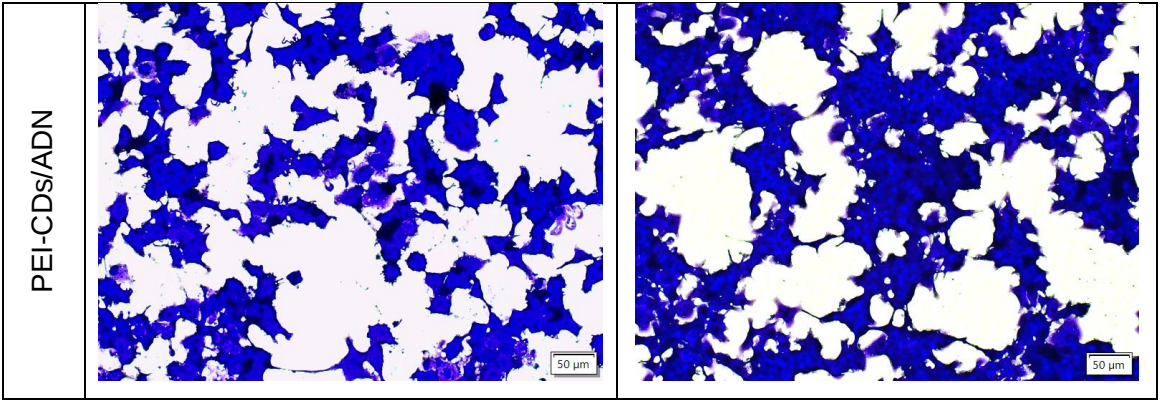


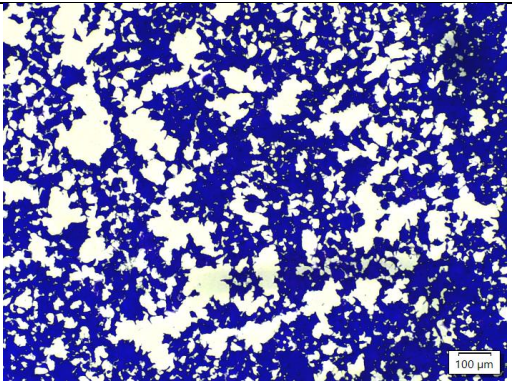
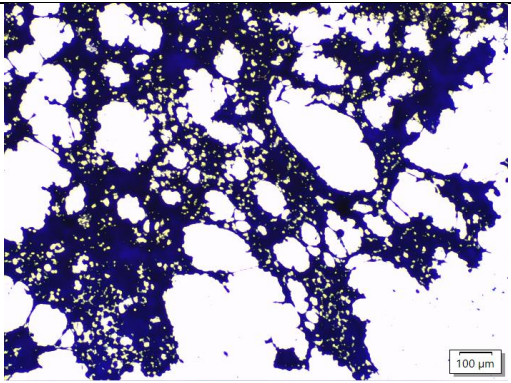
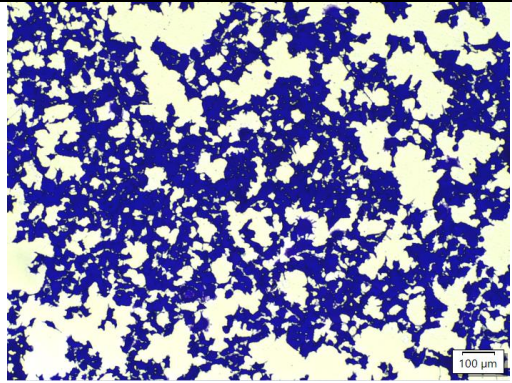
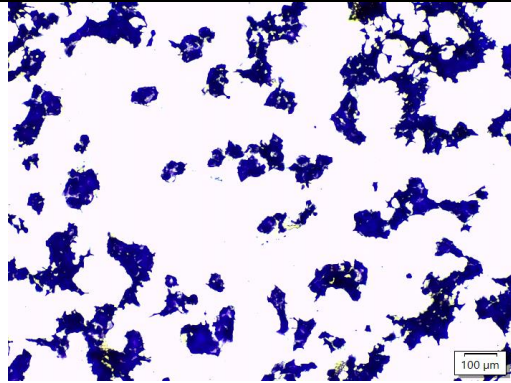
Figura 30. Imagen de la placa de 96 pocillos con tinción con cristal violeta a las 24 h.

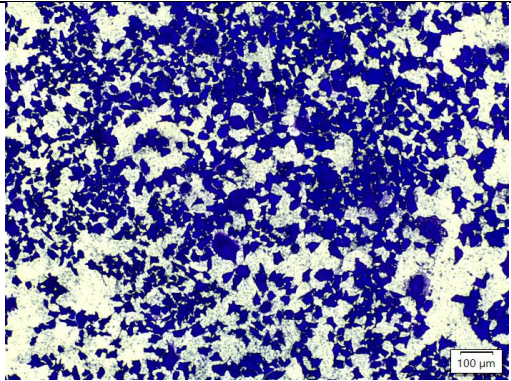
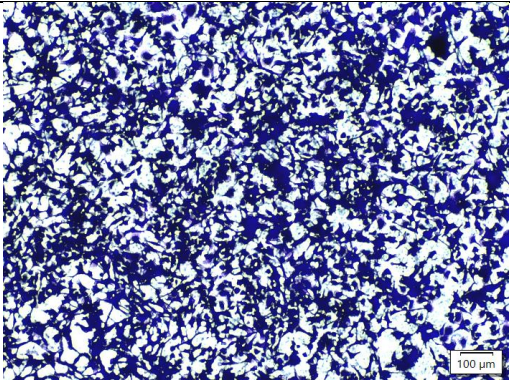
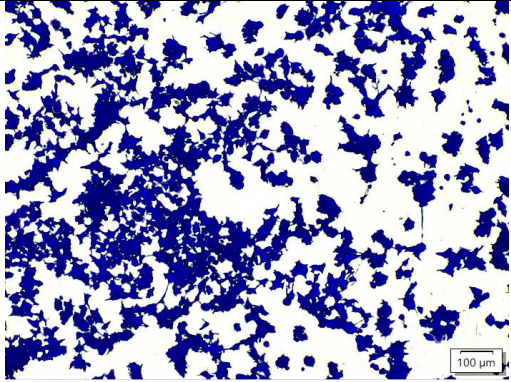
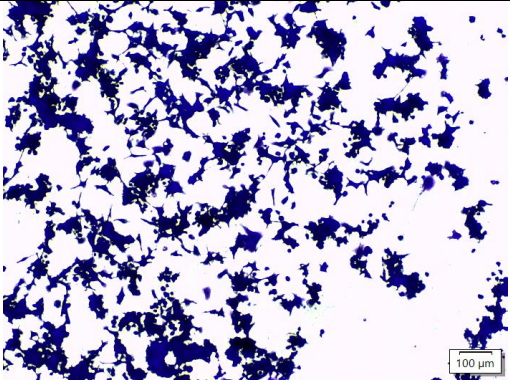
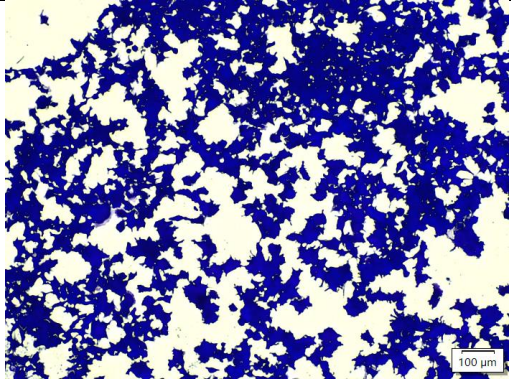
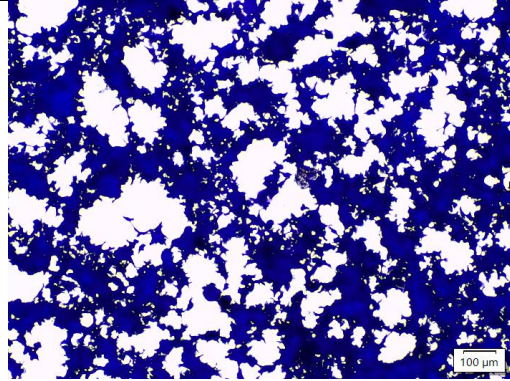
Cristal violeta

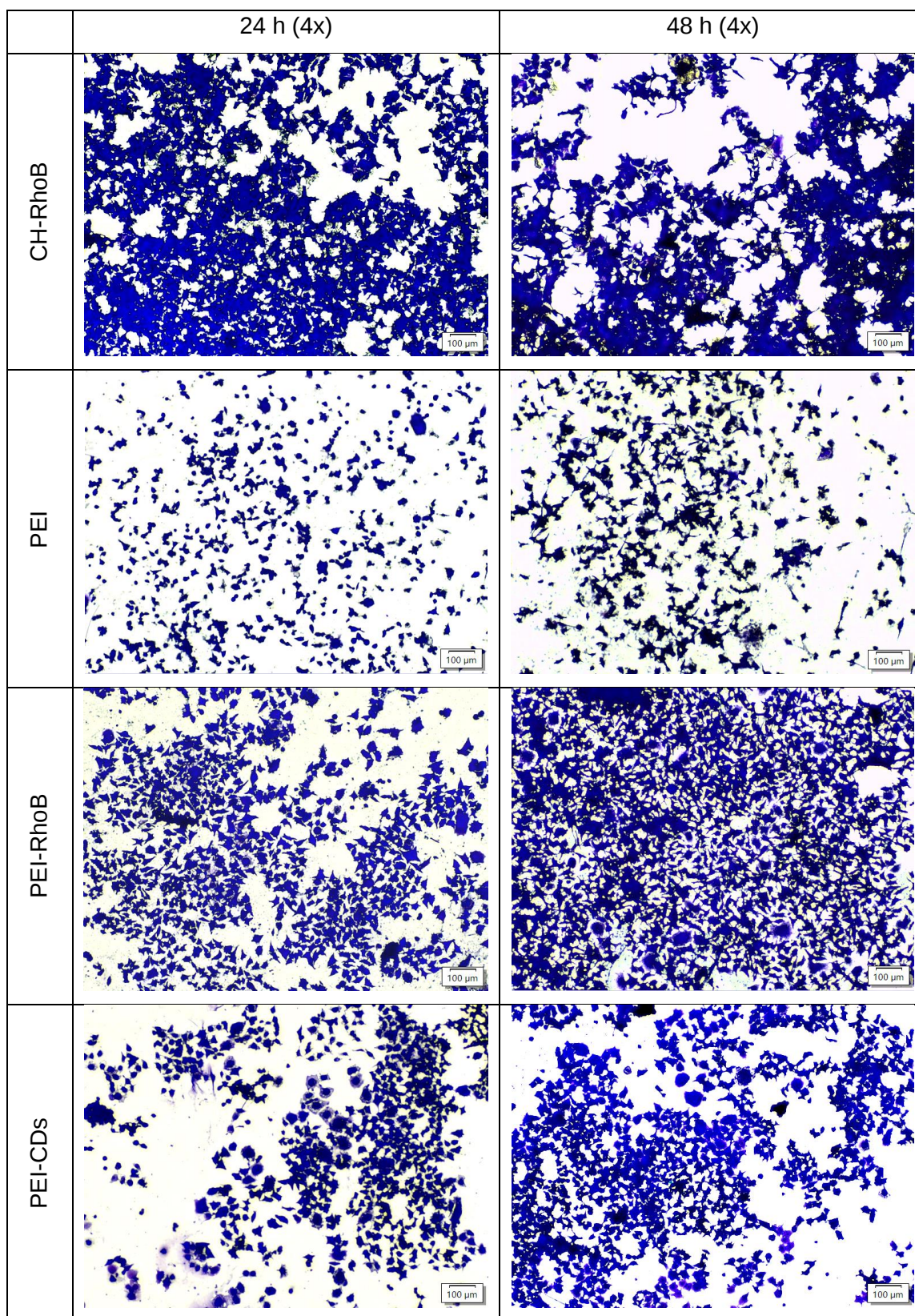
	24 h (10x)	48 h (10x)
CH/ADN		
CH-TPP/ADN		
CH/ADN-TPP		

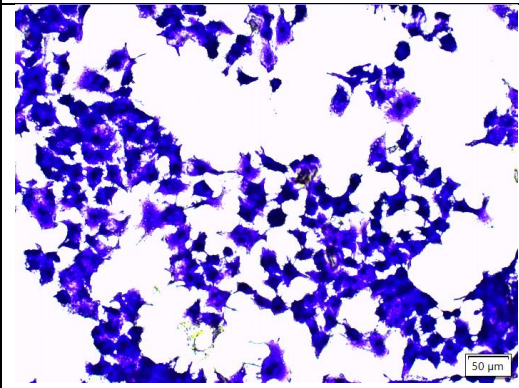
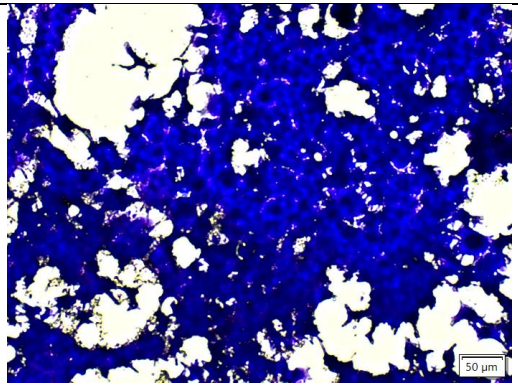
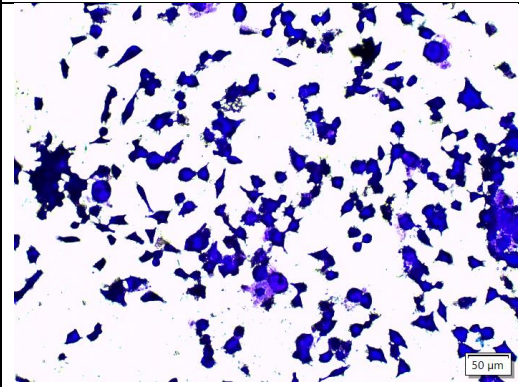
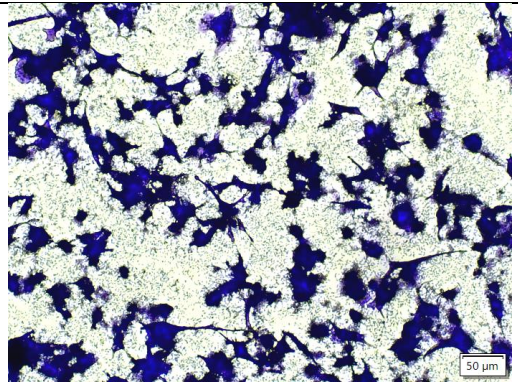
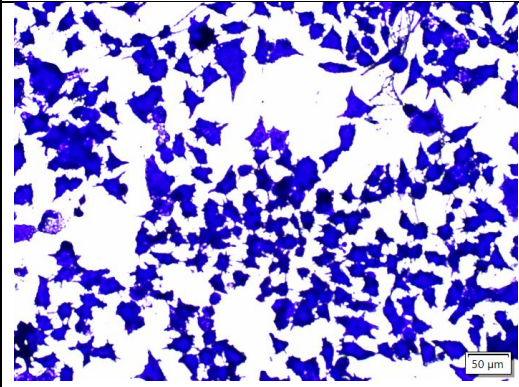
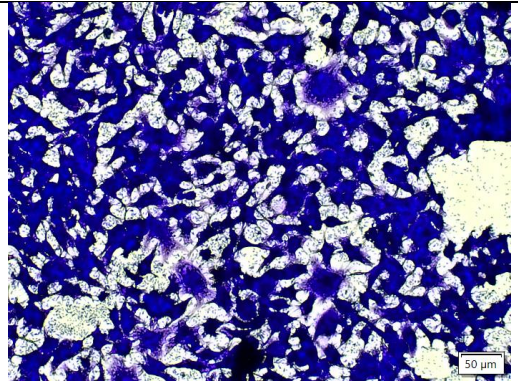




CH/ADN-TPP	 
CH-RhoB/ADN	 

	24 h (4x)	48 h (4x)
PEI/ADN		
PEI-RhoB/ADN		
PEI-CDs/ADN		



	24 h (10x)	48 h (10x)
CH-RhoB		
PEI		
PEI-RhoB		

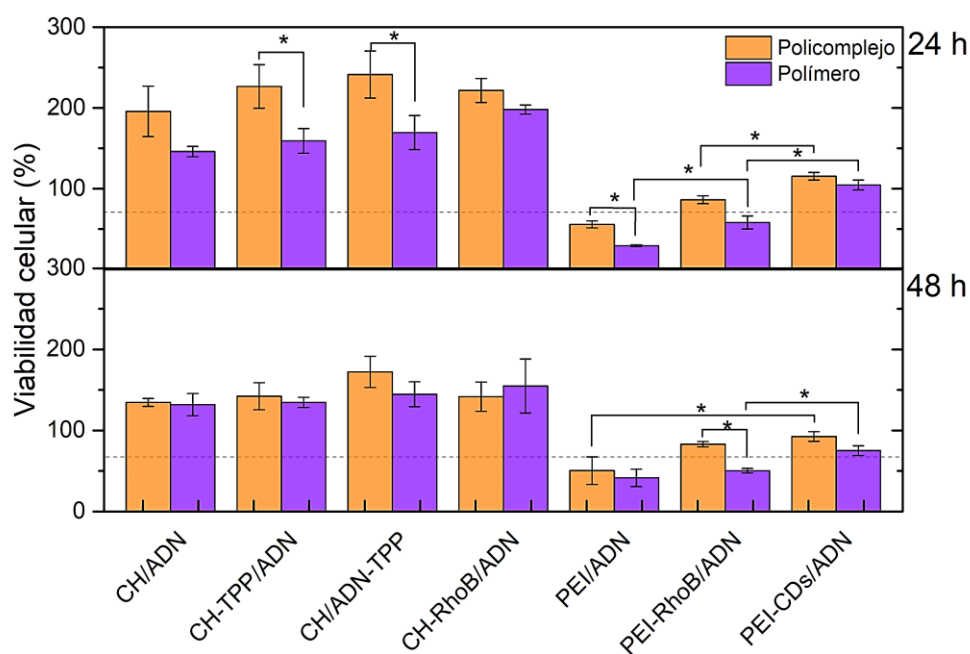
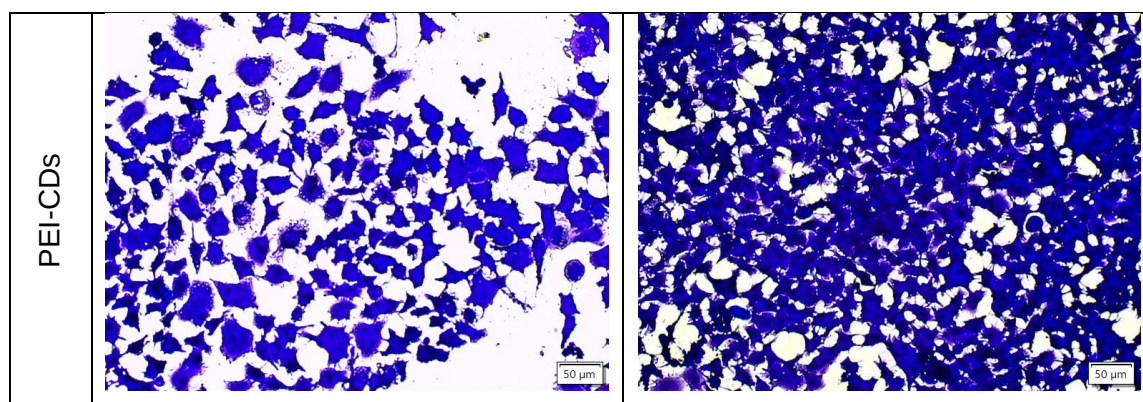


Figura 31. Evaluación de citotoxicidad de los polímeros con CCK-8 en células HeLa. Los polímeros fueron preparados a una relación N/P = 10. Análisis estadístico ANOVA. Se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni y Tukey y las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0.05$.

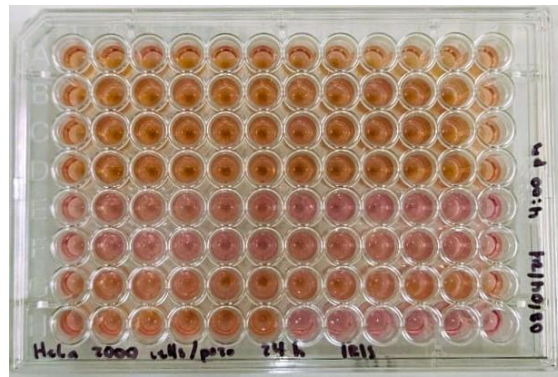
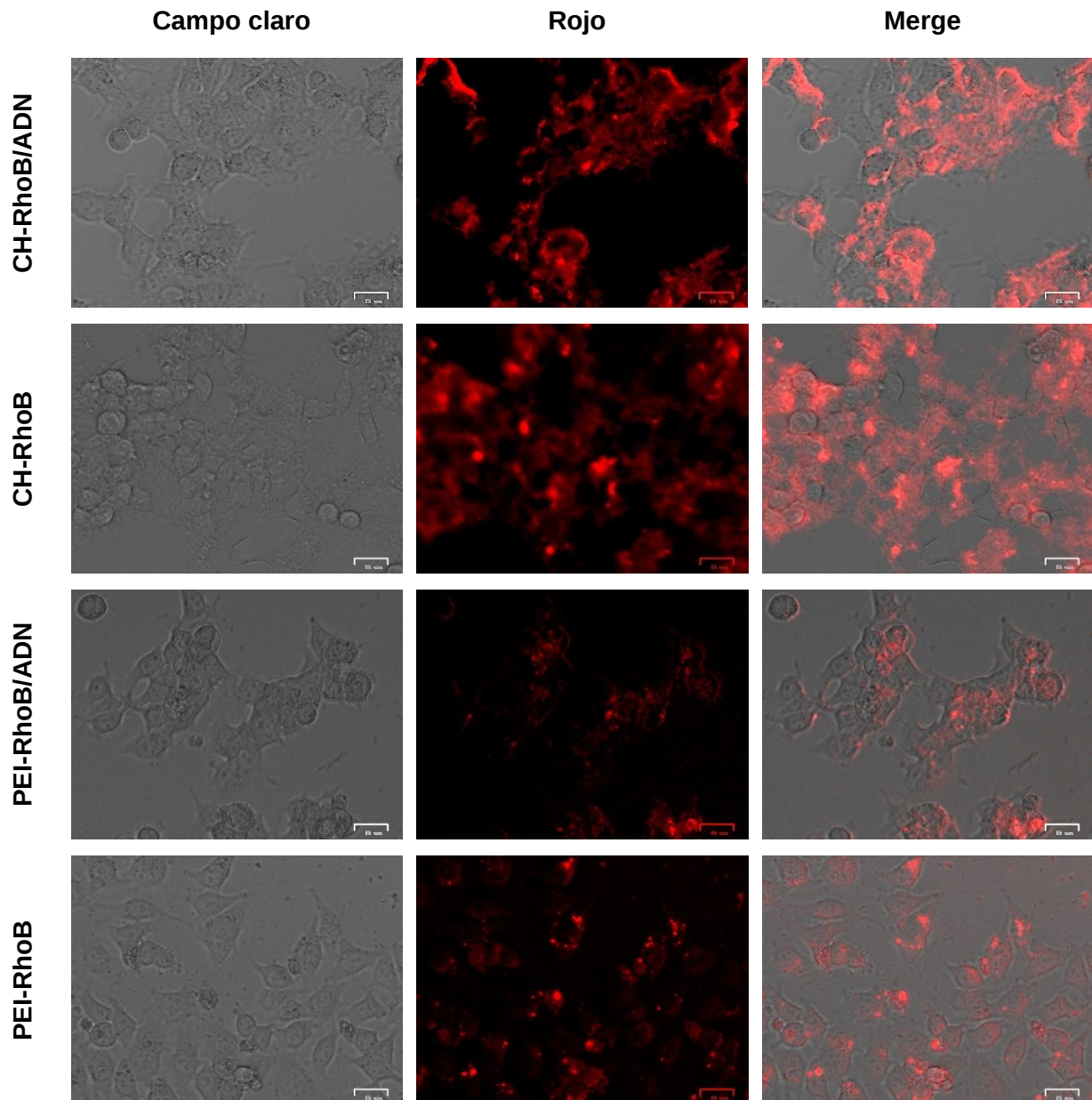
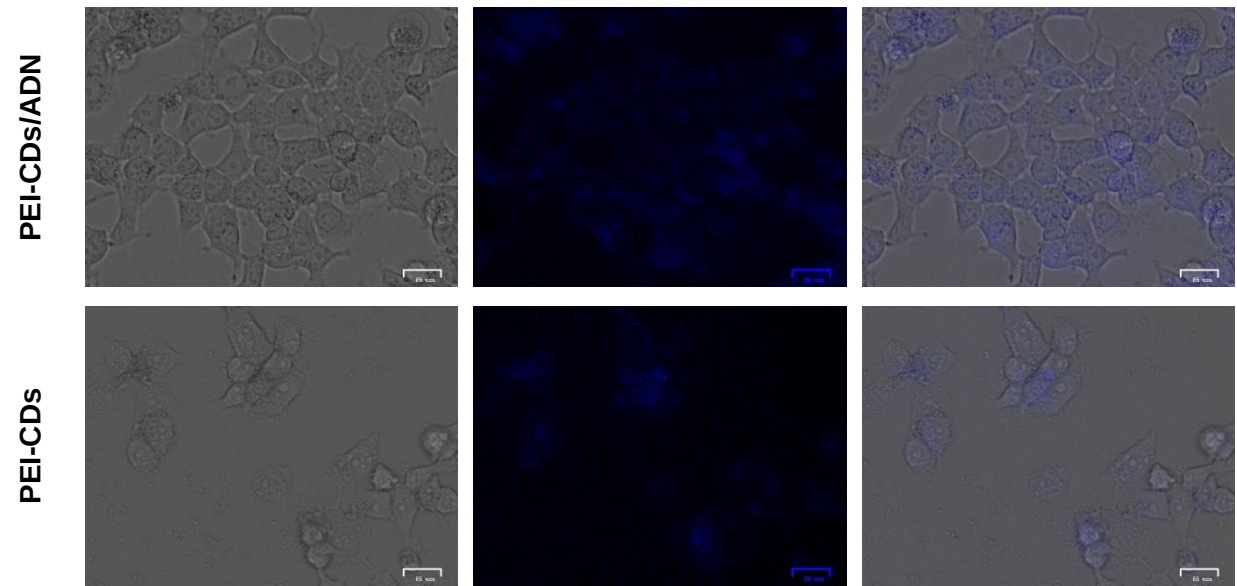


Figura 32. Imagen de la placa de 96 pocillos con tinción por CCK-8 a las 24 h.

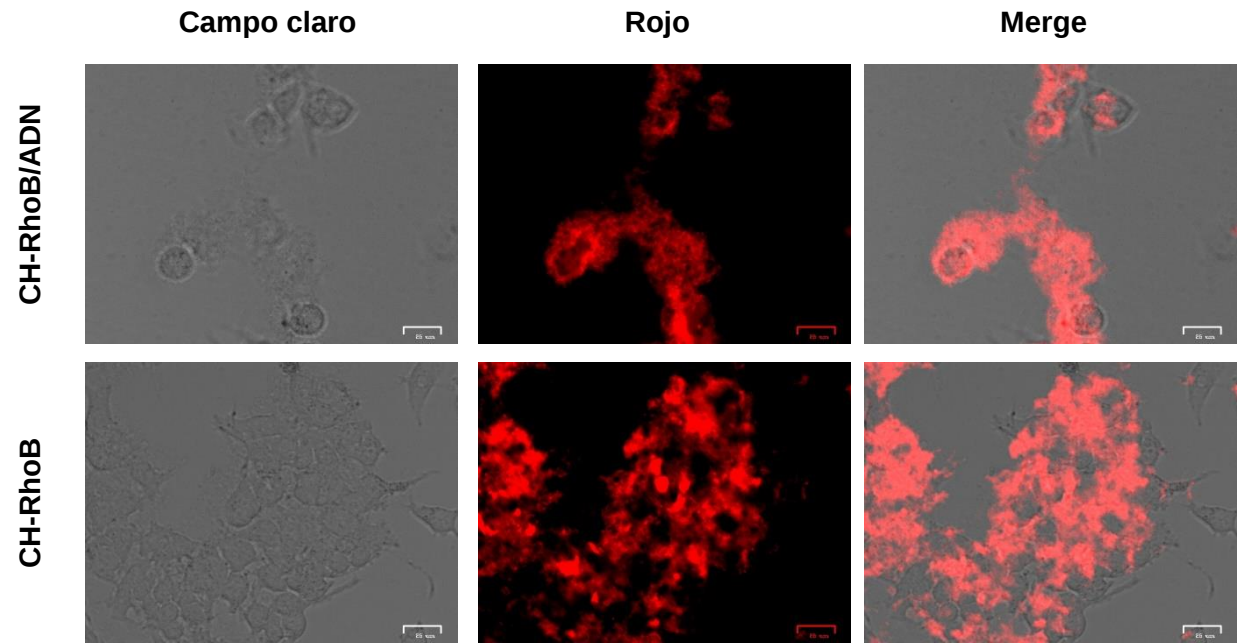
5.7. Evaluación de citocompatibilidad e internalización celular por microscopia óptica y de fluorescencia confocal

24 h (¿Tamaño de la imagen con zoom?)

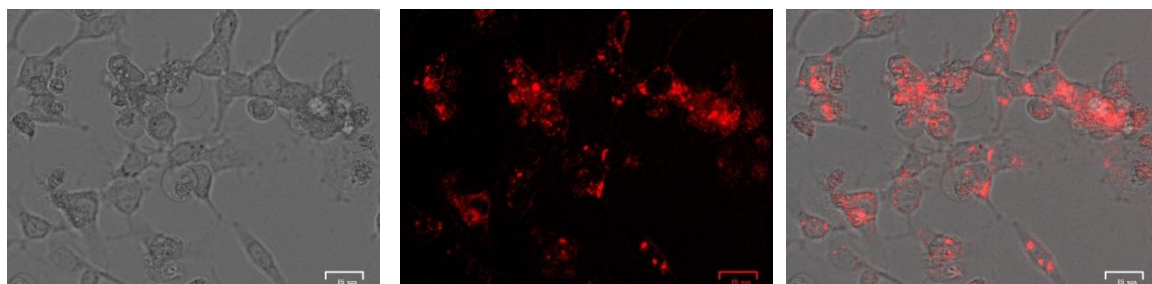




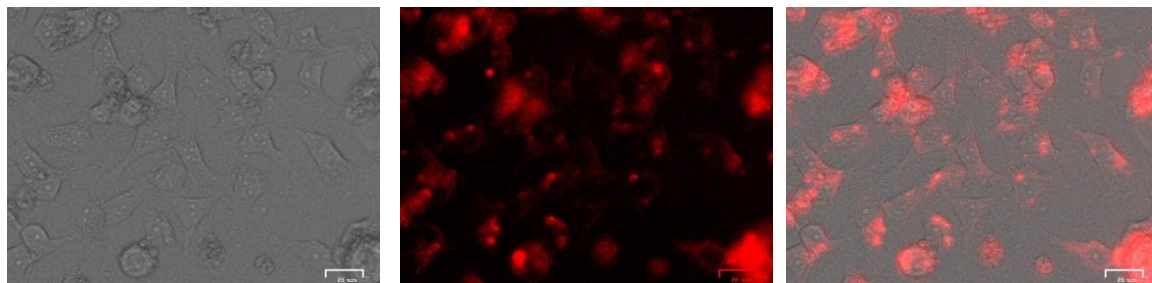
48 h



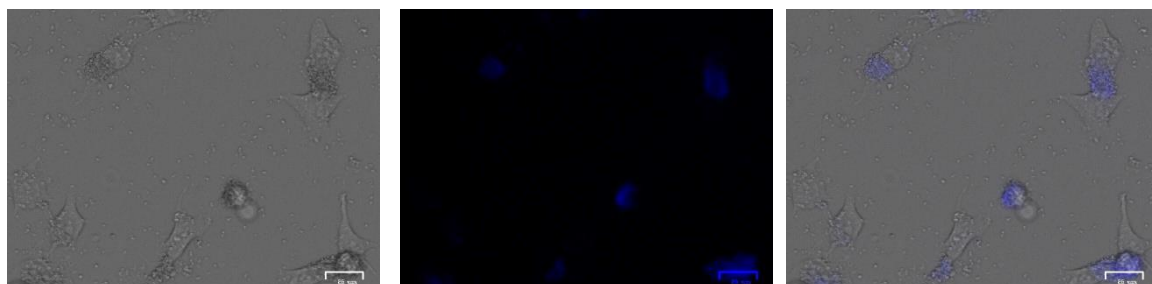
PEI-RhoB/ADN



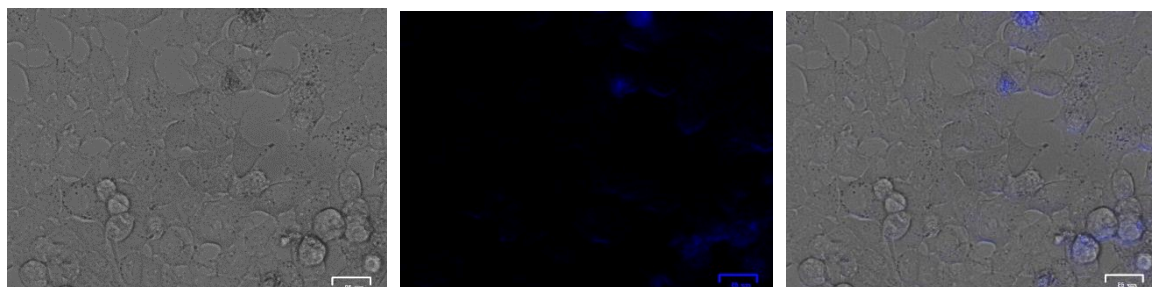
PEI-RhoB



PEI-CDs/ADN



PEI-CDs



CONFOCAL

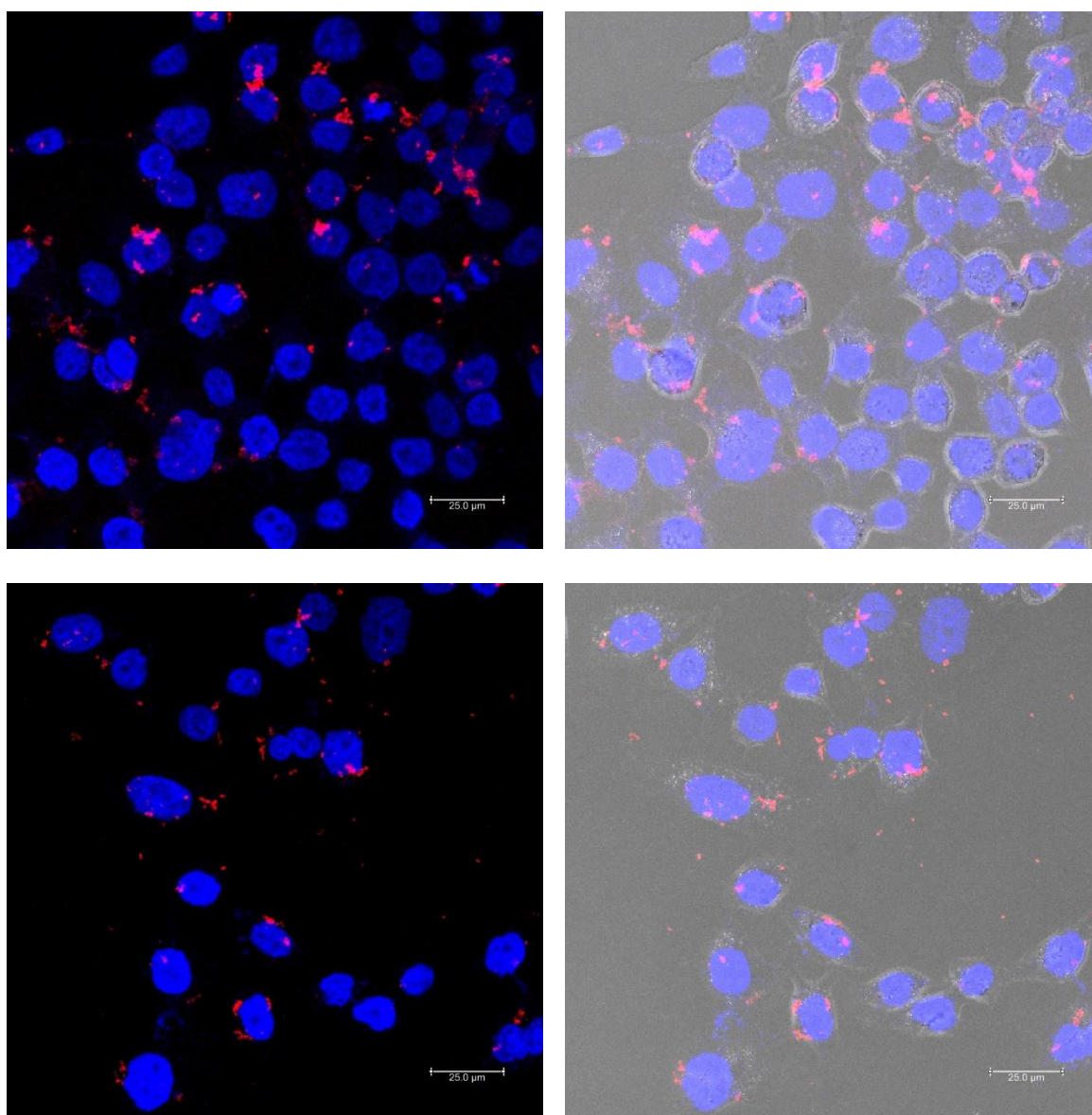


Figura 33. Micrografías de fluorescencia confocal de la internalización celular de CH-RhoB (polímero) 8 h después de la transfección en células HeLa. CH-RhoB se observa en el canal rojo, el núcleo celular en azul (DAPI).

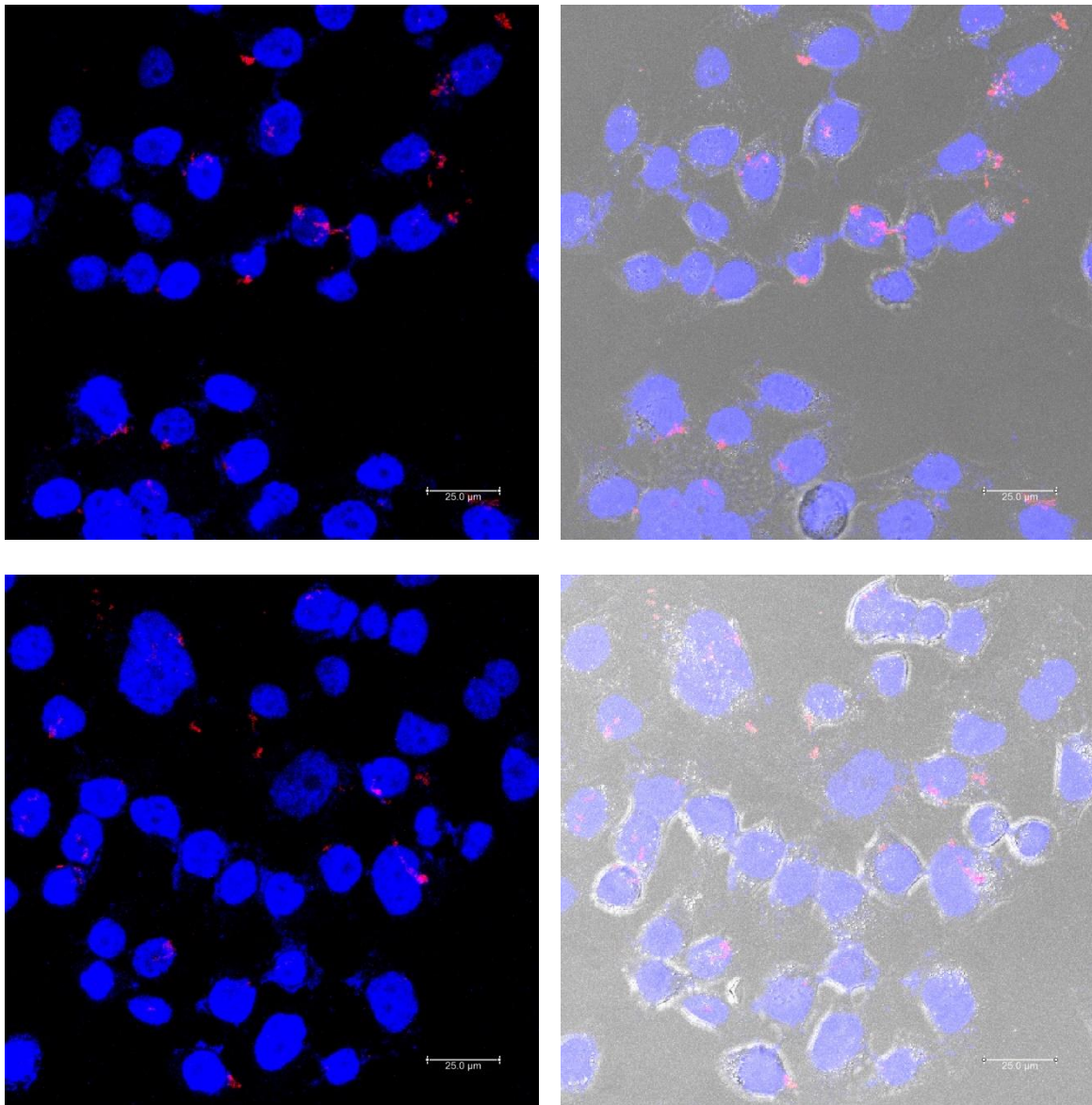


Figura 34. Micrografías de fluorescencia confocal de la internalización celular de CH-RhoB/ADN (policomplejo) 8 h después de la transfección en células HeLa. CH-RhoB se observa en el canal rojo, el núcleo celular en azul (DAPI) y luz transmitida en verde.

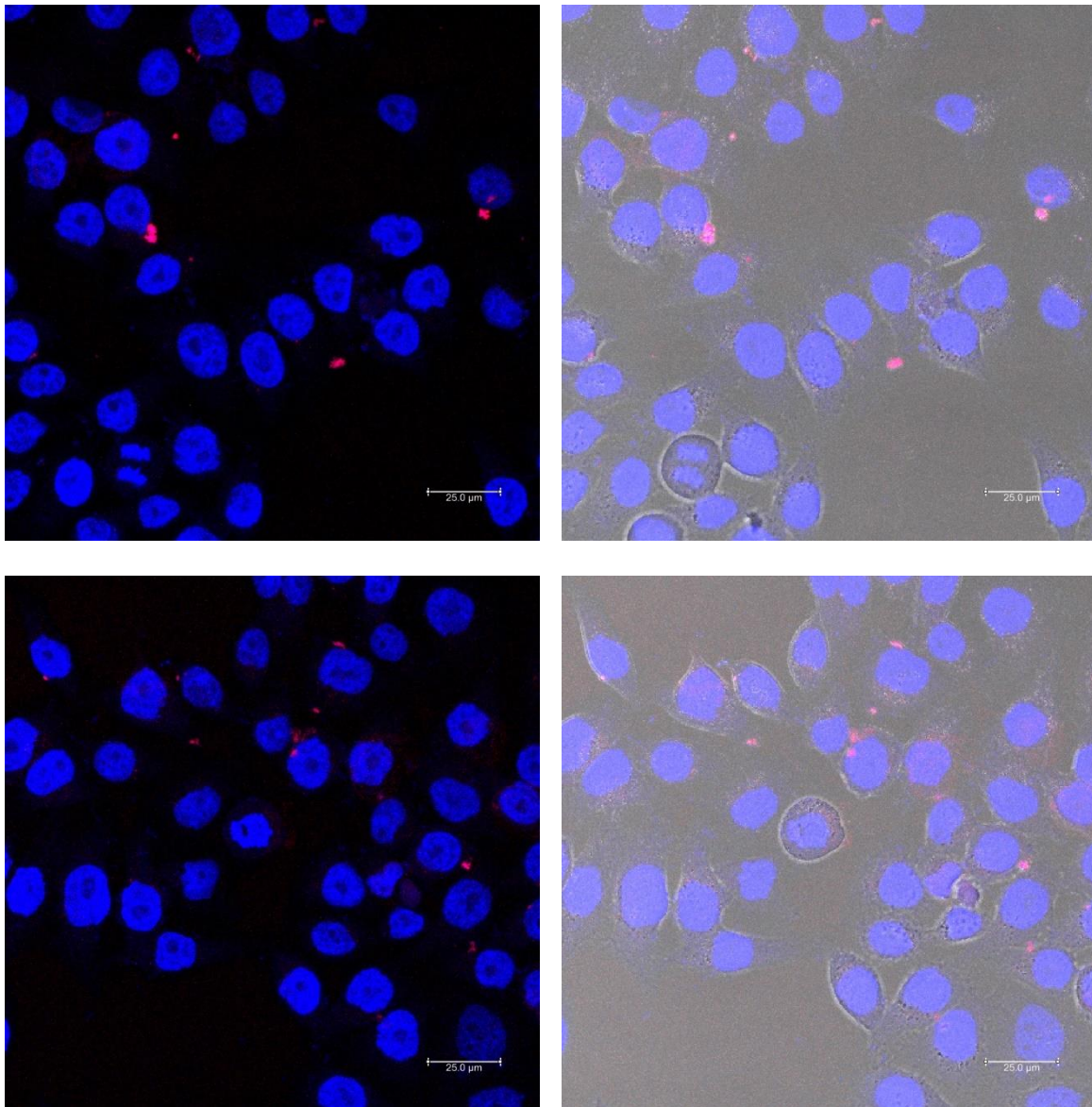


Figura 35. Micrografías de fluorescencia confocal de la internalización celular de PEI-RhoB (polímero) 8 h después de la transfección en células HeLa. PEI-RhoB se observa en el canal rojo, el núcleo celular en azul (DAPI) y luz transmitida en verde.

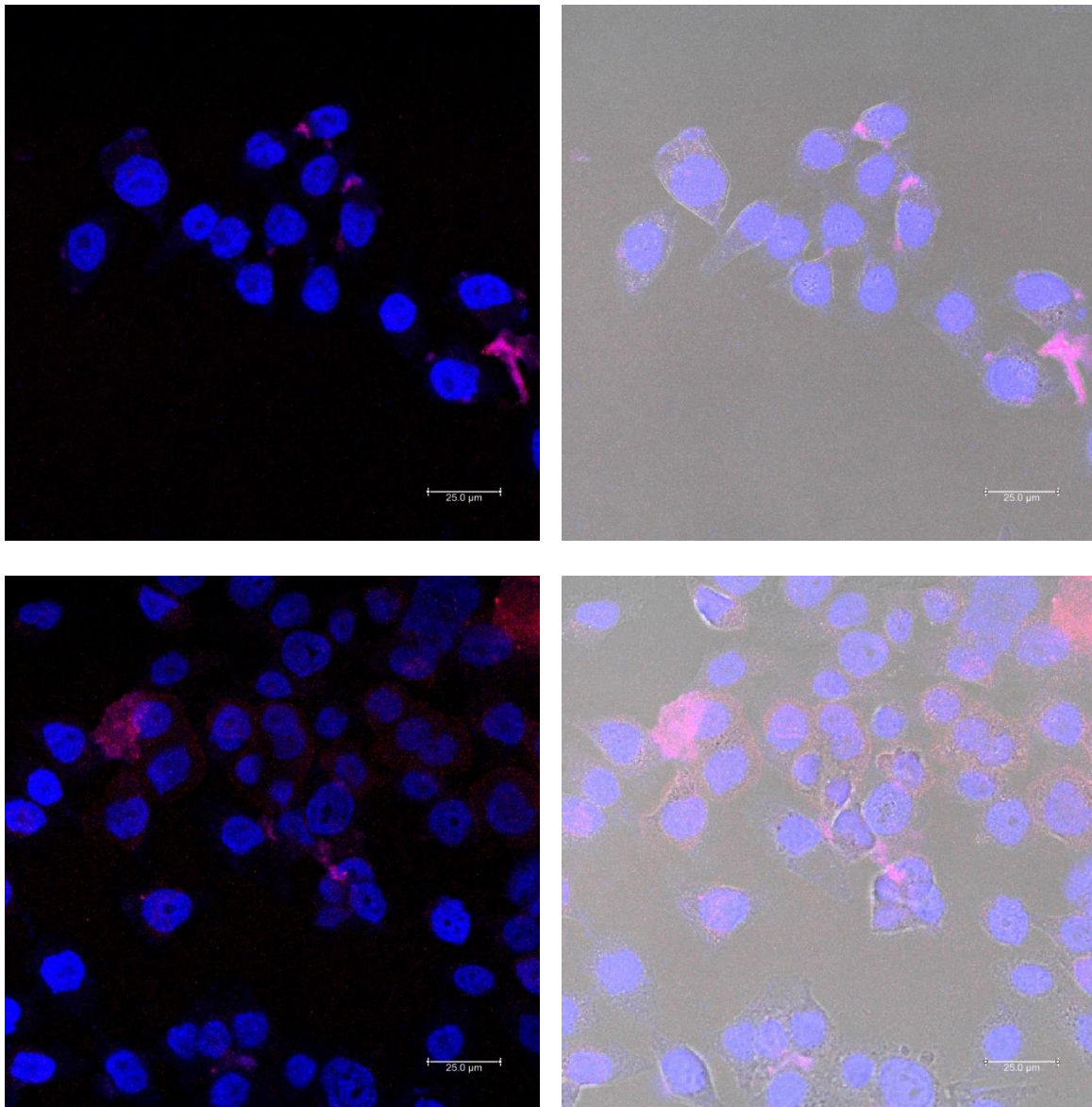


Figura 36. Micrografías de fluorescencia confocal de la internalización celular de PEI-RhoB/ADN (policomplejo) 8 h después de la transfección en células HeLa. PEI-RhoB se observa en el canal rojo, el núcleo celular en azul (DAPI) y luz transmitida en verde.

VI. CONCLUSIONES

Los estudios de UV-Vis demostraron una modificación exitosa de CH y PEI con RhoB, con una eficiencia de reacción del 16.1 y 12%, respectivamente.

Se demostró, a partir de estudios de DLS, que todos los sistemas presentan más de una población de tamaños a relaciones N/P de 1.5 a 2. Se determinó que a una $(N/P)_c = 1.5$ se empezaban a formar los complejos y a una $(N/P)^* = 3$ los complejos adoptaban tamaños estables.

A una relación N/P 1.5 se tienen tres poblaciones de tamaño donde predomina el ADN en su forma libre, seguido de ADN en su forma compactada y semi compactada. A una relación N/P 2 se presentan dos poblaciones de tamaño y a partir de una N/P 3 solo se presenta una (280 nm). La eficiencia de complejación fue corroborada por electroforesis en gel.

Los estudios de AFM mostraron que, a una relación N/P 10, se obtuvieron nanopartículas esféricas bien definidas para el sistema CH-RhoB/ADN, esto indica que la compactación del ADN es más ordenada, en comparación con el sistema CH/ADN.

En general, los ensayos ELISA y de microscopia óptica demostraron que los sistemas nanotransportador/gen son citocompatibles a 24 h independientemente del indicador estudiado, aunque presentan una disminución de moderada a significativa en esta propiedad a 48 h en términos de estabilidad de membrana.

La modificación de los nanotransportadores con rodamina y puntos cuánticos de carbono mejoraron la citocompatibilidad de los sistemas en ambos puntos de tiempo (24 y 48 h), con independencia del indicador estudiado.

Los ensayos de contratinción y microscopia de fluorescencia confocal demostraron que los sistemas nanotransportador/gen se alojan en el citoplasma, preferentemente en la región perinuclear.

VII. REFERENCIAS

1. Cibercita. En: Organización Mundial de la Salud (OMS). Página virtual, <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, 2 de febrero del 2020. (consultado 22 de febrero del 2023).
2. Singh, V.; Khan, N.; Jayandharan, G. R. Vector engineering, strategies and targets in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **2021**, 29, 402–417.
3. Anguela, X. M.; High, K. A. Entering the modern era of gene therapy. *Annu. Rev. Med.* **2017**, 70, 273-288.
4. Xu, H.; Li, Z.; Si, J. Nanocarriers in gene therapy: a review. *Biomed. Nanotech.* **2014**, 10, 3483–3507.
5. Zakeri, A.; Kouhbanani, M. A. J.; Beheshtkhoo, N.; Beigi, V.; Mousavi, S. M.; Hashemi, S. A. R.; Movahedpour, A. Polyethylenimine-based nanocarriers in co-delivery of drug and gene: a developing horizon. *Nano Rev.* **2018**, 9, 1488497.
6. Rodríguez-Velázquez, E.; Taboada, P.; Alatorre-Meda, M. Biocompatible hollow polymeric particles produced by a mild solvent- and template free strategy. *Colloids Surf. B.* **2017**, 160, 732–740.
7. Sun, W.; Tang, F.; Cui, J.; Lu, Z. Fluorescent nanoparticles for targeted tumor imaging and DNA tracking gene delivery in vitro/in vivo. *ACS Omega.* **2020**, 5, 31700–31705.
8. Kowada, T.; Maeda, H.; Kikuchi, K. BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 4953–4972.
9. Alatorre-Meda, M.; Rodríguez-Velázquez, E.; Rodríguez, J. R. Polycation-mediated gene delivery: the physicochemical aspects governing the process. En: *Non-Viral Gene Therapy*. X. Yuan, Ed.; InTech, 2011, 16, 381-416.
10. Danilovtseva, E. N.; Pal'shin, V. A.; Krishnan, U. M.; Annenkov, V. V.; Zelinskiy, S. N. Tagging synthetic polymers with coumarin group for study nucleic acid interaction with gene delivery agents. *MethodsX.* **2019**, 6, 212-218.
11. Acosta-Martínez, D. R.; Rodríguez-Velázquez, E.; Araiza-Verduzco, F.; Taboada, P.; Prieto, G.; Rivero, I. A.; Pina-Luis, G.; Alatorre-Meda, M. Bis-quaternary

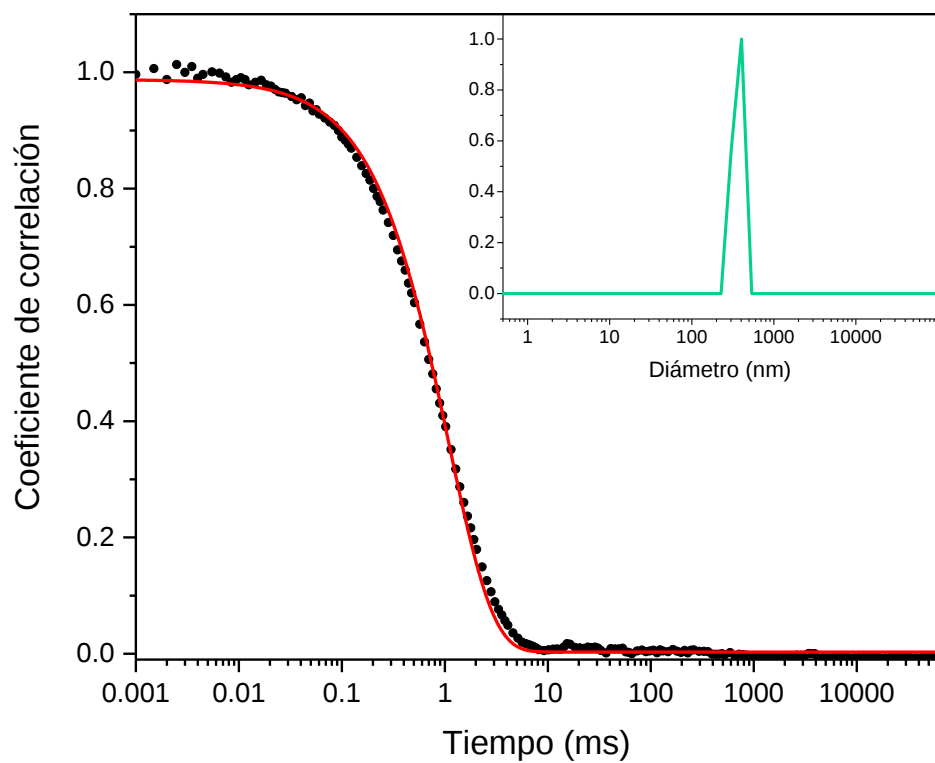
- ammonium gemini surfactants for gene therapy: Effects of the spacer hydrophobicity on the DNA complexation and biological activity. *Colloids Surf. B.* **2020**, *189*, 110817.
12. Sabin, J.; Alatorre-Meda, M.; Miñones, Jr. J.; Domínguez-Arca, V.; Prieto, G. New insights on the mechanism of polyethylenimine transfection and their implications on gene therapy and DNA vaccines. *Colloids Surf. B.* **2022**, *210*, 112219.
13. Felgner, P. L.; Barenholz, Y.; Behr, J. P.; Cheng, S. H.; Cullis, P.; Huang, L.; Jessee, J. A.; Seymour, L.; Szoka, F.; Thierry, A. R.; Wagner, E.; Wu, G. Nomenclature for synthetic gene delivery systems, *Hum. Gene Ther.* **1997**, *8*, 511–512.
14. Katas, H.; Alpar, H. O. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *JCR* **2006**, *115*, 216–225.
15. Mulligan, R. C. An early review describing the key problems facing clinical implementation of human gene therapy. *Sci.* **1993**, *260*, 926–932.
16. McNeish, L. A.; Bell, S. J.; Lemoine, N. R. Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes. *Gene Ther.* **2004**, *11*, 497–503.
17. Walsh, C. E. Gene therapy progress and prospects: gene therapy for the hemophilias. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 999–1003.
18. Thomas, M.; Klibanov, A. M. Non-viral gene therapy: Polycation-mediated DNA delivery. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, *62*, 27-34.
19. Alonoso, J.M.; Goycoolea, F. M. Higuera-Ciapara, I. Chitosan-polysaccharide blended nanoparticles for controlled drug delivery. *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications* **2008**, *20*, 644-679.

Referencias con mendeley cite

- (1) Anguela, X. M.; High, K. A. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annu. Rev. Med.* **2019** **2018**, *70*, 273–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017>.
- (2) Liu, Z.; Li, N.; Liu, P.; Qin, Z.; Jiao, T. Highly Sensitive Detection of Iron Ions in Aqueous Solutions Using Fluorescent Chitosan Nanoparticles Functionalized by Rhodamine B. **2022**. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c07071>.
- (3) Liu, J.; Liu, G.; Liu, W.; Wang, Y. Turn-on Fluorescence Sensor for the Detection of Heparin Based on Rhodamine B-Modified Polyethyleneimine-Graphene Oxide Complex. *Biosens Bioelectron* **2015**, *64*, 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.023>.
- (4) Liu, C.; Zhang, P.; Zhai, X.; Tian, F.; Li, W.; Yang, J.; Liu, Y.; Wang, H.; Wang, W.; Liu, W. Nano-Carrier for Gene Delivery and Bioimaging Based on Carbon Dots with PEI-Passivation Enhanced Fluorescence. *Biomaterials* **2012**, *33* (13), 3604–3613. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.052>.
- (5) Alatorre-Meda, M.; Taboada, P.; Sabín, J.; Krajewska, B.; Varela, L. M.; Rodríguez, J. R. DNA-Chitosan Complexation: A Dynamic Light Scattering Study. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2009**, *339* (1–3), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.02.014>.
- (6) Acosta-Martínez, D. R.; Rodríguez-Velázquez, E.; Araiza-Verduzco, F.; Taboada, P.; Prieto, G.; Rivero, I. A.; Pina-Luis, G.; Alatorre-Meda, M. Bis-Quaternary Ammonium Gemini Surfactants for Gene Therapy: Effects of the Spacer Hydrophobicity on the DNA Complexation and Biological Activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2020**, *189* (January). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110817>.

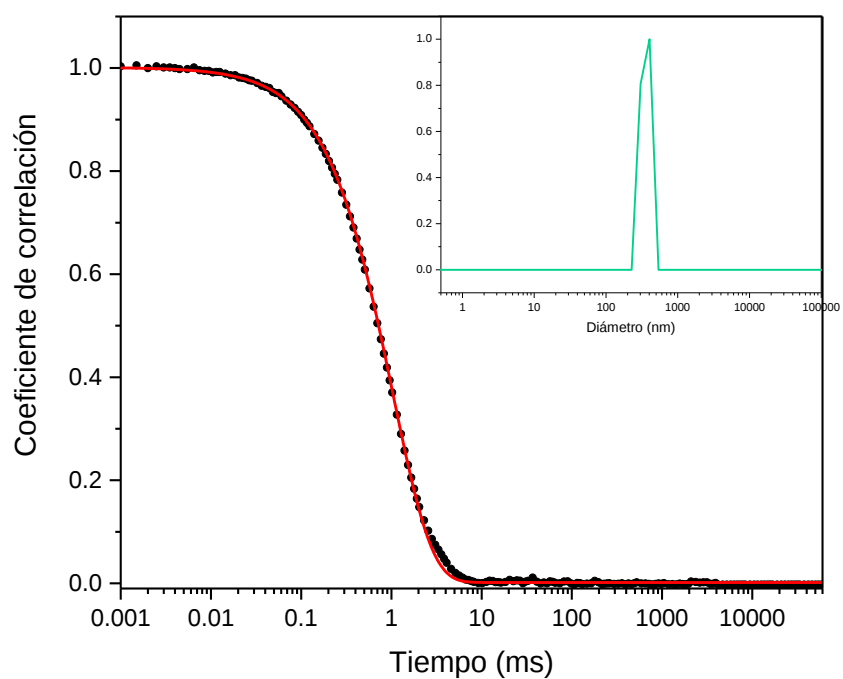
- (7) Egan, R. J.; et al. Phospholipid–Polyethylenimine Conjugate-Based Micelle-like Nanoparticles for SiRNA Delivery. *Behavioral Brain Research* **2009**, 205 (1), 38–44. <https://doi.org/10.1007/s13346-010-0004-0>.Phospholipid.
- (8) Gaspar, V. M.; Sousa, F.; Queiroz, J. A.; Correia, I. J. Formulation of Chitosan-TPP-PDNA Nanocapsules for Gene Therapy Applications. *Nanotechnology* **2011**, 22 (1). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/1/015101>.

VIII. ANEXOS



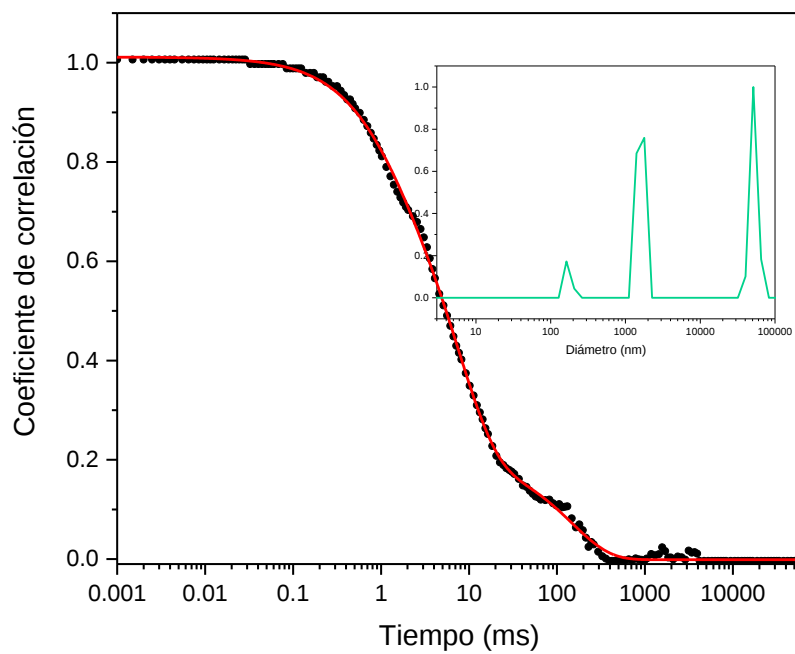
Anexo 1. Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustado a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1). El recuadro muestra la función de distribución.

Muestra CH/ADN a N/P 0.5.

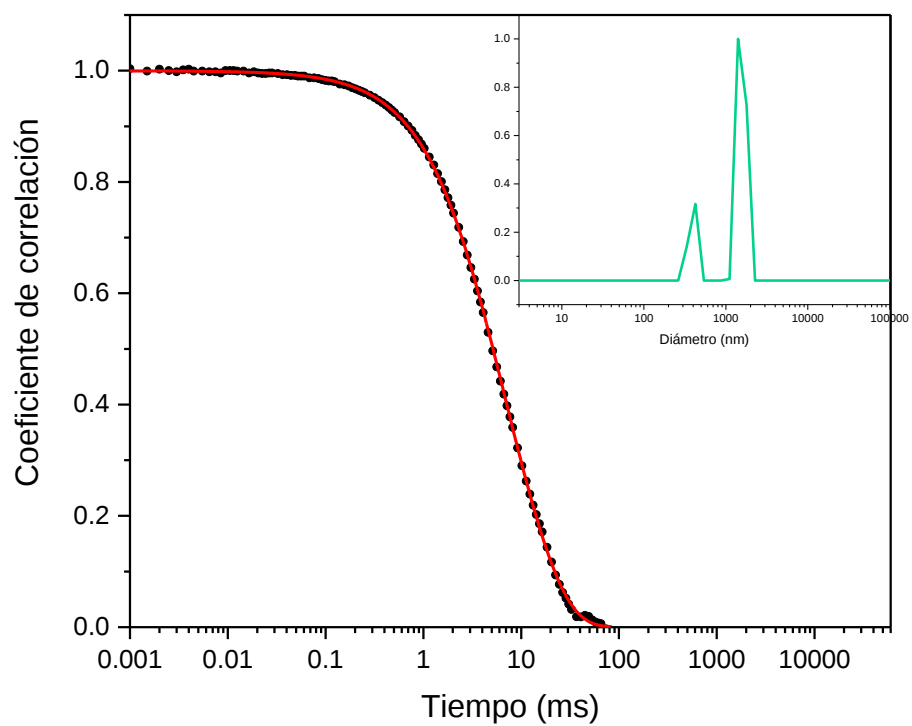


Anexo 2. Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustado a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1). El recuadro muestra la función de distribución.

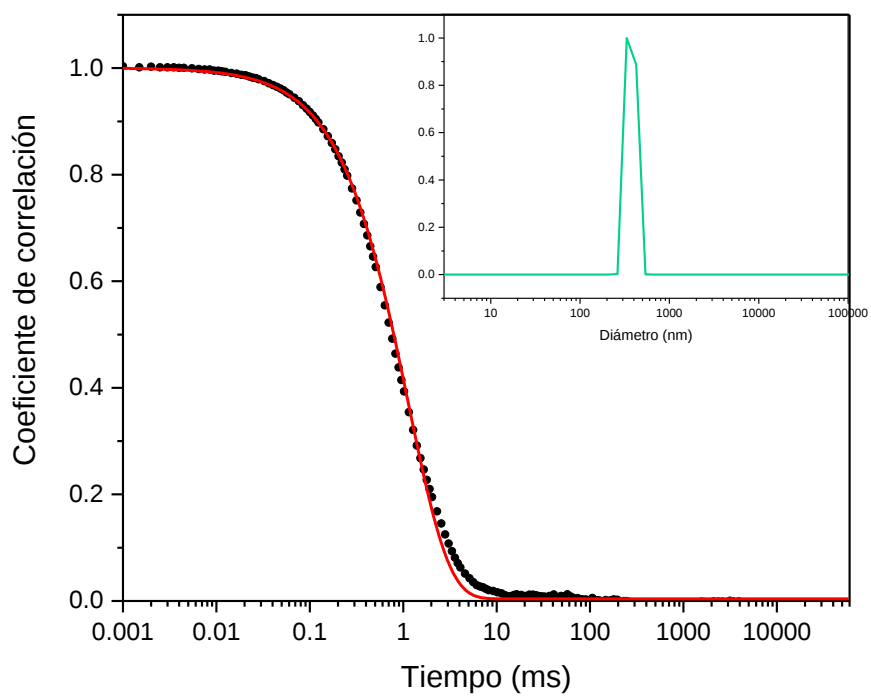
Muestra CH/ADN a N/P 1.



Anexo 3. Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustado a una función exponencial con tres decaimientos (ExpDec3). El recuadro muestra la función de distribución.
Muestra CH/ADN a N/P 1.5.

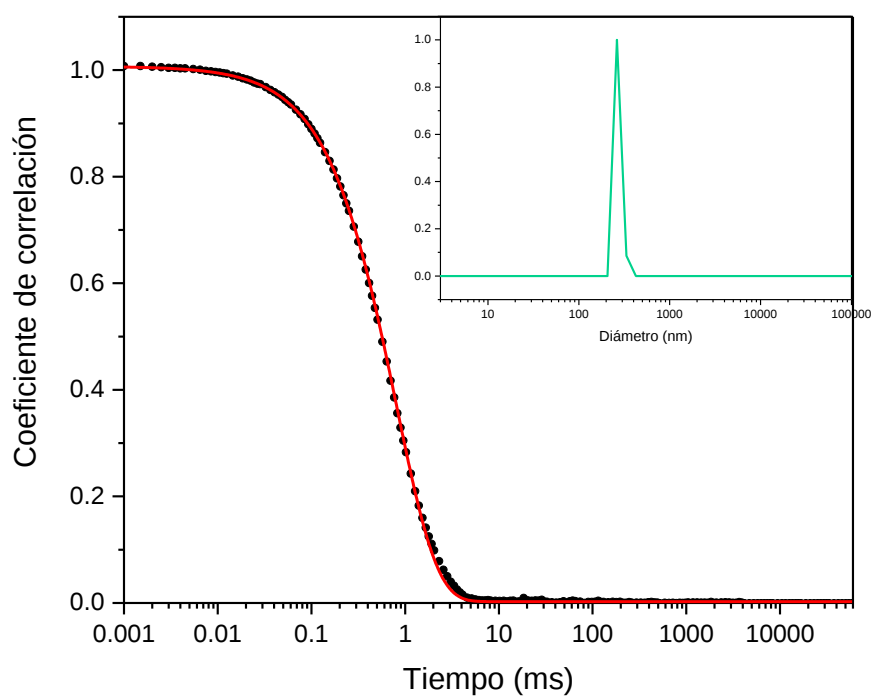


Anexo 4. Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustados a una función exponencial con dos decaimientos (ExpDec2). El recuadro muestra la función de distribución.
Muestra CH/ADN a N/P 2.



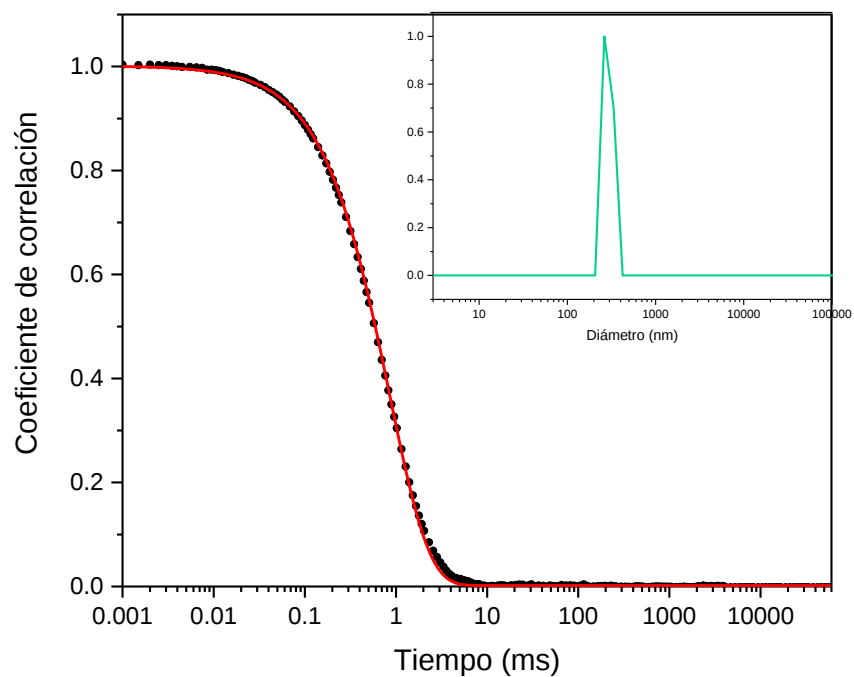
Anexo 5. Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustado a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1). El recuadro muestra la función de distribución.

Muestra CH/ADN a N/P 3.



Anexo 6. Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustado a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1). El recuadro muestra la función de distribución.

Muestra CH/ADN a N/P 5.



Anexo 7. Correlograma normalizado entre 0 y 1 y ajustados a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1). El recuadro muestra la función de distribución.

Muestra CH/ADN a N/P 10.

N/P	CH/ADN				
	Zetasizer*	Norm. 0 y 1**	ExpDec1***	ExpDec2****	ExpDec3*****
	nm	nm (%)	nm (%)	nm (%)	nm (%)
0.5	299.1	280.9 (94.42)	319.1 (100)		
	301.9	296.8 (93.87)	317.8 (100)		
	332.5	370 (90.70)	364.3 (100)		
1	336.5	328.7 (96.49)	355.6 (100)		
	343.6	323.2 (93.94)	360.1 (100)		
	405.1	348.9 (90.39)	389.5 (100)		
1.5	1839	56.39 (3.59)			54.13 (3.53)
		1289 (47.78)			1293 (48.10)
		3588 (48.62)			3608 (48.35)
	1775	70.56 (3.45)			61.51 (3.21)
		1145 (46.70)			1123 (46.60)
		3601 (49.83)			3485 (50.17)
	1658	182.9 (7.84)			170.6 (7.32)
		1675 (49.77)			1597 (49.04)
		6102 (42.37)			5219 (43.62)
2	2465	486.6 (16.80)		552.1(22.72)	
		2986 (83.19)		3117 (77.27)	
	2537	1388 (53.56)		1290 (58.78)	
		7872 (46.43)		5011 (41.21)	
	2415	760 (18.82)		809.5(20.83)	
		3760 (81.17)		4059 (79.16)	
3	351	339.7 (92.09)	373.5 (100)		
	386.9	366.7 (94.38)	406.9 (100)		
	390.8	487.9 (80.49)	413.3 (100)		
5	264.4	252.4 (94.26)	267.6 (100)		
	278.9	261.3 (93.42)	281.6 (100)		
	275.7	281.2 (95.90)	284.8 (100)		
10	260.1	247 (94.64)	273.7 (100)		
	268.3	263.6 (97.67)	286.7 (100)		
	284	283.7 (98.77)	289.9 (100)		

Anexo 8. Análisis estadístico de los policomplejos CH/ADN a diferentes relaciones N/P.

Datos obtenidos de Malvern Zetasizer Software*. Correlogramas normalizados entre 0 y 1**. Correlogramas normalizados entre 0 y 1 y ajustados a una función exponencial con un decaimiento (ExpDec1)***, dos decaimientos (ExpDec2)**** y tres

decaimientos (ExpDec3)****. Analizados en ALV-Non Linear Data Analysis Software Package.

Trabajo a futuro

Cuantificar la liberación intracelular de ADN por ensayos biológicos ELISA, empleando plásmidos codificados.